

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS
MAESTRIA EN ECOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLGÍA



MECANISMOS DE INFECCIÓN DEL VIRUS DE LA MANCHA BLANCA (WSSV) EN
CAMARÓN *Litopenaeus vannamei* EXPUESTO A SALINIDADES EXTREMAS

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS EN
ECOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

SANTIAGO RAMOS CARREÑO

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA, MEXICO. JULIO DE 2010.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS

MAESTRIA EN ECOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA

MECANISMOS DE INFECCIÓN DEL VIRUS DE LA MANCHA BLANCA (WSSV) EN

CAMARÓN *Litopenaeus vannamei* EXPUESTO A SALINIDADES EXTREMAS

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS EN

ECOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

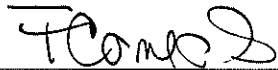
SANTIAGO RAMOS CARREÑO

Aprobada por:



Dra. Ivone Giffard Mena

Director de tesis



Dr. Francisco Correa Sandoval

Sinodal



Dr. Zaúl García Esquivel

Sinodal

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis ha sido posible al apoyo de muchas personas, cada una ha aportado algo: sus conocimientos, su trabajo, su ayuda. Es imposible nombrarlas a todas en este espacio, pero mi sentimiento de profunda gratitud va dirigido a cada una de ellas.

A la Dra. Ivone Giffard M. por su confianza y soporte en todo momento durante la dirección de esta tesis. Al Dr. Francisco Correa S. y Dr. Zaúl García E., por sus comentarios al escrito final.

Al Dr. Luis E. Paredes por todo su apoyo y enseñanzas en el laboratorio durante el desarrollo de mi tesis.

Al gran equipo de trabajo que me brindó su apoyo durante los bioensayos, sin importar la fecha, hora y condiciones del clima: Miki Takayama, Ricardo Valencia, Renne J. Cazares, Jerónimo Ávila, Estrella Córdoba, Verónica Palacios, Jennifer Chong, Jazmín Castro.

Se agradece la cooperación de los laboratorios de postlarvas y las granjas de cultivo de camarón de San Felipe, Mexicali, La Paz, y Mazatlán por el acceso a las instalaciones y los organismos donados.

Una gratitud especial para quienes brindaron su apoyo y facilitaron el uso de instalaciones para el cultivo y mantenimiento del camarón; Ocean. Carlos Granados, Ocean. Raul, Yepiz, Dr. Eugenio Carpizo, Ocean. Víctor Gendrop, Dr. Gabriel Correa, Ocean. Alfredo Salas, MC Conal Donald True y su equipo de trabajo.

A tod@s mis compañer@s y amig@s del Laboratorio de Ecología Molecular "Dr. Jorge De la Rosa Vélez" quienes me brindaron su cariño, compañía y ánimo en todo momento.

Finalmente al CONACyT por la beca otorgada para mis estudios.

RECONOCIMIENTO

Esta tesis se realizó con financiamiento del Programa de Mejoramiento del Profesorado (PROMEP), a través del proyecto PROMEP/130.5/08/3203 dirigido por la Dra. Ivone Giffard Mena.

DEDICATORIA

A mi familia en el sentido más amplio, por estar siempre a mi lado respaldándome en todos mis proyectos y confiar siempre en mí.

Mis padres; Martín A. Ramos y Aurelia Carreño V.

A todos mis hermanos; Socorro, Luz Elena, Ángel e Hilda Ramos Carreño, pero especialmente a quienes han sido mis patrocinadores: Cipriano y Adriana Ramos Carreño.

A mi gran amigo y también patrocinador Stuart Loomis por su gran apoyo y valiosos consejos.

¡Gracias por todo su sustento y cariño!

CONTENIDO

RESUMEN	III
ABSTRACT	IV
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	7
3. OBJETIVOS	13
3.1 Objetivo general.....	13
3.2 Objetivos específicos.....	13
4. HIPOTESIS	14
5. MATERIALES Y MÉTODOS	15
5.1 Recolección de muestras en campo	15
5.2 Obtención de organismos para bioensayos y diseño experimental	15
5.3 Bioensayo de patogenicidad.....	18
5.3.1 Preparación del inóculo viral de WSSV	18
5.3.2 Proceso de infección	19
5.4 Extracción de ácidos nucleicos.....	22
5.4.1 Extracción de ADN	22
5.4.2 Extracción de ARN	23
5.4.3 Detección de WSSV por PCR	24
5.4.4 Electroforesis y visualización de ADN	26
5.5 Clonación y secuenciación para cuantificación de WSSV	26
5.6 Transcripción Reversa (RT) para analizar TSV y YHV	27

5.7 Transcripción Reversa y PCR cuantitativa (RT-QPCR).....	28
5.7.1 Análisis de datos por Q-PCR.....	29
5.8 Análisis estadístico	31
6. RESULTADOS	32
6.1 Diagnostico de virus en granjas del Valle de Mexicali y San Felipe	32
6.2 Mantenimiento de organismos en cultivo.....	32
6.3 Signos clínicos y mortalidad	34
6.4 Respuesta de la capacidad osmoreguladora ante la infección viral	37
6.5 Expresión génica de WSSV-VP664.....	41
7. DISCUSIONES	46
7.1 Consideraciones finales.....	62
8. CONCLUSIONES	65
9. RECOMENDACIONES.....	68
10. REFERENCIAS	69

RESUMEN

El virus de la mancha blanca (WSSV) tiene amplia distribución en el mundo y es considerado el más patógeno para camarones peneidos, ha generado daños devastadores y pérdidas millonarias para la industria camaronícola nacional e internacional. Algunas investigaciones sobre el tema se han enfocado en el estudio de los efectos del WSSV en condiciones de baja salinidad y agua de mar, arrojando resultados contradictorios y dejando a un lado el conocimiento sobre las respuestas del hospedero en condiciones hipersalinas (> 34 ppt). Este estudio se enfocó en determinar el efecto del WSSV en *Litopenaeus vannamei* aclimatado a diferentes condiciones de salinidad (5, 15, 28, 34 y 54 ppt). En bioensayos de infección se analizó la sobrevivencia, la respuesta osmoreguladora y se determinaron los niveles de expresión viral del gen VP664 mediante PCR en tiempo real (Q-PCR). Los resultados señalan que en baja y alta salinidad (5 y 54 ppt) los organismos son más susceptibles al virus, presentando mejores sobrevivencias en salinidades de 15 y 28 ppt cercanas al punto iso-osmótico (el cual fue de 727.5 mOsmol Kg⁻¹, 24.7 ppt). La exposición aguda genera cambios sobre la presión osmótica de la hemolinfa ocasionando un estado de hipo-osmoregulación en baja salinidad (5 y 15 ppt) y un proceso de hiper-osmoregulación en alta salinidad (28, 34 y 54 ppt), lo cual es opuesto al comportamiento normal. Se observó un incremento exponencial de transcritos de VP664 a las 24 horas post-infección (hpi), con un decaimiento posterior en 28 y 54 ppt mientras que en 5, 15 y 34 ppt se mantienen niveles elevados hasta el final del experimento (48 hpi). Las diferencias observadas en los niveles de expresión de transcritos de VP664 en *L. vannamei* se atribuyen a los cambios de salinidad; puesto que esta interviene en los procesos de osmoregulación, proponemos que existen modificaciones del mecanismo de patogenicidad en relación a la salinidad.

Palabras claves: salinidad, osmoregulación, presión osmótica, expresión de genes, VP664.

ABSTRACT

The White Spot Syndrome Virus (WSSV) has a worldwide distribution and is considered the most pathogenic virus for penaeid shrimps. It has generated devastating damages and millionaire losses to national and international industry. Research on the physiology of response to WSSV infection has taken into account the issue of salinity with contradictory results. The experimental designs have precluded the hyper saline range (> 34 ppt), focusing on low salinity conditions. The objective of this work was to analyze the response to WSSV exposure in *Litopenaeus vannamei* acclimatized to salinities which encompass a broad range of values (5, 15, 28, 34 and 54 ppt). Survival was evaluated by infection assays where the osmoregulatory response and viral expression levels of VP664 were determined by real time PCR. Results indicate that susceptibility increased in the extreme values of the range (5 y 54 ppt), with higher survival rates at 15 and 28 ppt, which are the salinities close to iso-osmotic point (24.7 ppt, 727.5 mOsmol.Kg⁻¹). Acute exposition to the virus induced changes on hemolymph osmotic pressure, with specimens becoming hypo-osmoregulators at salinities of 5 and 15 ppt, and hyper-osmoregulators at higher values which is opposite to regular behavior. All the salinities induced a dramatic increase in the amount of VP664 transcripts 24 hours post-infection (hpi), but such amount varied according with salinity: it either persisted at 5, 15 y 34 ppt until the end of experiment (48 hpi), or decayed (28 and 54 ppt). Salinity plays a key role in osmoregulation, and the results of this study showed that differences in salt concentration caused distinct patterns of VP664 expression. The ways in which salinity modulate the mechanisms of pathogenicity are foreseen as a challenge for future research.

Key words: salinity, osmoregulation, osmotic pressure, gene expression, VP664.

1. INTRODUCCIÓN

En las tres últimas décadas la industria acuícola ha logrado un progreso extraordinario con una tendencia a incrementar su desarrollo en los próximos años adquiriendo un mayor avance y tecnificación de los sistemas de cultivo (Rosenberry, 2001). El suministro de productos aportados por la acuicultura ha compensado con creces los efectos del estancamiento de la producción de la pesca de captura y crecimiento de la población. Este aumento sigue siendo más rápido que el logrado en cualquier otro sector de producción de alimentos de origen animal. En promedio mundial, la tasa media de crecimiento de este sector desde 1970 ha sido del 8.8 % al año, mientras que, durante el mismo período, la pesca de captura ha crecido únicamente a razón del 1.2 % y los sistemas de producción de carne de cría en tierra un 2 % (FAO, 2007).

La tendencia actual en la acuicultura es lograr el mayor rendimiento incrementando la producción mediante la intensificación de los sistemas de producción para satisfacer la demanda de productos y lograr cultivos más rentables. En consecuencia, esto provoca que se generen condiciones adversas en los sistemas de cultivo, que llegan a estresar a los organismos y favorecen el desarrollo de enfermedades (fúngicas, bacterianas y virales). Esto ha ocasionado en algunos casos altas mortalidades, cosechas antes de tiempo y como resultado provocan importantes pérdidas económicas, así como un

impacto negativo al ambiente (Gjedren, 2003; De la Rosa-Vélez, 2006; Morales, 2007).

El problema más serio al que se enfrenta el sector acuícola son las enfermedades provocadas por patógenos, estos se dispersan a nuevas zonas geográficas a través de movimientos transfronterizos mediante la comercialización de los organismos de cultivo. Una vez que estos patógenos se establecen, son casi imposibles de erradicar (Alday de Graindorge *et al.*, 2002; Briggs, 2005). En el caso de América Latina la camaronicultura emergió como una industria altamente competente y de gran crecimiento, sin embargo, los brotes de enfermedades debidas a epizootias principalmente virales han ocasionado un impacto económico serio a los países afectados (De la Rosa-Vélez, 2006; Morales, 2007). Muchos virus fueron introducidos de otras regiones y actualmente forman parte de la biota de estos lugares.

Entre las enfermedades de origen viral más importantes que afectan al camarón están; el Virus de la Necrosis Hipodérmica Hematopoyética Infecciosa (IHHNV), Virus del Síndrome de Taura (TSV), Virus de la Cabeza Amarilla (YHV) y el Virus de la Mancha Blanca (WSSV). El WSSV ha sido introducido a muchos países, se detectó por primera vez en 1992 en Taiwán en *Penaeus monodon* (Chou *et al.*, 1995), para 1993 ya se encontraba en China y Japón (Takahashi *et al.*, 1994; Huang *et al.*, 1995). Entre 1998 y 2000 se diseminó en América Latina (Magbanua *et al.*, 2000; Bondad-Reantaso *et al.*, 2001; Hossain *et al.*, 2001; Rosenberry, 2001; Wu *et al.*, 2001), impactando fuertemente a

Ecuador en 1999, se estimaron pérdidas de aproximadamente 280 millones de dólares durante los primeros seis meses de su primera aparición entre abril y octubre (Alday de Graindorge y Griffith, 2000), en el caso de México se registró su presencia entre 1999–2000 (Bondad-Reantaso *et al.*, 2001). Las posibles causas de diseminación del virus fueron debido a intercambios de camarón para cultivo entre los diferentes países y comercialización de camarón congelado infectado (Lightner *et al.*, 1997; Durand *et al.*, 2003). El WSSV es considerado uno de los agentes virales más importantes que afectan al cultivo de camarón e infecta a todos los peneidos cultivados (Lightner, 1996; Flegel, 1997). En bioensayos de infección se ha demostrado que es altamente virulento, llegando a provocar mortalidades del 100% en los animales experimentados (Sahul *et al.*, 2001). Diversos estudios han reportado la existencia de variantes geográficas. Para el caso de México se sugiere que al menos existen dos variantes genéticas (Galavíz-Silva *et al.*, 2004) y que muchos de los brotes han sido causados por diferentes aislados de WSSV, sin embargo las diferencias en virulencia también podrían corresponder a diferencias en susceptibilidad de los crustáceos.

El WSSV es de tipo baciliforme con cubierta viral no ocluida, los viriones intactos con cubierta miden entre 210 y 380 nm en longitud y 70-167 nm en anchura máxima (Escobedo-Bonilla *et al.*, 2008). Un apéndice semejante a una cola en un extremo del virión se observa algunas veces en micrografías electrónicas teñidas negativamente (Durand *et al.*, 1996) (Fig. 1). La envoltura

viral es de 6-7 nm de grosor y presenta membrana lipídica trilaminar con dos capas electrón- transparentes dividida por una capa electrón-opaca (Escobedo-Bonilla *et al.*, 2008). Posee un genoma con una molécula circular de DNA de doble cadena con un tamaño de 305,107 bp (Wang *et al* 1995; Yang *et al.*, 2001).

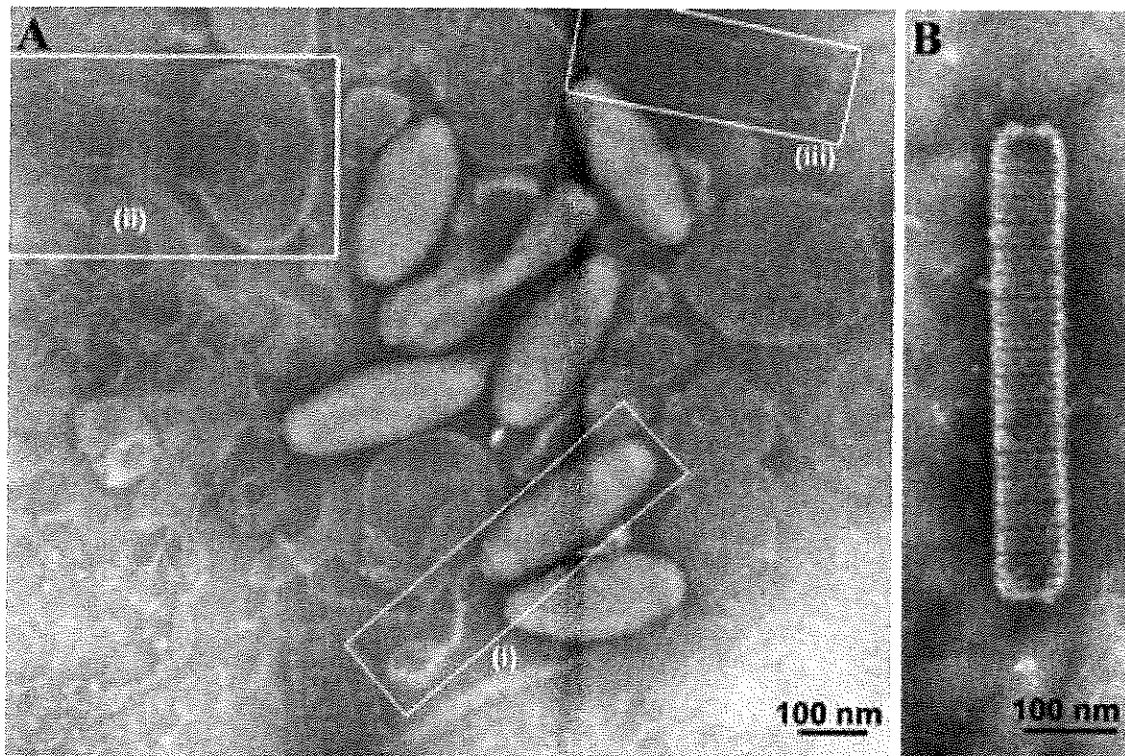


Figura 1. Micrografía electrónica de viriones de WSSV purificados. (A) Los contornos en blanco indican (i) un virión maduro completo con una cola característica, (ii) un virión maduro roto con más que la mitad de la nucleocapside expuesta fuera de la envoltura y (iii) una nucleocapside madura completamente expuesta. (B) Nucleocapside inmadura, desnuda antes de ser envuelta. (Tomada de Leu *et al.*, 2005).

Los organismos infectados con WSSV presentan síntomas como letargia, nado errático, anorexia, coloración rosácea o rojiza y manchas blancas en el caparazón (Yoganandhan *et al.*, 2003). Sin embargo, las manchas blancas características de la enfermedad no son observadas en algunos crustáceos de agua dulce infectados, (Jiravanichpaisal *et al.*, 2001, Sahul *et al.*, 2001). A pesar de la alta patogenicidad del WSSV para camarones peneidos, se han reportado diferencias en la susceptibilidad al virus en diferentes especies de crustáceos (Sahul *et al.*, 2000; Sahul *et al.*, 2001; Lightner *et al.*, 1998). Otros camarones silvestres (*Metapenaeus dobsoni*, *Parapenaeopsis stylifera*, *Solenocera indica* y *Squilla mantis*) o de agua dulce (*Macrobrachium rosenbergii*) son asintomáticos y portadores del WSSV (Shahadat *et al.*, 2001). El virus también ha sido detectado en cangrejos marinos sanos como *Charybdis annulata*, *C. cruciata*, *Macrophthalmus sulcatus*, *Gelasimus marionis nitidus* y *Metopograpsus messor*.

Tradicionalmente el camarón marino se cultiva en áreas costeras o estuarinas (Davis *et al.*, 2004). Las tres principales especies para cultivo son *Litopenaeus monodon*, *L. chinensis* y *L. vannamei*, estas rebasan el 75% de la producción acuícola de camarón. El camarón blanco *L. vannamei* es nativo del Pacífico de México, Centro y Sudamérica, hasta Perú, en áreas donde la temperatura del agua es mayor a los 20 °C a lo largo del año (Briggs *et al.*, 2005). Es la especie de elección de la industria camaronicola en el hemisferio occidental. Se encuentra en aguas con un amplio rango de salinidad que van desde 1 a 40 ppt (partes por mil). La mayor parte del cultivo se desarrolla en

salinidades por arriba de 15 ppt. Sin embargo, dada la alta tolerancia de *L. vannamei* a la baja salinidad y la disponibilidad de postlarvas a lo largo de todo el año se han desarrollado cultivos tierra adentro en áreas donde se dispone de agua con estas características (2-6 ppt) (Jory, 1999; Davis *et al.*, 2004). Colima y Baja California han logrado buenos resultados con cultivo de camarón en agua de baja salinidad (Giffard-Mena y Martínez, 2003).

En México, los pocos estudios formales sobre WSSV están encaminados a su diagnóstico en granjas costeras y en poblaciones silvestres. Se ha detectado en camarones cultivados, jaibas, cangrejos y copépodos asociados a granjas ubicadas en Sinaloa, Nayarit y Sonora (López-Félix, 2002; Méndez-Payán, 2003; Vega-Pérez, 2003). Su prevalencia ha sido reportada en las costas de Sinaloa (Mijangos-Alquisires, 2002). Sin embargo, son escasas las investigaciones sobre WSSV y su interacción con los factores ambientales. Hasta el momento, no existen trabajos publicados sobre los efectos en alta salinidad y la patogenicidad del WSSV.

2. ANTECEDENTES

Las variables fisicoquímicas del agua como temperatura, pH, salinidad y amonio entre otros, tienen un efecto sobre el crecimiento y sobrevivencia de los organismos acuáticos. La salinidad es uno de los parámetros que más influyen sobre distintos procesos fisiológicos como la osmoregulación. Los cambios en los niveles de salinidad modifican la velocidad de crecimiento, la tasa de mortalidad, los niveles en el consumo de oxígeno (Péqueux, 1995), generan cambios en la composición iónica de la sangre, desencadenan cambios en el tipo y concentración de enzimas e incluso resultan en cambios morfológicos de ciertos órganos como las branquias o el hepatopáncreas (Charmantier *et al.*, 1989; Palacios *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2008).

Diversos autores han estudiado el efecto de la salinidad sobre el desarrollo de camarones en agua de baja salinidad (McGraw *et al.*, 2002; Saoud *et al.*, 2003). Se ha encontrado que hay una relación entre el tiempo de aclimatación a la salinidad y la sobrevivencia en juveniles de *L. vannamei*, estableciéndose que el periodo de aclimatación es un factor crítico para su sobrevivencia a bajas salinidades, y que ésta puede ser incrementada extendiendo el tiempo de aclimatación de 48 a 72 horas (McGraw y Scarpa, 2004). También se ha evaluado el efecto de diferentes concentraciones acuosas de K^+ y Mg^{+2} sobre la sobrevivencia, crecimiento y respiración de juveniles de *L. vannamei*: los resultados sugieren un costo energético

potencialmente alto asociado con la disminución de concentraciones acuosas de Mg^{+2} que son comunes en ambientes de baja salinidad, bajos niveles de estos iones reducen la sobrevivencia y el crecimiento (Roy *et al.*, 2007).

Rosas *et al.* (2001) describieron que juveniles de esta especie expuestos a 40 ppt tienen mayor demanda energética. Li *et al.* (2007a) sugieren que la salinidad óptima para el crecimiento de *L. vannamei* está alrededor de 20 ppt, fuera de este valor los organismos presentan menor sobrevivencia y crecimiento debido a un mayor gasto energético en la osmoregulación. Para explicar el efecto de la salinidad sobre la fisiología de los camarones se ha propuesto determinar su capacidad osmoreguladora (CO). Esta fue definida por Charmantier *et al.* (1989) como la diferencia entre la presión osmótica de la hemolinfa y del medio externo a una salinidad dada.

El trabajo osmótico de un organismo es mínimo cuando el medio externo y los fluidos corporales están en equilibrio. Bajo condiciones iso-osmóticas usualmente se obtienen las mayores sobrevivencias (Panikkar, 1968) y crecimiento, debido a que los organismos invierten una cantidad de energía mínima en regulación osmótica (Le Moullac y Haffner, 2000). La regulación osmótica en el camarón es un proceso fisiológico que determina su distribución bajo diferentes salinidades (Vargas-Albores y Ochoa, 1991). Los peneidos se caracterizan por su capacidad de osmoregular en un amplio intervalo de salinidades, se comportan como hiper-reguladores en medios con baja salinidad y hipo-reguladores en alta salinidad (Fig. 2). En el caso de *L. vannamei* Bückle

et al. (2006) encontró que hiper-regula entre 10 y 20 ppt e hipo-regula entre 20 y 40 ppt.

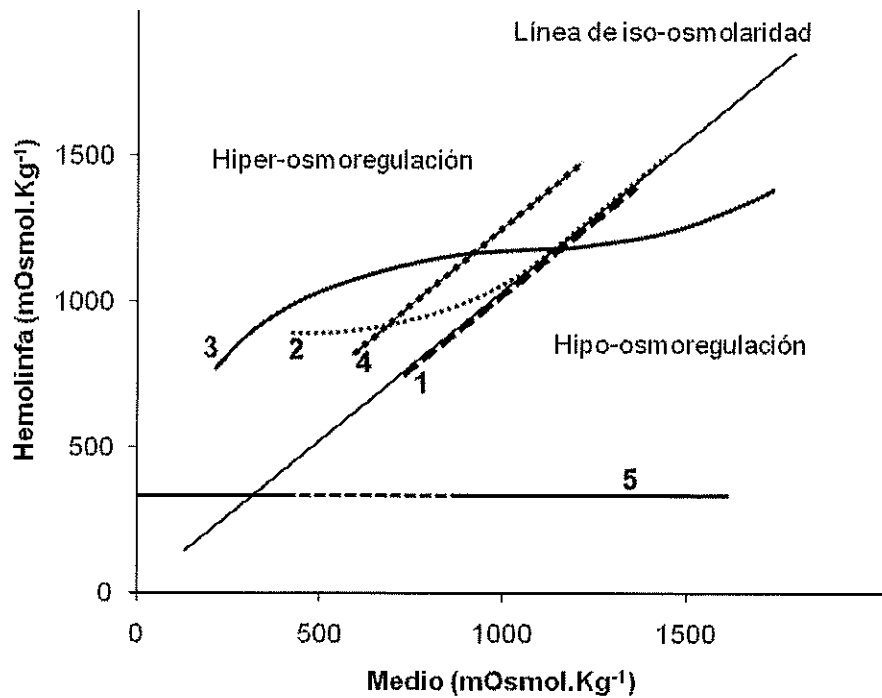


Figura 2. Tipos de osmoregulación en crustáceos. (1) Iso-osmótica; (2) hiper-osmótica; (3) hiper-hipo-osmótica (peneidos); (4) hiper-osmoconforme; (5) osmoregulación de peces eurihalinos (Modificada de Charmantier *et al.*, 2007).

El estudiar la condición fisiológica de los crustáceos mediante la CO sirve para evaluar el estado fisiológico de los camarones y, por lo tanto, predecir el efecto del estrés causado por las variaciones de los factores ambientales y los contaminantes. Así mismo es necesaria para determinar de manera precisa las condiciones óptimas para su cultivo (Lignot *et al.*, 1999, 2000; Brito *et al.*, 2000).

Lignot *et al.*, (2000) mencionan que la CO puede ser utilizada como un biomarcador en camarones peneidos, particularmente en estrés patológico para evaluar el efecto de infecciones virales, bacterianas y fúngicas sobre el proceso de osmoregulación. Por lo cual sería factible usarla como un indicador temprano de enfermedades de rápida propagación.

La dinámica de ocurrencia de patógenos en sistemas acuáticos está ampliamente modulada por parámetros ambientales tales como salinidad y temperatura (Jiménez *et al.*, 2000). Se ha observado que camarones infectados con WSSV han tenido sobrevivencias del 100% en condiciones de hipertermia (Vidal *et al.*, 2001). Joseph y Philip (2007) al someter a *Penaeus monodon* al WSSV con estrés salino, observaron una mayor susceptibilidad a la infección a baja salinidad (0 ppt), esto asociado a bajo nivel de parámetros relacionados con la hemolinfa (cuenta total de hemocitos, fosfatasa alcalina y fenoloxidasa) que están involucrados en la tasa de sobrevivencia observada. Se considera que los cambios de salinidad extrema inducen alteraciones en el metabolismo de la hemolinfa y las variables inmunes, estos cambios afectan la inmunocompetencia e incrementan la susceptibilidad al virus (WSSV) particularmente a baja salinidad.

Liu *et al.* (2006) para observar el efecto de la salinidad a la resistencia de WSSV en *Fenneropenaeus chinensis*, sometieron camarones con WSSV latente a dos cambios extremos de salinidad (de 22 a 18 y 14 ppt en una hora respectivamente). El recuento de hemocitos total del grupo expuesto no reveló

ninguna diferencia evidente con los cambios de salinidad pero el índice de la fenoloxidasa declinó. Los resultados mediante PCR en tiempo real indicaron que la carga viral fue tres veces más alta en el grupo expuesto a 14 ppt respecto al grupo control 22 ppt, sin embargo no hubo diferencias significativas entre 22 y 18 ppt. Por lo tanto, los cambios de salinidad sobre un intervalo de variación pueden resultar en un decremento de inmunocompetencia y la proliferación de WSSV en *F. chinensis* permitiendo al WSSV pasar de una infección latente a una aguda.

Los análisis de expresión que involucran genes asociados a funciones importantes en el desarrollo de una infección, permiten obtener información sobre la velocidad y grado de propagación dentro del huésped. Rout *et al.* (2005) mencionan que el nivel de transcritos de una proteína en un tejido en particular puede ser utilizado para estimar la acumulación de partículas virales, principalmente de los mRNAs que codifican para proteínas estructurales que son abundantes.

La VP664 (o wsv360 como nombre alternativo propuesto por Li *et al.*, 2007b) es una de las proteínas de mayor tamaño de la nucleocapsida de WSSV con una masa molecular de 664 kDa (Tsai *et al.*, 2004; Leu *et al.*, 2005). Diversos estudios han permitido conocer su función durante el proceso de infección del WSSV. Leu *et al.* (2005) analizaron los perfiles de expresión de transcritos de VP664 en camarones adultos de *Penaeus monodon* en varios estados de infección con WSSV a través del tiempo (0, 2, 4, 6, 8, 12, 18, 24 y

36 horas postinfección hpi) mediante RT-PCR. Sus resultados revelaron que pequeñas cantidades de transcritos de VP664 son detectados a las 2 hpi y los niveles de expresión permanecen sin cambio hasta las 8 hpi. Posteriormente la cantidad de VP664 incrementa dramáticamente a las 12 hpi y continua incrementando hasta el final del análisis (36 hpi), resultados similares fueron registrados para el gen *dnapol* y VP28. Por su parte Tsai *et al.*, (2004) mediante análisis de microarreglos evaluaron niveles de expresión de genes de proteínas de WSSV en *P. monodon* usando un inóculo aislado de Taiwán, y basándose en las similitudes de sus patrones de expresión sobre el curso de la infección agrupó los genes por tener un rol similar en el proceso de infección. El grupo de genes constituidos por VP110, VP180, VP38B, VP60B, VP136B y VP664 presentaron bajos niveles de las 2 a las 18 hpi seguido por un aumento exponencial a las 24 hpi y posteriormente una caída al final del proceso de infección (36 hpi).

En el presente estudio, la investigación se enfocó a determinar los efectos del virus de la mancha blanca (WSSV) en el camarón blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei* bajo diferentes condiciones de salinidad. Se evaluaron los efectos en la sobrevivencia, la repuesta osmoreguladora y se determinaron los niveles de expresión viral de transcritos de VP664 mediante técnicas moleculares. El objetivo fue determinar si existe alguna salinidad en la que se aumente el tiempo de sobrevivencia de los camarones.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Determinar cuáles son los mecanismos de expresión de la infección del virus de la mancha blanca (WSSV) en camarón blanco del Pacífico (*Litopenaeus vannamei*) expuesto a condiciones de salinidad extrema.

3.2 Objetivos específicos

- 1.- Evaluar la presencia del virus de la mancha blanca en zonas de cultivo de camarón blanco del Valle de Mexicali y San Felipe.
- 2.- Evaluar el tiempo de sobrevivencia de *L. vannamei* infectados con WSSV aclimatados a cinco salinidades 5, 15, 28, 34 y 54 ppt.
- 3.- Investigar el efecto que produce el WSSV sobre la presión osmótica de la hemolinfa en *L. vannamei*.
- 4.- Determinar los niveles de expresión de transcritos de VP664 del WSSV en camarones *L. vannamei* aclimatados a las diferentes salinidades mediante PCR en tiempo real.

4. HIPOTESIS

Camarones mantenidos a diferentes salinidades y expuestos al virus de la mancha blanca presentarán diferencias significativas en la mortalidad y niveles de expresión viral. Los cambios fisiológicos derivados del proceso de infección se verán reflejados en cambios de la capacidad osmoreguladora. La mayor sobrevivencia ocurrirá cerca del punto iso-osmótico.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Recolección de muestras en campo

Se realizaron dos muestreos (mayo y agosto de 2008) en granjas de cultivo de camarón blanco *L. vannamei* en Baja California, una localizada en la zona del Valle de Mexicali y otra en San Felipe, estas zonas fueron seleccionadas para el estudio porque utilizan para el cultivo de camarón agua de baja salinidad (1-2 ppt) y agua de mar (>40 ppt) respectivamente. En cada granja se realizaron observaciones generales del estado del cultivo y se recolectaron de 50 a 100 organismos por estanque (al menos un estanque por granja) conservándose en etanol grado molecular al 95% o Trizol[®] (Invitrogen, EUA) para la extracción de ácidos nucleicos (ADN y ARN), esto con la finalidad de realizar el análisis para la búsqueda de virus WSSV, IHNV, YHV y TSV mediante PCR de punto final (ver detalles de los procedimientos más adelante).

5.2 Obtención de organismos para bioensayos y diseño experimental

Para realizar los bioensayos de infección se obtuvieron postlarvas (PL) de *L. vannamei* (PL15-20) de un laboratorio de larvicultura localizado en La Paz Baja California, México. Las PLs fueron mantenidas en el Laboratorio de Acuicultura (Facultad de Ciencias Marinas de la Universidad Autónoma de Baja California) en estanques circulares de 10,000 litros con agua de mar (a 34 ppt,

28±1 °C, 5.0-8.0 mg/L O₂) durante aproximadamente tres meses. Los camarones fueron alimentados con pellet comercial Camaronina 35% (Agribands Purina, Ciudad Obregón, Sonora, México) mediante dos raciones diarias al 3% de la biomasa total, hasta que alcanzaron la etapa juvenil. Los juveniles con un peso húmedo medio de 4.9 ±0.13 gramos fueron distribuidos en grupos de 120 organismos en cinco estanques circulares de 500 L a 34 ppt, con aireación constante (5.0-8.0 mg/L) y temperatura de 28 ± 0.5 °C mantenida con calentadores de titanio (SAH 150 W SUNNY). Cuatro de los cinco estanques se aclimataron de manera gradual a la salinidad requerida para las condiciones experimentales: 5 y 15 ppt, donde los organismos estuvieron en un medio hipo-osmótico; 34 y 54 ppt, en la que estuvieron en un medio hiper-osmótico y 28 ppt, como el punto isosmotico de *L. vanname* (Bückle, *et al.*, 2006), el grupo de 34 ppt permaneció sin cambio.

Para obtener el agua con la salinidad deseada se realizaron diluciones de agua de mar (34 ppt) con agua dulce de la llave y declorinada mediante aireación y carbón activado. El agua hipersalada (54 ppt) se obtuvo adicionando sal marina al agua de mar. Ambos tipos de agua fueron pasadas por sistema de filtración de cartucho de 5 µm. La aclimatación se realizó de manera gradual en los tanques reduciendo y aumentando la salinidad en cada caso a una tasa de 4 ppt por día hasta alcanzar las salinidades requeridas (5, 15, 28 y 54 ppt). Una vez alcanzada la salinidad requerida (siete días), se mantuvo a los organismos en esas condiciones durante 3 días para su completa aclimatación. Durante

todo el experimento se manejó un fotoperiodo natural de 14 horas luz: 10 horas de oscuridad.

Una vez que estos camarones fueron aclimatados, se transfirieron al Laboratorio de Patología Experimental Acuícola (LPEA) en acuarios (dimensiones de 74 L x 30 A x 29 H) conteniendo 55 litros de agua, colocando 18 camarones en cada uno y manteniendo la misma salinidad de aclimatación donde se encontraban (5, 15, 28, 34 y 54 ppt). El agua de mar usada para los acuarios fue pasada por sistema de filtración de 25, 10 y 5 μm y esterilizada por luz UV. Cada acuario contó con sistema de aireación por difusión y sistema de recirculación de agua independiente mediante filtros de carbón activo. El bioensayo se desarrolló en dos áreas experimentales; una para el grupo control y otra para el grupo infectado.

En el área de infección cada tratamiento (5, 15, 28, 34 y 54 ppt) contó con tres repeticiones (R1, R2 y R3) y el área control con dos repeticiones (R1 y R2) la R3 del área de infección y R2 del área control fueron para analizar sobrevivencia. Diariamente se midió la salinidad de cada acuario con un refractómetro YSI (modelo 55/25, Incorporated Yellow Springs Ohio, USA) y la salinidad optima se ajustó con un ayuda de osmómetro de presión de vapor (VAPRO®, Modelo 5520 Wescor Inc. España). Para mantener la calidad del agua, se efectuaron recambios del 20% del volumen total de agua de los acuarios, heces y alimento no consumido fueron removidos, estos y todos los

desechos fueron tratados con cloro a 1600 ppm y neutralizados con tiosulfato de sodio a 872 ppm.

Los parámetros fisicoquímicos del agua para las condiciones experimentales fueron: temperatura de 28 °C como adecuada para esta especie (Bückle, et al., 2006); oxígeno disuelto 5.0–8.0 mg/L; pH 7.5 ± 0.5 ; amonio total menos que 0.5 mg/L. Los camarones fueron aclimatados por tres días más en los acuarios para observar su comportamiento hasta el momento de iniciar el experimento.

5.3 Bioensayo de patogenicidad

5.3.1 Preparación del inoculo viral de WSSV

El inoculo viral de WSSV (clave interna WSSV-SON-FCM-07) proveniente de la Universidad de Sonora se activó en dos ocasiones (F1 y F2) en camarones juveniles sanos de *L. vannamei*, en los cuales previamente se confirmó estuvieran libres de WSSV, IHHNV, YHV y TSV mediante PCR de punto final con iniciadores específicos (tabla I). Una vez infectados los camarones (procedimiento descrito en la sección siguiente) se colectaron los organismos moribundos con síntomas de la infección, éstos se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -75 °C.

El inóculo para el experimento fue preparado de acuerdo a lo sugerido por Prior *et al.* (2003) a partir de camarones de la F2, para esto se pesaron 25 mg de branquias de cuatro camarones positivos a WSSV, el tejido se homogenizó (1:10 p/v) en amortiguador TN (200 mM de Tris-HCl, 400 mM de NaCl, pH 7.4). El homogenizado se centrifugó a 1800 g por 20 min a 4 °C, una segunda centrifugación a 3000 g por 20 minutos a 4 °C fue realizada. El sobrenadante fue recuperado en tubo estéril y filtrado por 0.45 µm, se mantuvo en frío (4 °C) y fue usado para infectar los camarones experimentales. Se preparó un inóculo para los controles negativos (camarones no infectados con el virus) de la misma manera solo que para esto se usaron camarones libres de WSSV.

5.3.2 Proceso de infección

Con la finalidad de evaluar la concentración mínima de inóculo para infectar a los camarones y que pudiera evaluarse la mortalidad, se realizaron pruebas previas para observar el efecto “salinidad vs dilución” sobre la resistencia de WSSV en *Litopenaeus vannamei*. Para esto se usaron camarones aclimatados a salinidades de 1, 15, 28, 34 y 50 ppt y distribuyendo 12 organismos para cada tratamiento por triplicado, fueron inyectados intramuscularmente con 20 µL de inóculo en el segundo segmento abdominal con jeringa de insulina y aguja de 31G X 13 mm utilizando diluciones de 10^{-1} ,

10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} del inóculo viral. Se registró la mortalidad con la finalidad de evaluar si existe una relación entre la salinidad y la dilución que promueva un mayor tiempo de sobrevivencia de los organismos. Con base en este análisis preliminar se seleccionó la dilución de 1×10^{-5} que resultó en una mortalidad del 100% en 88 hpi promedio con respecto a la dosis más alta (10^{-1}) la cual produjo una mortalidad del 100% en 40 hpi.

Los bioensayos de patogenicidad se realizaron con los camarones aclimatados a las diferentes salinidades utilizando una solución stock diluida a 1×10^{-5} a partir del inóculo viral puro. Esta dilución tenía una concentración de 650 copias/ μ L de inóculo determinadas por PCR en tiempo real, de este stock se inyectaron intramuscularmente 20 μ L a cada individuo en el segundo segmento abdominal con jeringa de insulina y aguja de 31G X 13 mm. Se procedió de la misma manera con el grupo control utilizando el inóculo libre de WSSV.

Los camarones infectados con WSSV fueron colectados al azar en periodos de tiempo pos-infección determinados (6, 12, 24, 36 y 48 horas) e inmediatamente congelados en nitrógeno líquido y conservados a -75° C. En el área de infección se colectaron dos organismos completos por cada tratamiento en las repeticiones R1 y R2 y en el área control se muestreo una repetición (R1) para cada tratamiento en cada tiempo de muestreo.

Para analizar el efecto de estrés en los camarones provocado por la condición patológica de WSSV sobre la capacidad hipo e hiper-osmoregulatoria durante el proceso de infección, se midió la presión osmótica (PO) de la hemolinfa en cada organismo muestreado para cada salinidad. La hemolinfa se extrajo del seno ventrolateral del abdomen usando una jeringa estéril de plástico de 3 mL (21 G X 32 mm); se realizó una punción a través de la membrana artrodial de la quinta pata (pereiópodo) para tener acceso al seno ventrolateral. Una muestra de 10 μ L de hemolinfa fue analizada con un osmómetro de presión de vapor VAPRO® (Modelo 5520 Wescor Inc. España), y también se midió la salinidad del medio externo. Los valores fueron expresados como mOsmol.Kg⁻¹. Antes de cada muestreo el equipo fue calibrado con estándares de 100, 290 y 1000 mOsmol.Kg⁻¹.

A partir de las 24 hpi los camarones fueron observados cada dos horas y se registraron anomalías en el comportamiento. Se cuantificó el porcentaje de mortalidad para cada salinidad y se determinó el nivel de expresión del gen que codifica para la proteína VP664 por PCR en tiempo real (Q-PCR) según se describe en los párrafos siguientes.

5.4 Extracción de ácidos nucleicos

5.4.1 Extracción de ADN

Para corroborar que efectivamente los camarones estuvieran infectados con el WSSV, se aisló el ADN genómico de los pleópodos y del tejido branquial de organismos infectados y colectados en estado moribundo durante las pruebas de infección. Por otro lado se emplearon pleópodos de camarones libres de WSSV como controles negativos. Se modificó el protocolo de purificación de ADN de Sambrook y Russell (2006). Esta modificación consistió en homogenizar 100 mg de tejido (conservado a -70 °C) con pistilo estéril en tubos eppendorf de 1.5 mL con 1000 µL de amortiguador de lisis SNET (20 mM Tris-HCl, pH 8.0; 5 mM EDTA, pH 8.0; 400 mM NaCl; 1 % SDS) y 10 µL de Proteinasa K (10 mg/mL). Las muestras fueron incubadas a 60 °C durante 2 h en agitación. Posteriormente se centrifugaron a 3000 *g* por 5 minutos, se recuperaron 750 µL del sobrenadante y se les adicionó un volumen igual de Fenol:Cloroformo:Alcohol isoamílico (25:24:1). Los tubos se incubaron en agitación durante 30 minutos a 30 °C, posteriormente se centrifugaron a 7500 *g* durante 5 min a temperatura ambiente. Se transfirieron 500 µL del sobrenadante a un tubo limpio de 1.5 mL. Para precipitar el ADN se añadieron 600 µL de isopropanol frío (-20 °C) mezclando suavemente, posteriormente fueron centrifugados a 13250 *g* durante 15 min a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante y se lavó el pellet una vez con 1 mL de etanol al 70%. Las muestras se centrifugaron por 5 minutos a 7500 *g*, los pellets se secaron de 15

a 20 min a 30 °C y re-suspendieron en 100 µL de PPI (agua Milli-Q y libre de fosfatos), se mantuvieron a 60 °C por 30, minutos y se almacenaron a -20 °C hasta su uso para PCR.

5.4.2 Extracción de ARN

El ARN total fue extraído usando la técnica de TRIzol®. Este protocolo consiste en homogenizar 100 mg de tejido, en este caso branquial en 1 mL de Trizol con un pistilo (tratado con DEPC¹). Las muestras se incubaron 12 minutos a 30°C, se adicionaron 0.2 mL de cloroformo por cada 1 mL de TRIzol y se incubaron 3 minutos a 30 °C. Se centrifugaron a 12000 g por 15 minutos a 4 °C. El ARN total se precipitó con 0.5 mL de alcohol iso-propílico (-20 °C), se mantuvo a temperatura ambiente por 5 minutos y se centrifugaron a 12000 x g por 15 minutos a 4 °C. El pellet de ARN se lavó una vez con 1 mL de etanol frío (-20 °C) al 75%, y se centrifugó a 7500 g 5 minutos a 4 °C. El pellet se secó por 10 minutos a 30 °C y se re-suspendió en 50 µL de agua PPI e incubó por 10 minutos a 40 °C. El ARN fue tratado con DNasa I (Invitrogen™) para remover cualquier contaminación con ADN genómico. Los ARNs fueron almacenados a -75 °C hasta su uso posterior.

¹ DEPC: (Dietilpirocarbonato) compuesto que inactiva las ARNasas, reduciendo el riesgo de degradación del ARN.

Para evaluar el rendimiento de los ácidos nucleicos obtenidos (ADN y ARN) cada muestra fue cuantificada por espectrofotometría (NanoDrop ND-1000 LabTech); su pureza fue determinada considerando relaciones de absorbancia de 260/280. Alternativamente la calidad fue evaluada mediante electroforesis en geles de agarosa (ver sección 5.3.4).

5.4.3 Detección de WSSV por PCR

A partir del ADN se confirmó la presencia del WSSV en los organismos infectados mediante PCR en mezclas de reacción conteniendo: 10 ng de ADN, 3 mM de MgCl₂, 0.4 μM dNTPs (Promega, Southampton, UK), 0.4 μM de cada iniciador, 1 Unidad de Taq ADN polimerasa (PROMEGA), 1X amortiguador de reacción para PCR (20 mM Tris-HCl, pH 8.4; 50 mM KCl) (Invitrogen), en un volumen final de 25 μL. El perfil de amplificación fue; 5 min a 94 °C, seguido por 35 ciclos a 94 °C por 1 min, 30 segundos a 60.5 (VP24) y 66.5 (VP28) °C, 1 minuto a 72 °C, y un paso final a 72 °C por 7 min, en un termociclador Mastercycler gradient (Eppendorf AG, Hamburg, Germany).

Para la PCR fueron usados iniciadores específicos para proteínas de WSSV correspondientes VP28 (WSSV_VP28_F y WSSV_VP28_R, los cuales generan un producto de 533 pb. Un transcrito de β-actina para *L. vannamei* fue amplificado usando los iniciadores ACTINALVANN_F y ACTINALVANN_R (GenBank: AF300705.2) el cual genera un fragmento de 627 pb y sirve como

control interno para verificar la calidad de la amplificación de cada muestra analizada (tabla I).

Tabla I. Secuencias de iniciadores para detección de los virus de WSSV, IHNV, YHV, TSV y control interno de actina por PCR de punto final.

Nombre del Iniciador	Secuencia	Autor
WSSV_VP28_F	CGGCCATCCTCGCCATCACTG	Valencia, 2004.
WSSV_VP28_R	ATTTCCACCGGCGGTAGCTGC	Valencia, 2004.
IHNV_F: Caps F	AGTGATGCACTCGATGGTACC	De la Rosa, 2007.*
IHNV_R: Caps R	ACATCCCCAACTTGCGACAC	De la Rosa, 2007.*
YHV_16F_ORF2A_F	AAACACACTCCTCTTAGGTGCT	De la Rosa, 2007.*
YHV_16R_ORF2A_R	GATAGGTGATAGCCATTTTGC	De la Rosa, 2007.*
TSV-9195 F	TCAATGAGAGCTTGGTCC	Nunan <i>et al.</i> , 1998.
TSV-9992 R	AAGTAGACAGCCGCGCTT	Nunan <i>et al.</i> , 1998.
ACTINALVANN_F	ACCCCATCGAGCACGGCATCG	De la Rosa, 2007.*
ACTINALVANN_R	TGGTCTCGTGGATGCCGCAGG	De la Rosa, 2007.*

*Comunicación personal. Q.E.P.D

5.4.4 Electroforesis y visualización de ADN y ARN

La calidad e integridad física de los extractos de ADN y productos de PCR fueron evaluados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, en un sistema continuo a base de TBE 0.5x (89 mM Tris, 89 mM ácido bórico, 2 mM EDTA, bromuro de etidio 0.5 µg/ml, pH 8.3). La separación se realizó durante 30 min a 10 V/cm constantes. Para analizar la calidad del ARN la electroforesis se realizó en geles de agarosa desnaturizante usando TAE 1x (0.04 M Tris–acetato, 1 mM EDTA) con un gradiente de voltaje de 5 V/cm como describe Masek *et al.* (2005).

Los geles fueron visualizados mediante irradiación con luz ultravioleta en un transiluminador (T1202 Sigma Chemical company Kodak). El registro de resultados se realizó mediante fotografía digital (Cámara DC290 ZOOM Kodak).

5.5 Clonación y secuenciación para cuantificación de WSSV

El fragmento de ADN generado por PCR (69 pb) fue purificado usando el kit PureLink PCR Purification Kit (Invitrogen) y clonado en el vector pcDNA5/FRT/V5-His-TOPO® 5094 pb (Invitrogen). El plásmido se insertó en las células *E. coli* quimio-competentes según instrucciones del fabricante, estas se cultivaron en medio de cultivo LB con kanamicina (0.05 mg/mL). Un grupo de seis colonias de dos placas del agar fueron seleccionadas y amplificadas por

PCR para verificar el tamaño del inserto. Los productos de PCR fueron purificados y secuenciados unidireccionalmente con iniciadores M13-F y M13-R (Invitrogen) complementarios a la secuencia del vector para confirmar la secuencia del inserto de 69 pb.

Se realizó la extracción del plásmido con el tamaño correspondiente al inserto (69 pb) y se determinó su concentración y número de copias con un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (LabTech). A partir del tubo madre se realizaron diluciones seriadas (10^0 , 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 y 10^7) para elaborar la curva estándar para el PCR Tiempo Real.

5.6 Transcripción Reversa (RT) para analizar TSV y YHV

Los virus YHV y TSV fueron analizados a partir de ADN complementario (ADNc) debido a que son virus de RNA. Para esto se retro-transcribió una alícuota del ARN total en una reacción conteniendo: 1 μ L (500 ng/ μ L) de ARN, 1 μ L del iniciador oligo dT (0.5 μ g/ μ L), 1 μ L de dNTPs (10 mM) complementando el volumen a 12 μ L con agua PPI. Las muestras fueron incubadas por 5 minutos a 65 °C, enseguida se adicionaron 1 μ L (40 U/ μ L) de RNAsa out, 2 μ L (100 mM) de Dithiotreitol (DTT) y 4 μ L de 5x First Strand Buffer (todos productos de Invitrogen™). El ARN se incubó a 37 °C por 2 min y se agregó 1 μ L de enzima transcriptasa reversa M-MLV H (-) a 200 Unidades/ μ L (Invitrogen). Las muestras fueron incubadas por 60 minutos a 37 °C y la enzima

inactivada a 70 °C por 15 minutos. El ADNc se almacenó a -20 °C, hasta su uso en la PCR.

5.7 Transcripción Reversa y PCR cuantitativa (RT-QPCR)

Para estimar el nivel de transcritos de VP664 en los camarones infectados con WSSV a diferentes tiempos y salinidades, se realizó un análisis de RT-QPCR (Transcriptasa Reversa y PCR cuantitativa o bien PCR tiempo Real) de un solo paso OneStep (Applied Biosystems, Foster City, USA) a partir del RNA mensajero (mRNA). La amplificación se realizó en un termociclador StepOnePlus (ABI) y los datos se analizaron con el software versión 2.0 (ABI). La secuencia de los iniciadores y la sonda TaqMan usadas fueron las reportadas por Durand y Lightner (2002). Los iniciadores WSS1011F y WSS1079R generan un fragmento de 69 pb (tabla II). La sonda TaqMan fue sintetizada y marcada con 5-carboxyfluoresceina (FAM) sobre el extremo 5' y N,N,N',N'-tetrametil-6-carboxiroadamina (TAMRA) sobre el extremo 3', y fueron sintetizados por la compañía SEQXCEL, Inc. (San Diego, EUA).

El ensayo de RT-QPCR fue realizado con el kit TaqMan FG, Kit RGTS TQMN 1-step RT-PCR (Applied Biosystems, Foster City, USA) conteniendo AmpliTaq Gold DNA polymerase, AmpErase UNG, dNTPs con dUTP y componentes de buffer optimizados (ABI). La mezcla de reacción (2X) fue preparada en un volumen final de 15 µL conteniendo 1 µL de ARN total a 350

ng/ μ L (concentración final de 23.33 ng/ μ L), 0.3 μ M de cada primer y 0.15 μ M de la sonda Taqman. El programa de amplificación de la RT-QPCR se realizó como sigue: 30 min a 48 °C para la síntesis de ADNc (ADN complementario), activación de la AmpliTaq por 10 min a 95 °C, 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C y 1 minuto a 60 °C (Durand y Lightner, 2002). La región de amplificación para medir la expresión mediante q-PCR corresponde a una proteína de la nucleocápsida VP664 (Tsai *et al.*, 2004; Leu *et al.*, 2005).

Tabla II. Secuencias de los iniciadores y sonda TaqMan para la Q-PCR (Durand y Lightner, 2002).

Nombre del Iniciador	Secuencia
WSS1011F	5'-TGGTCCCGTCCTCATCTCAG-3'
Sonda TaqMan	5'-AGCCATGAAGAATGCCGTCTATCACACA-3'
WSS1079R	5'-GCTGCCTTGCCGGAATTA-3'

5.7.1 Análisis de datos por Q-PCR

Se determinó el nivel de expresión de la proteína VP664 mediante cuantificación absoluta por PCR en tiempo real (Q-PCR), para cada tratamiento de salinidad y tiempo pos-infección (6, 12, 24, 36 y 48 hpi) se analizaron 2

organismos de cada replica. Para cada ciclo de amplificación se generó una curva estándar a partir de diluciones del plásmido clonado y purificado de WSSV en un rango de 1×10^0 a 1×10^7 copias.ng⁻¹. El número de copias para las muestras desconocidas fue calculado con los datos generados del Q-PCR definiendo una línea base a 0.1 y por interpolación del ciclo umbral (C_T ⁴ = threshold cycle) con la curva estándar, usando el software del OneStepPlus (ABI). Las reacciones de amplificación incluyeron muestras de organismos infectados y camarones del área control. También se incluyeron reacciones de controles negativos (omitiendo ARN) en cada corrida. Cada muestra y sus controles fueron analizadas por duplicado. Una muestra fue considerada positiva solamente si el WSSV fue detectado en ambas réplicas. Se graficaron los niveles de expresión transformando los datos a logaritmo de base 10 (Log₁₀) para comparar los diferentes valores del número de copias de WSSV. El resultado final de transcritos fue expresado como la media del número de copias.ng⁻¹ de RNA total.

⁴ C_T (Threshold cycle) representa la cantidad de producto generado en determinado número de ciclo.

5.8 Análisis estadístico

Para determinar el efecto de la salinidad sobre la mortalidad, presión osmótica y los niveles de expresión de VP664 en *L. vannamei* se realizó un análisis de varianza de una vía con el programa Statistica versión 7.0 y se consideraron diferencias estadísticamente significantes (con $p \leq 0.05$). Para describir el efecto de la salinidad sobre la osmolaridad de la hemolinfa los datos de la presión osmótica fueron ajustadas con funciones polinomiales de 3^{er} orden (Zar, 1999). El punto iso-osmótico fue calculado en la intersección con la línea de iso-osmolaridad.

6. RESULTADOS

6.1 Diagnostico de virus en granjas del Valle de Mexicali y San Felipe

Mediante el análisis por PCR no se detectó la presencia de virus (WSSV, IHNV, YHV y TSV) en las granjas analizadas en las zonas del Valle de Mexicali y San Felipe durante el periodo de mayo-agosto de 2008. La salinidad registrada del agua en el Valle de Mexicali fue de 2 ppt y en San Felipe de 44 ppt para este periodo (datos no mostrados).

6.2 Mantenimiento de organismos en cultivo

Los camarones recibidos en etapa de PL y juveniles se mantuvieron en cultivo hasta su uso en el LPEA. Durante este tiempo se verificó que la temperatura y oxígeno estuvieran dentro de los valores establecidos para el experimento (27.5 ± 0.5 °C; 5 a 7 mg/L; pH 7.4 ± 0.54), el amonio total se mantuvo por debajo de 0.5 mg/L. Los cambios de salinidad durante el proceso de aclimatación no afectaron la sobrevivencia de *L. vannamei* en ninguno de los tratamientos experimentales (5, 15, 28, 34 y 50 ppt) teniendo el 100% de sobrevivencia hasta el inicio del proceso de infección. Se constató que los organismos mantenidos en alta salinidad (54 ppt) presentaron un nivel de actividad locomotora bajo con respecto a los organismos acondicionados a 5, 15, 28 y 34 ppt.

El peso final de los camarones que fueron aclimatados a 5, 15, 28, 34 y 54 ppt y 28 °C; y expuestos por 10 días en estas condiciones fue significativamente diferente ($p < 0.05$). El peso final de organismos aclimatados a 54 ppt fue significativamente diferente ($p < 0.05$) comparado a los tratamientos de 5, 15, 28 y 34 ppt, las medias del peso inicial y peso final para todas las salinidades se indican en la tabla III. El mayor crecimiento se registro para 34 ppt 6.1 ± 0.56 g, en 54 ppt no hubo crecimiento y se registro una diferencia negativa de 0.3 g respecto al peso inicial.

Tabla III. Peso inicial y peso final (media $\pm$ DS) de *Litopenaeus vannamei* mantenido en las cinco salinidades.

Salinidad (ppt)	Peso inicial (g)	Peso final (g)	Diferencia (g)
5	4.8 ± 0.10	5.5 ± 0.78^a	0.7
15	4.9 ± 0.13	5.7 ± 1.00^a	0.8
28	4.8 ± 0.10	5.2 ± 0.85^b	0.4
34	5.3 ± 0.20	6.1 ± 0.56^c	1.0
54	4.8 ± 0.11	4.5 ± 1.00^d	-0.3
*Peso g (media $\pm$DS)	4.9 ± 0.13	5.4 ± 0.60	
Coef. Variación	2.6%	11%	

Valores con diferente letra en la columna de peso final son significativamente diferentes ($p < 0.05$). DS= Desviación estándar. * Peso g considerando todos los tratamientos.

6.3 Signos clínicos y mortalidad

Los camarones infectados en forma experimental con el WSSV manifestaron los primeros síntomas de la enfermedad aproximadamente a las 24 hpi, observándose baja actividad locomotora, desorientación, nado errático y reducción en la ingesta de alimento. La cinética de mortalidad en las diferentes salinidades se presenta en la figura 3, en ella observamos que los camarones mantenidos en salinidades extremas (5 y 54 ppt) fueron afectados más rápidamente por el virus, ocurriendo las primeras mortalidades a las 26 y 35.5 hpi respectivamente, el 100% de mortalidad ocurrió a las 42 ± 1 hpi. En salinidades intermedias (15, 28 y 34 ppt) las primeras mortalidades se registraron entre 35.5 y 39.5 hpi con una mortalidad total a las 61, 56 y 49.5 hpi respectivamente. El tiempo de sobrevivencia de los camarones en estas salinidades fue significativamente más alto que los mantenidos en baja (5 ppt) y alta salinidad (54 ppt). Los camarones del tratamiento a 15 ppt tuvieron mayor tiempo de vida que los de 28 y 34 ppt con una diferencia de 5 y 10 horas respectivamente. En el grupo control (camarones libres de WSSV) no se presentó mortalidad (Fig. 3).

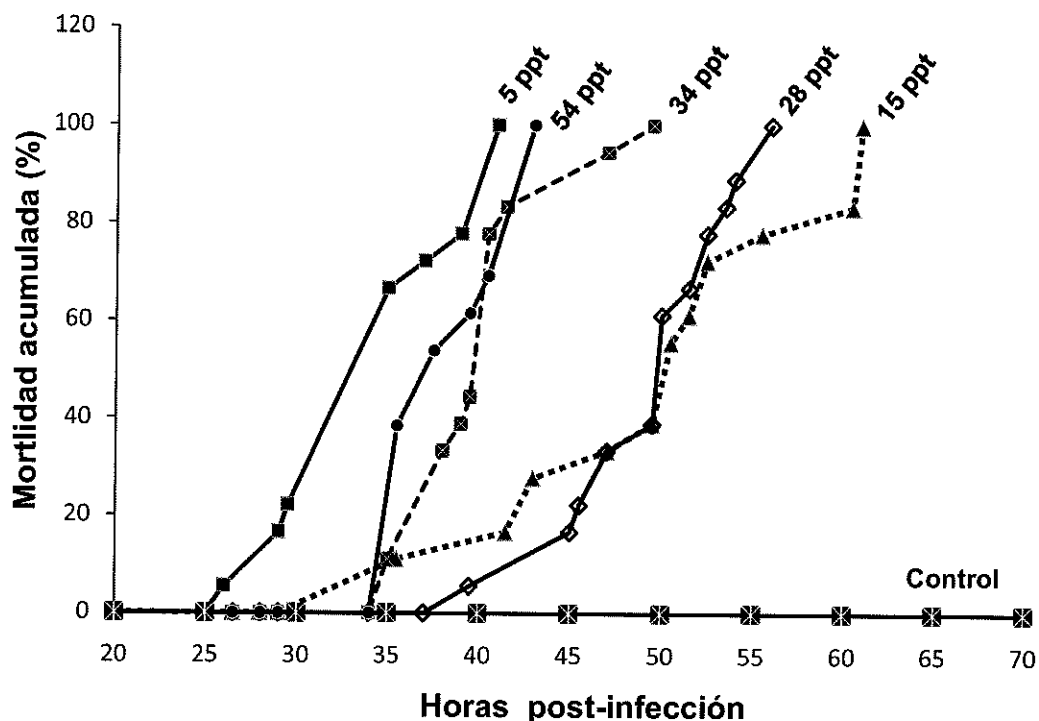


Figura 3. Cinética de mortalidad de *L. vannamei* infectado con el virus de la mancha blanca (WSSV) y aclimatado a diferentes salinidades.

El signo característico de esta enfermedad es la presencia de manchas blancas en el caparazón (depósitos de calcio), en este caso se presentaron en el cefalotórax, abdomen y urópodos a las 48 hpi (Fig. 4). Otro síntoma fue el color del cuerpo rojizo o café, presentándose más intenso en urópodos, pleópodos, pereiópodos y telson (Fig. 5A). Las manchas blancas y coloración rojiza-café se presentaron de manera diferencial entre salinidades y fueron evidentes en organismos mantenidos a 15, 28 y 34 ppt en etapas avanzadas de la infección (48 hpi). El grupo control no presentó ningún síntoma de la

enfermedad (Fig. 5B) y resultó negativo para WSSV mediante análisis de Q-PCR.

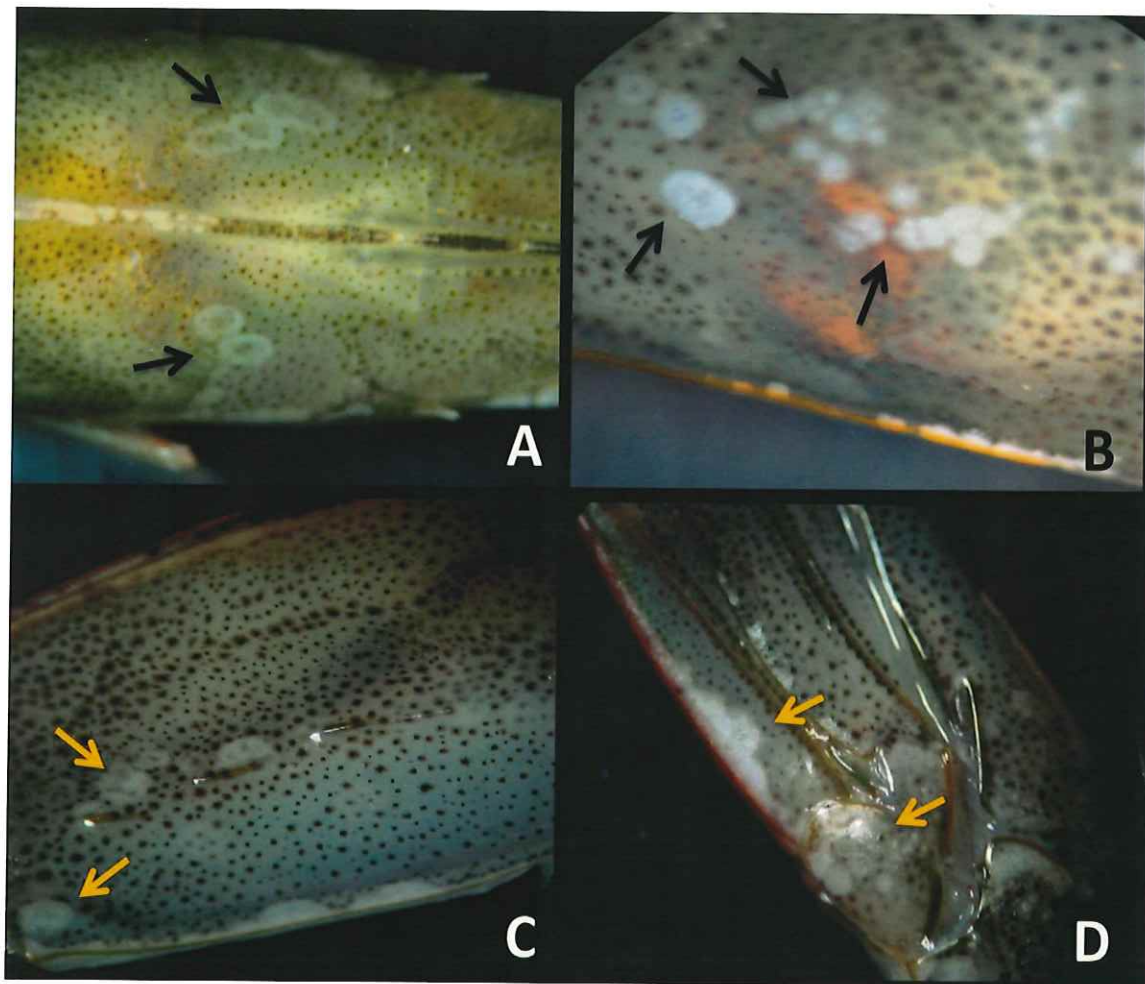


Figura 4. Depósitos de calcio del virus de la mancha blanca (WSSV) indicadas por flechas en el cefalotórax (A y B), abdomen (C) y cola (D) de organismos mantenidos en 15, 28 y 34 ppt.



Figura 5. Coloración rojiza-café que presentaron algunos camarones infectados con WSSV (A). Camarón sano del grupo control (B).

6.4 Respuesta de la capacidad osmoreguladora ante la infección viral

La capacidad osmoreguladora (CO) en juveniles de *L. vannamei* del grupo control expuestos a las diferentes salinidades y 28 °C se presenta en la figura 6. En salinidades de 5 y 15 ppt (147 y 441 mOsmol.Kg⁻¹) la osmolaridad de la hemolinfa fue hiper-osmótica en relación al medio externo, presentando intervalos de 614-678 y 672-751 mOsmol.Kg⁻¹ respectivamente. A salinidades de 28, 34 y 54 ppt (824, 1000 y 1588 mOsmol.Kg⁻¹) la osmolaridad de la hemolinfa fue hipo-osmótica en relación al medio externo (con intervalos de 701-754, 719-799 y 810-1235 mOsmol.Kg⁻¹ respectivamente). El punto en el

cual la presión osmótica de la hemolinfa cruza la línea de iso-osmolaridad (ó punto iso-osmótico del camarón) fue de 727.5 mOsmol.Kg⁻¹ (24.7 ppt) (Fig. 6).

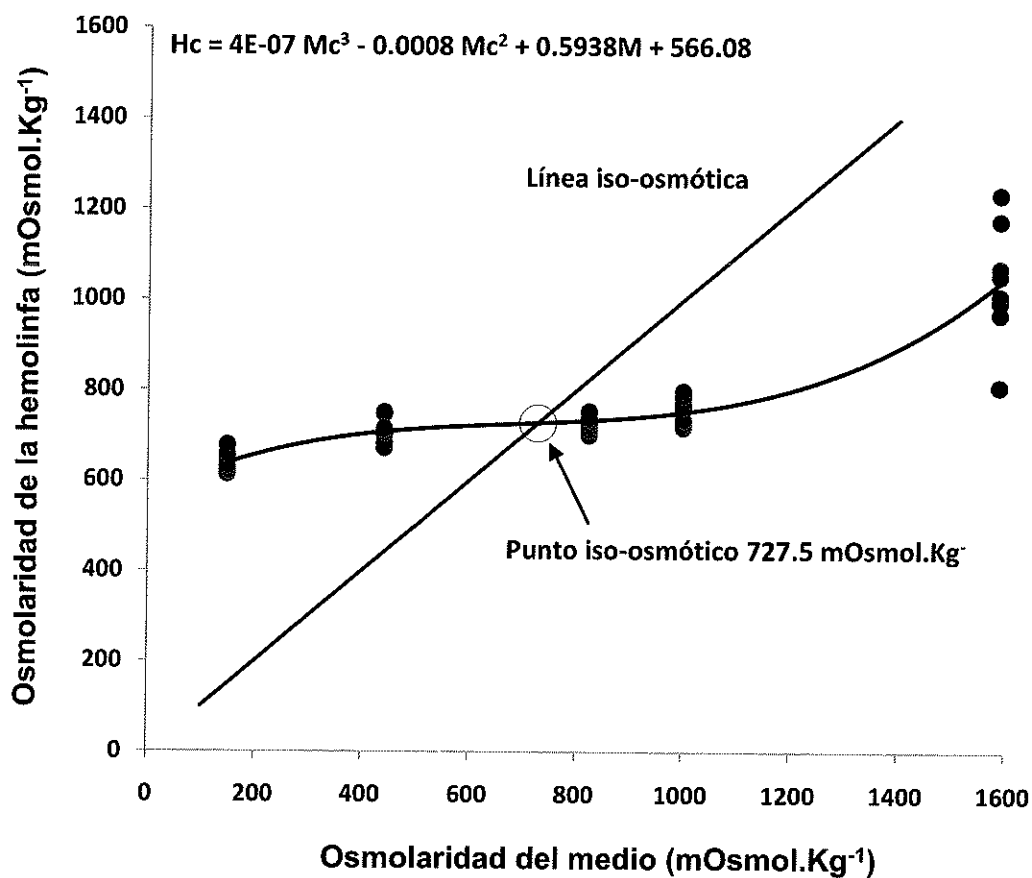


Figura 6. Capacidad osmoreguladora de *Litopenaeus vannamei* expuesto a salinidades de 5, 15, 28, 34 y 54 ppt (147, 441, 824, 1000 y 1588 mOsmol.Kg⁻¹ respectivamente) a 28 °C. Los puntos oscuros representan cada uno de los individuos monitoreados. H_c ; concentración de la hemolinfa (mOsmol.Kg⁻¹); M_c ; concentración del medio externo (mOsmol.Kg⁻¹); "O" El punto que cruza la línea de iso-osmolaridad del camarón (727.5 mOsmol.Kg⁻¹; 24.7 ppt).

Cuando los camarones estuvieron expuestos al virus se detectó un cambio en la presión osmótica de la hemolinfa (POH) respecto al grupo control. Los organismos mantenidos en salinidades de 5 y 15 ppt (en estado de hiper-regulación) manifestaron un descenso de su POH con respecto al grupo control desplegando un mecanismo de hipo-regulación. Por el contrario, los camarones mantenidos en 28, 34 y 54 ppt (en estado de hipo-regulación) incrementaron su POH con respecto al grupo control, desarrollando un mecanismo de hiper-regulación. El análisis de varianza indicó que la capacidad osmoreguladora (CO) en juveniles de *L. vannamei* expuestos a diferentes salinidades fue alterada significativamente ($p < 0.05$) por el WSSV comparado con el grupo control (Fig. 7), cambiando el punto iso-osmótico para los camarones expuestos al WSSV a $777.5 \text{ mOsmol.Kg}^{-1}$, mientras que del grupo control fue de $727.5 \text{ mOsmol.Kg}^{-1}$; 26.5 ppt (Fig. 8). Los cambios significativos en la presión osmótica de la hemolinfa de los organismos infectados fueron detectados después de las 24 hpi.

Algunos camarones infectados presentaron anomalías en el color y tiempo de coagulación de la hemolinfa; café-rosado en lugar del típico azulado y ≥ 2 min de coagulación en lugar de 10 a 30 segundos. Estas características se presentaron sin un patrón definido por salinidad.

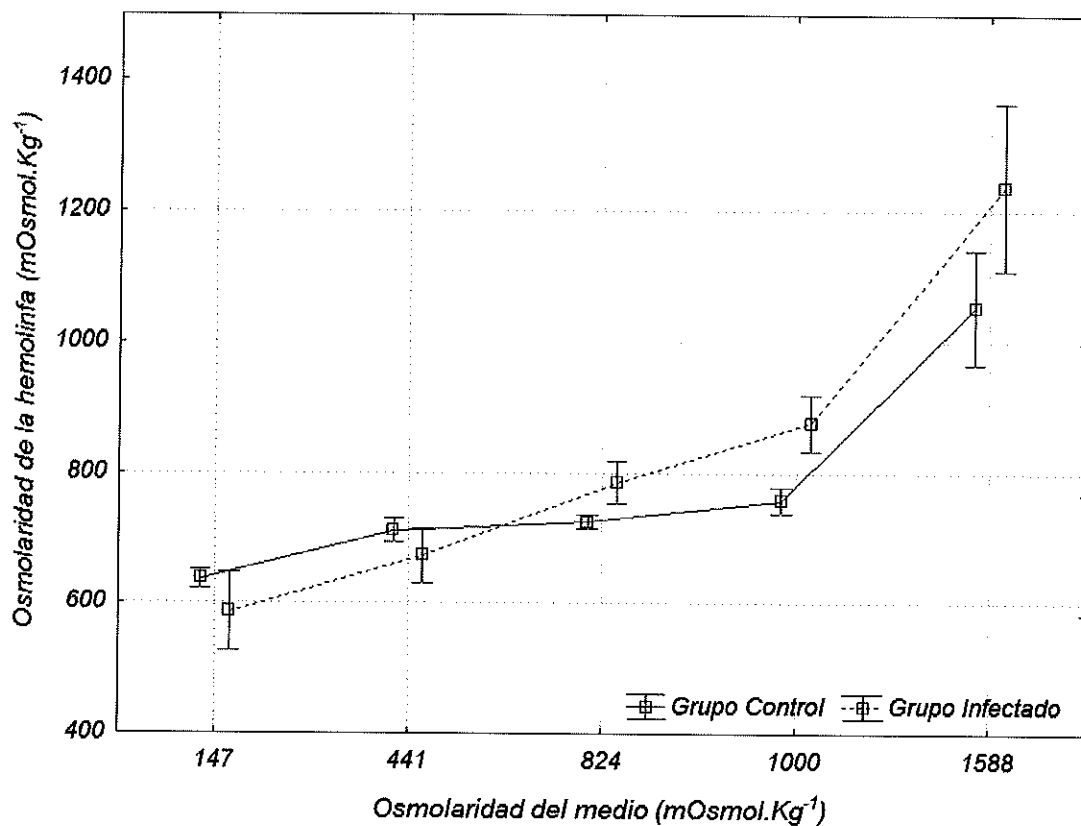


Figura 7. Capacidad osmoreguladora de *Litopenaeus vannamei* expuestos al WSSV respecto al grupo control en salinidades de 5, 15, 28, 34 y 54 ppt (147, 441, 824, 1000 y 1588 mOsmol.Kg⁻¹). Cada punto indica la media $\pm$ SD de 5 tiempos de muestreo (6, 12, 24, 36, y 48 hpi) durante el experimento (para cada tiempo n=2 grupo control, n=4 grupo infectado).

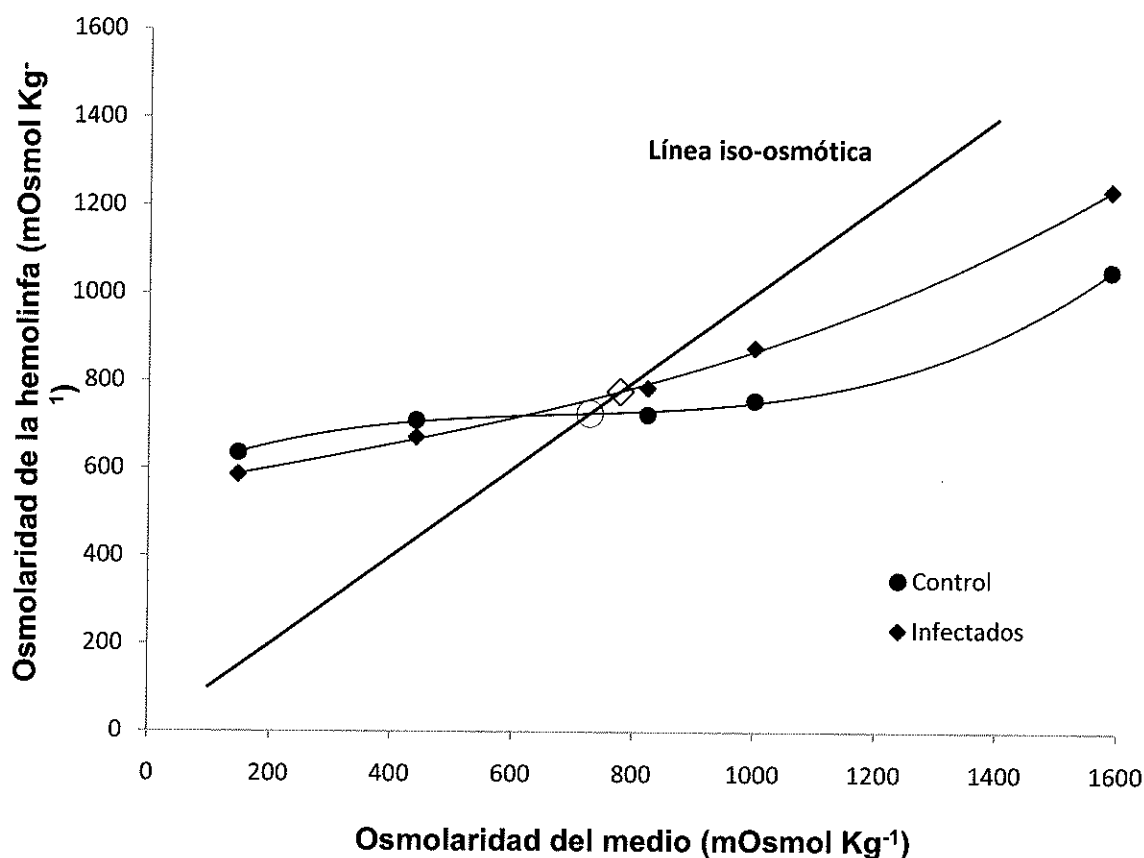


Figura 8. Comparación de la osmoregulación de *Litopenaeus vannamei* del grupo infectado y control expuestos a salinidades de 5, 15, 28, 34 y 54 ppt (147, 441, 824, 1000 y 1588 mOsmol.Kg⁻¹ respectivamente) y 28 °C. "O" punto iso-osmótico control (727.5 mOsmol Kg⁻¹); "◇" punto iso-osmótico infectados (777.5 mOsmol.Kg⁻¹).

6.5 Expresión génica de WSSV-VP664

La abundancia de transcritos de VP664 incrementó a través del tiempo post-infección a partir de las 6 hpi cuando se realizó el primer muestreo, durante este tiempo dos de los 10 organismos muestreados fueron negativos al Q-PCR. A las 12 horas pos infección todos los organismos resultaron positivos a la

infección por WSSV. Una relación lineal fue observada entre los valores del Ct y el Log del número de copias ng^{-1} ARN total para camarones infectados, con un coeficiente de regresión (R^2) de 1.0. La eficiencia (E) de la curva estándar para la cuantificación absoluta por Q-PCR fue de 94.96 (Fig. 9 A y B).

El nivel de transcritos de VP664 fue bajo a las 6 y 12 hpi (excepto para 28 ppt), presentando un incremento exponencial a las 24 hpi en todas las salinidades, durante esta fase se presentan los niveles más altos de expresión génica en la salinidad de 28 ppt, siendo 1.72 veces más alta con respecto a 5 ppt y 1.08 veces en relación a 54 ppt ($2.75\text{E}+05$, $1.01\text{E}+05$ y $1.32\text{E}+05$ copias ng^{-1} RNA total respectivamente). La cantidad de copias ng^{-1} RNA total en 15 ppt fue de $2.74\text{E}+04$ y en 34 ppt de $5.51\text{E}+03$ (Fig. 10). El nivel más alto de expresión génica fue observado a las 45 hpi en los organismos aclimatados a 5 ppt, con $3.15\text{E}+06$ copias ng^{-1} RNA total, sin embargo los niveles de expresión para 15 y 34 ppt fueron más bajos al final de experimento (48 hpi) con $7.86\text{E}+04$ y $3.01\text{E}+05$ copias ng^{-1} RNA total con respecto a 5 ppt. Después del incremento en la expresión génica para todas las salinidades a las 24 hpi, para 28 y 54 ppt se registró un decremento a las 33.5 y 36 hpi con $9.05\text{E}+03$ y $1.40\text{E}+05$ copias ng^{-1} RNA total, respectivamente (Fig. 10).

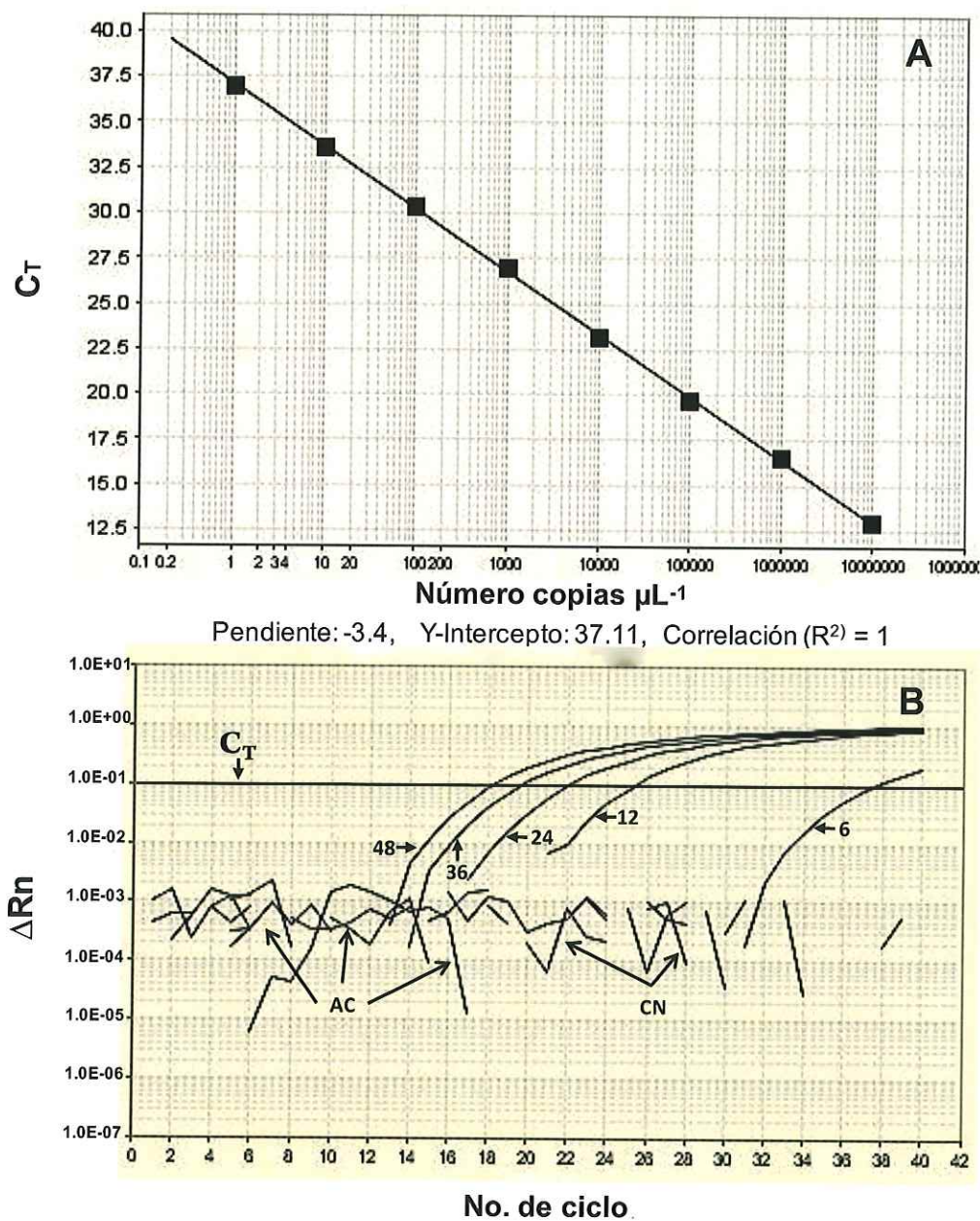


Figura 9. Amplificación de WSSV-VP664 por PCR en tiempo real. (A) Curva estándar (plásmido con el inserto de 69 pb) en el rango de diluciones 1×10^0 a 1×10^7 (copias por ng^{-1}) y valores de la pendiente, intercepto y correlación. (B) Perfiles de amplificación de *L. vannamei* infectados y aclimatados a 15 ppt a las 6, 12, 24, 36 y 48 hpi. AC: camarones del área control no infectados, CN: control negativo de la reacción, R_n : señal de fluorescencia, C_T : ciclo umbral (Threshold cycle).

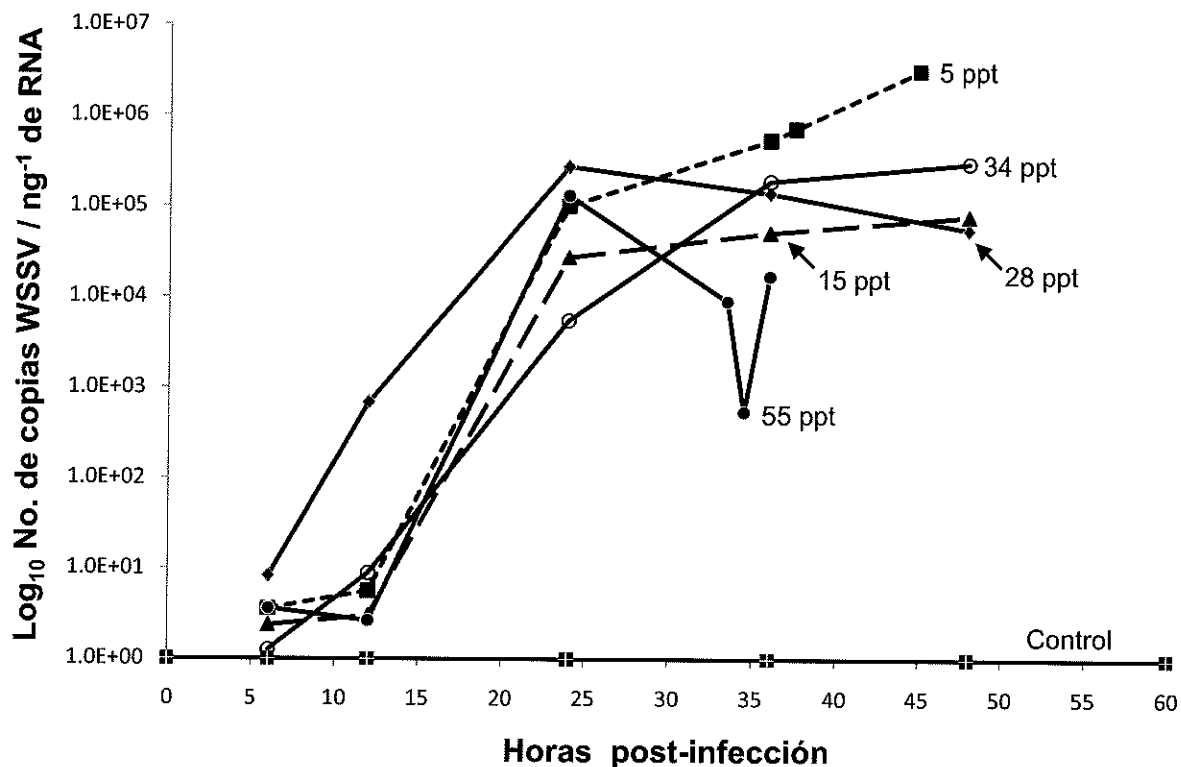


Figura. 10. Curvas de niveles de expresión de VP664 en *L. vannamei* durante el proceso de infección por WSSV en salinidad de 5, 15, 28, 34 y 54 ppt. Los puntos representan el promedio de dos repeticiones ($n=4$) para cada tratamiento en diferentes tiempos post-infección (6, 12, 24, 36 y 48 hpi).

Con base en el ANOVA se encontraron diferencias significativas ($p<0.05$) entre las medias de los niveles de expresión de VP664 de los camarones mantenidos a 5 ppt comparados con los tratamientos de 15, 28, 34 y 54 ppt. Las medias ($\pm 1.93 \cdot SD$) en los niveles de expresión son 515078.7, 31539, 94301, 99451 y 29839.2 copias ng^{-1} ARN total en 5, 15, 28, 34 y 54 ppt, respectivamente. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en los niveles de expresión génica entre 15, 28, 34 y 54 ppt (Fig. 11).

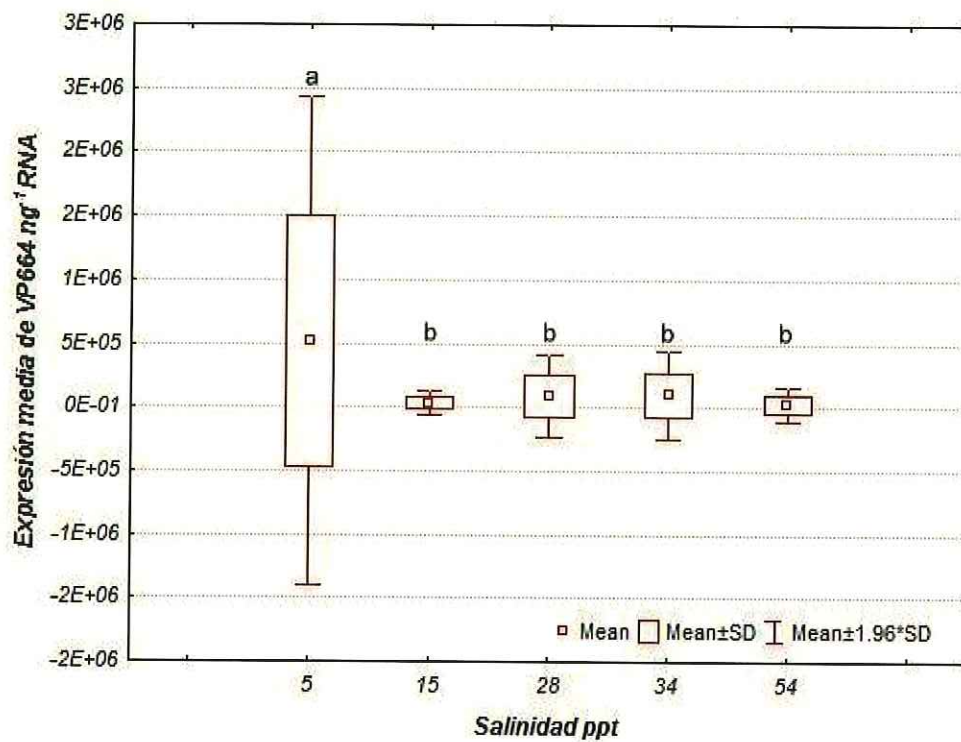


Figura. 11. Análisis de varianza del efecto de la salinidad sobre los niveles medios de expresión de WSSV-VP664 entre salinidades. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre salinidades.

7. DISCUSIONES

En este estudio la salinidad no afectó la sobrevivencia de *L. vannamei* en el grupo control, sin embargo los organismos mantenidos en alta salinidad (54 ppt) presentaron un bajo nivel de actividad locomotora así como nulo crecimiento respecto a los mantenidos en 5, 15, 28 y 34 ppt durante los 10 días de aclimatación. No obstante, en ninguna salinidad se presentaron problemas de mortalidad y todos fueron negativos para WSSV analizado mediante Q-PCR, lo que demuestra que no hubo contaminación entre las áreas control y de infección. La baja actividad observada en los camarones aclimatados a 54 ppt pudiera estar asociada a un mayor gasto energético debido a un intenso esfuerzo osmoregulador, ya que si bien la especie es considerada eurihaina (Díaz *et al.*, 2001) es un grupo que soporta mejor las salinidades bajas (Bray *et al.*, 1994; Rosas *et al.*, 2001; Pérez-Velazquez *et al.*, 2007a). En este trabajo, los camarones experimentalmente infectados presentaron los primeros síntomas de la enfermedad de WSSV aproximadamente a las 24 hpi, tiempo similar a lo reportado en otros estudios con la misma especie (Escobedo-Bonilla *et al.*, 2006). La sintomatología observada coincide con lo descrito por Yoganandhan *et al.* (2003) donde los camarones experimentan trastornos fisiológicos que se manifiestan en la reducción en el consumo de alimento, inactividad o letargo y nado errático.

Por otro lado es poco común observar manchas blancas en *L. vannamei*, en este experimento las manchas blancas fueron visibles en organismos infectados en estado moribundo y aclimatados a 15, 28 y 34 ppt a las 48 hpi, pero no fueron observadas en la cutícula de animales en estado moribundo o muertos en 5 y 54 ppt. Es probable que este fenómeno pueda atribuirse a la rápida mortalidad después de la infección a la que fueron sometidos (49.5, 56 y 61 hpi contra 41 y 43 hpi respectivamente). La coloración rojiza del cuerpo y de los apéndices han sido descritos anteriormente por Chou *et al.* (1995) quien describió la sintomatología externa de esta enfermedad con manchas blancas con un diámetro de 0.3 a 0.5 mm en el exoesqueleto, apéndices y en menor grado en el abdomen en salinidades de 25 a 30 ppt, además presencia de coloración rojiza del hepatopáncreas y del cuerpo por la expansión de los cromatóforos. Por su parte Liu *et al.* (2006) no detectó manchas blancas ni coloración rojiza en *Fenneropenaeus chinensis* expuesto al WSSV. Esto corrobora que entre diferentes especies de peneidos la enfermedad se manifiesta de manera diferente e incluso puede variar a distintas salinidades como se corrobora en este estudio.

Se ha observado que el gen péptido-1 (CAP-1) del cangrejo *Procambarus clarkii* está asociado a la calcificación y es fuertemente sobre-regulado después de la infección con WSSV. El gen CAP-1 ha sido aislado del exoesqueleto y tiene la capacidad de unirse a quitina y, más importante aún, presenta actividad anti-calcificación. El mRNA de CAP-1 se expresa en el tejido

epidermal durante el estado de pos-muda. Se ha propuesto que CAP-1 podría desempeñar un rol importante en la calcificación y la formación de cutícula en el exoesqueleto. De ser así, entonces, la producción anormal de CAP-1 en camarones infectados con WSSV podría causar los depósitos de sales de calcio, permitiendo la formación de manchas blancas en la cutícula (Revisado en Leu *et al.*, 2007). En la presente investigación, aunque no se evaluó la expresión de CAP-1, en futuros estudios sería necesario explorar la expresión génica así como su relación con los niveles de calcio en el agua.

En relación a las diferencias registradas en los porcentajes de mortalidad en función del tiempo transcurrido después de la infección (hpi) en las distintas salinidades, se observó que los camarones son más susceptibles al virus en salinidades extremas (5 y 54 ppt). Siendo la salinidad de 15 ppt en donde se registró el mayor tiempo de sobrevivencia seguida por 28 y 34 ppt. Para explicar las diferencias de mortalidad de los resultados anteriores, revisaremos algunos estudios publicados de lo que ocurre en condiciones de cultivo de camarones peneidos. Cabe aclarar que las condiciones salinas óptimas de cultivo para el crecimiento del camarón blanco (*L. vannamei*) son un tema aun controversial. Diversos estudios han evaluado el nivel de sobrevivencia y crecimiento, así como el efecto de la temperatura y salinidad en *L. vannamei* y otros peneidos (Ponce-Palafox *et al.*, 1997; Jiang *et al.*, 2000; Díaz *et al.*, 2001; Gong *et al.*, 2004). Se ha observado que la alta salinidad tiene un efecto negativo sobre el crecimiento en *L. vannamei*, *Penaeus latisulcatus*, *Farfantepenaeus*

californiensis y *L. stylirostris* (Bray *et al.*, 1994; Villareal *et al.*, 2003; Sang y Fotedar, 2004; Díaz *et al.*, 2004). Por otro lado Pérez-Velazquez *et al.* (2007a) detectaron un crecimiento superior en juveniles de *L. vannamei* en salinidad baja y ponen de manifiesto la importancia de evitar salinidades altas en el agua de cultivo para no impactar negativamente el crecimiento de los organismos. Por otro lado, Ponce-Palafox *et al.* (1997) señalan que el crecimiento de *L. vannamei* no se reduce cuando los organismos son expuestos a un intervalo de salinidad de 25-45 ppt. Por su parte, Bray *et al.* (1994) señalaron que el cultivo de camarón blanco a salinidades de 5 y 15 ppt produce una mayor ganancia en peso que cuando los organismos fueron cultivados a 25, 35 y 49 ppt.

Otros estudios han obtenido resultados en salinidades intermedias y cercanas al punto iso-osmótico, por ejemplo, Zhu *et al.* (2006), al aclimatar a juveniles de *L. vannamei* a 15 y 40 ppt y cultivarlos con diferentes proporciones de Na^+/K^+ encontraron que la mayor tasa de crecimiento de los organismos ocurrió en la salinidad de 15 ppt. Por su parte Boyd (1989) considera que salinidades de 15 a 25 ppt pueden ser ideales para el cultivo de *L. vannamei*. Rosas *et al.* (2001) observaron en *L. vannamei* un crecimiento significativamente menor en organismos expuestos a 40 ppt en comparación con animales mantenidos a una salinidad de 16 ppt, por su parte, Ogle *et al.* (1992) reportaron menor sobrevivencia de juveniles de *L. vannamei* mantenidos en una salinidad de 2 ppt que en una de 16 ppt. Laramore *et al.* (2001) encontraron mejor crecimiento de *L. vannamei* mantenido en 30 ppt que en 2 y

3 ppt e incluso mortalidad total en las salinidades por debajo de 2 ppt. Ponce-Palafox *et al.* (1997) compararon el crecimiento de *L. vannamei* cultivado durante 40 días en salinidades de 20, 30, 35, 40 y 50 ppt y en temperaturas de 20, 25, 30 y 35°C, encontrando mejores resultados en salinidades superiores a 20 ppt y con temperaturas entre 25-35 °C. Con base en sus investigaciones Valdez *et al.* (2008) señalan que la salinidad óptima para cultivar a esta especie debe ser de 26 ppt, ya que corresponde al punto iso-osmótico. Pérez-Velázquez *et al.* (2007a) consideran que la exposición de los camarones a salinidades inferiores de hasta 2 ppt o superiores de hasta 50 ppt afectan su crecimiento significativamente.

De acuerdo con la información existente a la fecha y la relativa discrepancia en los resultados de los diferentes autores, es necesario analizar los cambios que experimentan los camarones a nivel fisiológico cuando son cultivados en salinidad baja, media o alta. De acuerdo a Panikkar (1968) el máximo crecimiento y sobrevivencia de un organismo debería ocurrir al encontrarse en un medio iso-osmótico, ya que el animal no gastará energía en trabajo osmótico al no hacer uso de procesos activos para mantener el equilibrio del medio interno en relación con el externo. Al considerar lo anterior, es de suponer que en estas condiciones los organismos optimizarían sus procesos fisiológicos de tal forma que el gasto energético se reduciría, lo que representaría un ahorro energético que podría destinarse al crecimiento. En acuerdo con esta hipótesis, Valdez *et al.*, (2008), constataron que la exposición

de los camarones a 26 ppt redujo la inversión energética destinada a cubrir los procesos del metabolismo de rutina así como también la excreción de productos nitrogenados, observaron además un incremento en el crecimiento, lo que significa que en esa salinidad estuvieron libres de estrés ambiental, por lo que desde el punto de vista fisiológico recomiendan mantener a juveniles de *L. vannamei* en estas condiciones. La exposición a salinidad baja implica la movilización y uso de substratos de energía para la función de la bomba ATPasa- Na^+/K^+ y compensar una condición general de estrés. Al menos en el primer caso, esta energía puede ser obtenida directamente de reservas en forma de lípidos o carbohidratos almacenadas en las branquias (Palacios *et al.*, 2004).

Un reducido crecimiento de camarones a alta salinidad ha sido reportado en algunos estudios (p. ej. Bray *et al.*, 1994; Pérez-Velazquez *et al.*, 2007a). Al respecto Pérez-Velázquez *et al.* (2007b) observaron que camarones mantenidos a 50 ppt tienen estadísticamente bajo peso final y ganancia en peso que organismos mantenidos en salinidades de 35 ppt, además encontraron un contenido de agua final significativamente bajo en camarones expuestos a 50 ppt que en camarones mantenidos a 2 y 35 ppt. Las diferencias encontradas al bajo peso final de camarones mantenidos a 54 ppt respecto a las otras salinidades en este estudio pueden relacionarse con estas observaciones y están asociadas con la pérdida osmótica de agua en esta salinidad. Sin embargo, el mayor peso final de los camarones cultivados 34 ppt en este

estudio está relacionado al hecho de que estos organismos no estuvieron expuestos a estrés debido al proceso de aclimatación y a que son organismos preferentemente hiper-reguladores (Péqueux *et al.*, 2008).

Es de esperarse que si la salinidad tiene efecto sobre el crecimiento y sobrevivencia del camarón bajo condiciones normales de cultivo, entonces afecte también su estado fisiológico cuando se ve expuesto a patógenos. Al respecto, Joseph y Philip (2007) evaluaron la influencia del estrés a salinidades extremas (0, 15 y 35 ppt) en la respuesta inmunológica y fisiológica de *Penaeus monodon*, observaron que en la salinidad de 15 ppt se reduce la susceptibilidad del camarón ante la infección del WSSV y que salinidades extremas alteran variables metabólicas de la hemolinfa (proteína total, carbohidratos, aminoácidos libres, lípidos, glucosa y colesterol) y variables inmunes (cuenta total de hemocitos, fosfatasa alcalina y fenoloxidasa), afectando la inmunocompetencia e incrementando la susceptibilidad al WSSV, particularmente a baja salinidad (0 ppt) siendo más resistentes a 15 ppt seguida por 35 ppt. Los resultados de este trabajo corroboran la idea, ya que la mejor respuesta de sobrevivencia de los camarones al WSSV se observó en la salinidad de 15 ppt (61 hpi) seguida por 28 (55 hpi) y 34 (49.5 hpi) ppt. En salinidades extremas 5 y 54 ppt la resistencia al WSSV es menor y la mortalidad total se alcanza en menor tiempo.

Por su parte Liu *et al.* (2006) expusieron camarones *Fenneropenaeus chinensis* infectados con WSSV a dos cambios de salinidad; de 22 a 18 y de 22

a 14 ppt en una hora. Concluyen que ambos cambios provocan alta mortalidad de los camarones. El recuento de hemocitos totales del grupo expuesto no arrojó ningún cambio, pero el índice de la fenoloxidasa⁵ declinó. Evidenciando el gran estrés al que se someten los organismos bajo cambios de salinidad.

Una reducción de metabolitos de la hemolinfa en camarones con estrés dual (estrés salino y patogénico) sería explicada como una desviación del flujo de energía para soportar el trabajo osmótico. Dado que las variables metabólicas tienen correlación con alguna o todas las variables inmunes, una débil respuesta metabólica puede conducir a un bajo nivel de inmunocompetencia (Joseph y Philip, 2007).

El patrón de osmoregulación registrado para juveniles del grupo control tuvo el mismo comportamiento a los reportados en otros trabajos. Los camarones fueron hiper-reguladores en baja salinidad (5 y 15 ppt) e hiporeguladores en alta salinidad (28, 34 y 54 ppt) (Díaz *et al.*, 2001; Bückle *et al.*, 2006). El punto iso-osmótico para el grupo control a temperatura de 28 °C fue de 727.5 (24.7 ppt). Este valor está dentro del intervalo reportado para varias especies de peneidos (revisión en Díaz *et al.*, 2001).

⁵ La fenoloxidasa forma parte del sistema profenoloxidasa, el cual es un mecanismo tanto efector como regulador del sistema inmune. La fenoloxidasa participa en la melanización, coagulación, encapsulación y formación de péptidos antimicrobianos (Ashida y Yamazaki, 1990; Ashida, 1990).

El valor de presión osmótica de la hemolinfa obtenido de 727.5 mOsmol.Kg⁻¹ está en el intervalo reportado por Díaz *et al.* (2001) para juveniles de *L. vannamei*, expuestos a fluctuaciones de salinidad y aclimatados a diferentes temperaturas, donde reportaron puntos iso-osmóticos con un intervalo de 712–777 mOsmol.Kg⁻¹. Por su parte Castille y Lawrence (1981) reportan un punto iso-osmotico en *L. vannamei* de 718 mOsmol.Kg⁻¹ pero a una temperatura de 23 °C. Los resultados del punto iso-osmótico de este estudio caen dentro de estos intervalos. Bückle *et al.* (2006) observaron que el punto iso-osmotico en *L. vannamei* expuestos a salinidad constante cambia en relación a la temperatura con intervalos de 717 mOsmol.kg⁻¹ (24 °C) a 823 mOsmol.kg⁻¹ (28 °C), con un punto iso-osmótico de 763 mOsmol.kg⁻¹ a 20 °C. El camarón blanco es conocido como un fuerte regulador porque se adapta rápidamente a la salinidad incrementando o reduciendo la concentración osmótica de la hemolinfa (Díaz *et al.*, 2001, Péqueux *et al.*, 2006).

Las diferencias de valor del punto iso-osmótico pueden atribuirse a las diferentes condiciones experimentales utilizadas en estos estudios, además de que factores como el estadio del ciclo de muda, el tamaño, edad y el estado nutricional tienen una influencia sobre la osmolaridad de la hemolinfa. (Díaz *et al.*, 2004; Re *et al.*, 2004). Sin embargo, los valores de puntos iso-osmóticos reportados para *L. vannamei* en estos trabajos están muy cercanos entre sí, sin considerar variaciones en salinidad y temperatura. Al analizar los datos, sin las fluctuaciones en salinidad y temperatura, el promedio es de 769 mOsmol Kg⁻¹

(26.1 ppt) que es cercano a el valor encontrado en este estudio (727.5 mOmol.Kg⁻¹; 24.7 ppt).

El WSSV alteró la capacidad osmoreguladora de los camarones infectados. La capacidad hiper-osmoreguladora (5 y 15 ppt) fue significativamente reducida, en cambio, la capacidad hipo-osmoreguladora (28, 34 y 50 ppt) fue significativamente incrementada. El efecto del WSSV sobre la CO fue dependiente del tiempo, observándose que después de las 24 hpi es cuando se detectan los cambios más significativos respecto al grupo control.

Las fluctuaciones de la POH en *L. vannamei* expuesto al WSSV están directamente relacionados al proceso de infección, la perdida en la capacidad osmoreguladora puede ser explicada debido al proceso de infección, esta tendencia de ser fuertes reguladores y pasar a un estado de osmo-conformadores está asociada al daño celular provocado por el virus en los tejidos, principalmente en las branquias. Las branquias son multifuncionales y juegan un rol clave en la respiración, la osmoregulación y la destoxificación (Clavero-Salas *et al.*, 2007), son también el sitio de formación de nódulos de hemocitos durante experimentos con inyección de partículas externas (Martin *et al.*, 2000).

Cuando se realizan infecciones por vía intramuscular el virus se distribuye a través de la hemolinfa a los órganos blanco y las branquias es uno de los órganos irrigados por la hemolinfa donde el virus inicia rápidamente el

proceso de infección (Durand *et al.*, 2003). Se ha determinado que la hemolinfa y branquias se encuentran entre los órganos blancos principales y son el sitio de replicación primaria del WSSV (Chang *et al.*, 1996; Lo *et al.*, 1997; Nadala *et al.*, 1997; Kou *et al.*, 1998), si el virus daña el tejido celular en las branquias, entonces el proceso de osmoregulación es afectado, y el camarón pierde la capacidad de osmoregular.

La capacidad osmoreguladora se ha propuesto como una herramienta útil para evaluar la condición fisiológica de los camarones, así como para detectar los efectos subletales del estrés en los sistemas de cultivo. Lignot *et al.* (2000) recomienda que los estudios deberían centrarse en usar la CO como biomarcador de estrés patológico en camarón en etapas tempranas de infecciones. Sin embargo, con los resultados obtenidos en este trabajo, no resulta útil usar la capacidad osmoreguladora como parámetro para detección temprana de infecciones virales en camarón, ya que los cambios más drásticos y detectables de la presión osmótica de la hemolinfa en camarones *L. vannamei* infectados con el WSSV, fueron observados en etapas donde la infección ya está en estado avanzado >24 hpi. Además de que esta tiende a fluctuar con cambios en los parámetros fisicoquímicos o de manejo en los cultivos (pH, amonio, nitritos, turbidez, metales etc.) (Revisado en Lignot *et al.*, 2000). Un parámetro al que se le adjudican múltiples propiedades para detectar estrés en camarones no resulta útil si es alterado por muchos factores como se ha descrito en varias investigaciones. Con base en esto solo podría suponerse de

que algo está afectando a los organismos, sin precisarse que es exactamente y, en el mejor de los casos, solo conjeturar sobre el estado general de salud.

Las enfermedades virales representan un grave problema en la camaronicultura, ya que provocan grandes pérdidas económicas para los productores, el contar con un método de diagnóstico rápido y oportuno es la mejor opción para conocer la enfermedad precisa que afecta los organismos y poder actuar de manera rápida. En este sentido hay que hacer uso de herramientas que proporcionen resultados más detallados y precisos, como es el uso de técnicas moleculares.

Los cambios en el periodo de tiempo de coagulación (normal 10 a 30 segundos) con respecto a los camarones infectados (2 minutos o más) representan signos de una baja actividad del sistema inmune de los organismos debido al proceso de infección aguda provocada por el WSSV. Siendo los hemocitos los principales efectores de la respuesta inmune en los crustáceos (Johansson y Söderhall, 1989), y estar involucrados principalmente en el reconocimiento y la eliminación del material extraño, así como en el proceso de coagulación de la hemolinfa (Martin y Hose, 1992; Vázquez *et al.*, 1998) es de esperarse que se afecte esta capacidad. También se detectaron alteraciones en el color de la hemolinfa de un color azul o azul claro observado en organismos sanos; los infectados presentan una coloración rosada a café, que también han sido descritos por Rodríguez *et al.* (2003) y Jiravanichpaisal *et al.* (2001) con anterioridad. Montesdeoca *et al.*, (2002) sugieren que este cambio de

coloración está relacionado con alteraciones en el sistema profenoloxidasa, debido al daño celular de los hemocitos los mismos que al liberar su contenido en la hemolinfa, melanizarían el plasma tornándolo rosado.

Se detectó la expresión de transcritos de VP664 (WSSV) por Q-PCR desde el primer muestreo (6 hpi) en todas las salinidades. Sin embargo, dos muestras de este tiempo fueron negativas, es posible que la infección se encontrara en una fase no detectable (estado latente), de ser el caso estos individuos pasarían como falsos negativos. A las 12 hpi todos los organismos fueron positivos al WSSV.

Los bajos niveles de expresión detectados a las 6 y 12 hpi indican una infección leve, posteriormente a las 24 hpi se registra un incremento significativo que coincide también con el periodo en el que los camarones empiezan a manifestar los primeros síntomas de la infección características de una fase moderada o aguda.

Las curvas de expresión viral en este estudio presentaron un comportamiento similar al descrito por Tan *et al.* (2001) con una fase de eclipse (ligera) de 0-24 hpi, logarítmica (moderada) de 24-48 hpi y de meseta (fuerte) de 48-120 hpi con signos clínicos de la enfermedad y en estado moribundo, en este trabajo detectamos las mismas fases; de eclipse (0-12 hpi), logarítmica (12-24 hpi) y de meseta (24-48 hpi), las diferencias en el tiempo de duración se atribuyen a la ruta de infección que en este estudio fue mediante inyección y en

el caso de Tan *et al.*, fue por alimentación. La fase de meseta en las curvas de expresión coincide con el momento de mayor mortalidad en los tratamientos experimentales.

Los incrementos de los niveles de expresión en 28 ppt a partir de las 12 hpi y hasta las 24 hpi podrían sugerir un elevado metabolismo celular de los organismos al estar en un medio cercano al punto iso-osmótico lo que permitiría al virus replicarse muy rápido mientras la maquinaria celular del huésped trabaja y alcanzar valores más elevados que las otras salinidades. En salinidad alta (54 ppt) ocurriría lo contrario, presentando un nivel bajo de transcripción la expresión sería más lenta, pero con condiciones de una respuesta inmune débil los camarones serían más susceptibles al virus y mueren en menor tiempo (43 hpi) respecto a 28 ppt (61 hpi).

Los decrementos observados en el nivel de transcritos de VP664 en 28 y 54 ppt después de 24 hpi podrían asociarse con una respuesta inmune del camarón, los niveles altos de expresión viral en este periodo podrían causar una sobre-estimulación del sistema inmune como una forma de proteger su sistema celular del daño causado por el virus, entonces la energía del huésped sería invertida en defensa y mantenimiento de sus funciones celulares básicas.

Esta hipótesis se asocia con el hecho que antes de las 24 horas los organismos aun siguen consumiendo alimento, lo que indica que aun están en condiciones adecuadas y a partir de las 24 hpi dejan de alimentarse totalmente

y empiezan a registrarse las primeras muertes. Otra hipótesis contraria a esta es que el alto metabolismo en camarones mantenidos en 28 ppt incrementaría rápidamente la carga viral y daría lugar a un daño celular acelerado causado por el virus, lo que provoca pérdida de función y por consiguiente no hay síntesis de ARNm, con lo que en etapas finales decaen los niveles de VP664. Sin embargo, en 54 ppt, el mayor gasto energético invertido en osmoregulación sería la causa de este patrón. Hasta el momento los resultados del presente estudio, no permiten determinar cuál de estas explicaciones es la más viable.

Los resultados de los niveles de expresión para 28 y 54 ppt son consistentes con los resultados de Tsai *et al.* (2004) e indican que transcritos de VP664 comienzan su expresión en etapas tempranas entre 6 y 12 hpi con un pico a las 24 hpi y un decremento al final de la infección a las 36 y 48 hpi. Leu *et al.* (2005) detectaron una transcripción activa en la etapa final de la infección en adultos de *P. monodon*, y sugirieron que el producto proteico de este gen está involucrado fundamentalmente en el ensamble y morfogénesis del virión. Estas observaciones coinciden con los resultados observados en la salinidad de 5, 15 y 34 ppt. Siendo VP664 un gen de expresión tardía, sus niveles entonces podrían considerarse normales en las salinidades de 5, 15 y 34 ya que tienden a aumentar en la etapa final de la infección, sin embargo no es claro su patrón en 28 y 54 ppt ya que sus niveles disminuyen.

En este estudio las curvas de expresión génica de VP664 en el proceso de regulación de la infección no presentan un patrón similar en las diferentes

salinidades. En este trabajo se presentan los dos perfiles detectados por Leu *et al.* (2005) y Tsai *et al.* (2004) lo cual indica que la salinidad tiene un efecto sobre la expresión de los genes, sin embargo los mecanismos por los cuales se presenta aun es poco claro.

El proceso de patogénesis generalmente involucra una interacción entre el virus y su hospedero, la respuesta de uno u otro dará lugar a estímulos celulares que se verán reflejados en la activación o inhibición de procesos moleculares, los cuales desencadenaran respuestas antagónicas. Las diferencias observadas en los niveles de expresión pueden ser atribuidas también a procesos de regulación durante la infección. Es conocido que existe una regulación en cascada en la expresión de genes virales, un número de genes tempranos son requeridos para activar genes tardíos (Passarelli y Guarino, 2007).

Considerando que la proteína del gen VP664 está involucrada fundamentalmente en el ensamble y morfogénesis del virión y se transcribe en etapas finales (Leu *et al.*, 2005), entonces la expresión de sus transcritos dependerá de la expresión de genes de etapas tempranas para poder sintetizarse. Siendo así, algún mecanismo de regulación durante el desarrollo de la infección, controla la expresión de genes tempranos y estos dejan de expresarse durante el curso de la infección, y por lo tanto, afecte los niveles de transcritos de VP664 en las salinidades de 28 y 54 ppt y estos empiecen a decaer cuando han alcanzado un nivel elevado (24 hpi). Es necesaria la

identificación de genes tempranos o intermedios que regulan la respuesta de genes tardíos de origen viral y genes del hospedero que estarían involucrados en modificar los procesos de transcripción viral.

La detección de disminución y aumento en la expresión de trascritos de VP664 en *L. vannamei* con respecto a la salinidad no se puede atribuir directamente a la actividad propia del gen. Es probable entonces, que estas diferencias sean resultado directo del efecto de la salinidad sobre el metabolismo del camarón. El análisis de expresión de otros genes del hospedero podría ayudarnos a responder si estas diferencias en la expresión se encuentran relacionadas con procesos metabólicos debidos a la salinidad que modifican el entorno de expresión de VP664.

7.1 Consideraciones finales

Hay que reconocer que las diferencias que podrían darse en otros estudios respecto a los de este trabajo estarán influenciadas por parámetros como son: la cepa o aislado del WSSV utilizado para inocular los camarones (Rahman *et al.*, 2008), la especie de camarón o la etapa de desarrollo (Wang *et al.*, 1999; Sudha *et al.*, 1998). La edad o talla también pueden tener un marcado efecto sobre la tolerancia a la salinidad (McGraw *et al.*, 2002). El origen geográfico de los organismos que estaría más relacionado con las características genéticas también podría manifestar diferencias en las

salinidades (Laramore *et al.*, 2001). Bray *et al.* (1994) observaron que la familia de camarones *L. vannamei* de Ecuador crecían mejor en baja salinidad (5 a 15 ppt), mientras que en la familia de camarones de México no encontraron el mismo efecto. Así Ponce-Palafox *et al.* (1997) reportaron un mejor crecimiento y sobrevivencia para una familia de *L. vannamei* de México en salinidades de 33 a 40 ppt.

Nuestros resultados indican que camarones aclimatados a diferentes salinidades presentan diferencias en la susceptibilidad al WSSV y que en puntos intermedios (15, 28 y 34) los camarones tienen mayor sobrevivencia. La salinidad no influye directamente sobre la infectividad del WSSV en el camarón, ya que son susceptibles al virus en cualquier intervalo. La resistencia del camarón al virus está asociada con el proceso de osmoregulación por el gasto energético que implica. La salinidad influye sobre la mortalidad del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* infectado con WSSV; bajo condiciones de baja y alta salinidad los organismos son más susceptibles al virus.

Comparando los tiempos de mortalidad, la presión osmótica de la hemolinfa y la expresión de VP664, constatamos que la salinidad tiene un fuerte efecto sobre la fisiología del camarón infectado con WSSV, dado que ambientes de baja o alta salinidad pueden afectar en gran medida la respuesta inmune afectando el tiempo de sobrevivencia. En un rango de 15 a 28 ppt se encuentra un punto óptimo de salinidad, en el cual los organismos hacen frente a las infecciones con mayor éxito.

Los resultados aquí obtenidos respecto a los tiempos de mortalidad por WSSV en camarones sometidos a diferente salinidad han sido repetidos y corroborados en el Laboratorio de Patología Experimental Acuícola (LPEA) en experimentos similares utilizando organismos adultos de *L. vannamei* de diferentes origen (granjas acuícolas y familias) y ensayando con cinco diluciones diferentes 1×10^0 a 1×10^{-5} del inóculo inyectado (datos generados, pero no mostrados). En todos los casos se ha encontrado la misma tendencia en cuanto a la sobrevivencia en salinidades de 1, 3, 5, 15, 28, 34 y 54 ppt, resultando que aquellos mantenidos en salinidades intermedias 15, 28 y 34 ppt resisten mas la infección de WSSV respecto a los mantenidos en baja y alta salinidad.

8. CONCLUSIONES

1. Los cultivos del Valle de Mexicali y San Felipe se encontraron libres de patógenos virales al momento del muestreo (WSSV, IHHNV, YHV y TSV).

2. En salinidades extremas (5 y 54) los camarones son más susceptibles a la infección, la mortalidad ocurre en menor tiempo (hasta 15 horas) respecto a salinidades intermedias (15, 28 y 34) cercana al punto iso-osmótico. La mayor sobrevivencia en tiempo ocurrió en salinidades cercanas al punto iso-osmótico ($727.5 \text{ mOsmol Kg}^{-1}$) 15, 28 y 34 ppt.

3. Las manchas blancas provocadas por el WSSV se presentaron de manera diferente dependiendo de la salinidad; en 15, 28 y 34 ppt fueron evidentes a las 48 hpi, pero no fueron observadas en 5 y 54 ppt. Los camarones presentaron además coloración rojiza del cuerpo y apéndices en todas las salinidades.

4. *L. vannamei* exhibe una regulación hiper-osmótica en baja salinidad (5 y 15 ppt) y regulación hipo-osmótica en alta salinidad (28, 34 y 54 ppt) con un punto iso-osmótico de $727.5 \text{ mOsmol Kg}^{-1}$ (24.7 ppt).

5. La exposición aguda del WSSV sobre *L. vannamei* aclimatado en salinidad de 5, 15, 28, 34 y 54 ppt genera cambios sobre la presión osmótica de la hemolinfa ocasionando un estado de hipo-regulación en baja salinidad y un proceso de hiper-regulación en alta salinidad. Cambiando el punto iso-osmótico

para los camarones infectados a $777.5 \text{ mOsmol.Kg}^{-1}$ con respecto al grupo control ($727.5 \text{ mOsmol Kg}^{-1}$).

La capacidad osmoregulatoria puede ser un parámetro útil para evaluar condiciones de estrés en camarón y observar el efecto adverso de la infección de WSSV en el tiempo. Pero no es recomendable utilizarlo para evaluar el estado de salud de los camarones para detectar enfermedades virales en etapas tempranas, pues los cambios son observados en etapas avanzadas >24 hpi., además que es afectado por diversos factores, sin poder relacionarlo con algún parámetro en específico o determinar si corresponde a una infección o agente etiológico particular.

6. *L. vannamei* es susceptible al WSSV independientemente de la salinidad en que se encuentren, causando mortalidades del 100 %, por lo cual la baja o alta salinidad no puede considerarse una barrera contra el WSSV.

Este y otros estudios demuestran que *L. vannamei* se adecua a la baja salinidad y su cultivo bajo estas condiciones es factible. Sin embargo, la gran demanda energética requerida para mantenerse osmoregulando en salinidad baja y alta lo hace más susceptible a las infecciones.

7. Las diferencias observadas en los niveles de expresión de transcritos de VP664 en *L. vannamei* se atribuyen a la salinidad, puesto que esta interviene en los procesos de osmoregulación, entonces es un factor que de alguna manera modula la expresión de este gen a lo largo del proceso de infección. Lo

cual sugiere cambios del mecanismo de patogenicidad en relación a la salinidad.

9. RECOMENDACIONES

La salinidad recomendable para cultivo de *L. vannamei* está entre el rango de 15 a 28 ppt, cercanos al punto iso-osmótico y donde se registró el mayor tiempo de sobrevivencia. En estas condiciones los organismos estarían en mejores condiciones para desarrollar sus funciones fisiológicas sin una gran demanda energética para osmo-regulación que se dirigiría al crecimiento. Por lo tanto, investigaciones posteriores deben centrarse en evaluar la respuesta de otros virus y patógenos entre este rango de salinidad para encontrar un punto óptimo.

Es de interés conocer el mecanismo molecular preciso por el cual se regula la transcripción de VP664 y como varían sus niveles de transcritos dependiendo de la salinidad en que se encuentren los camarones. Esto podría lograrse analizando en conjunto otros genes tanto del virus como del hospedero relacionados con el proceso de transcripción y la osmoregulación para poder encontrar cuales son los factores que intervienen en sus perfiles de expresión.

10. REFERENCIAS

- Alday de Graindorge, V. y Griffith, D. 2000. Ecuador. *In*: Thematic review on Management Strategies for Major Diseases in Shrimp Aquaculture. A component of the WB/NACA/WWF/FAO Program on Shrimp Farming and the Environment. Report of the workshop held in Cebu, Philippines from 28-30 November 1999. pp. 17-19.
- Alday de Graindorge, V., Bondad-Reantaso, M.G. y Subasinghe, R.P. 2002. Risk Analysis in Aquatic Animal Movement, Health Managemen. Global Acuaculture Advocate. October 2002: 20-21.
- Ashida, M. 1990. The profenoloxidasa cascade in insect immunity. Response Immunologic. 141, 898.
- Ashida, M. and Yamazaki, H.I. 1990. Biochemistry of the phenoloxidase system in insects: with special reference to its activation. In *Molting and Metamorphosis* (ed. E. Ohnishi and H. Ishizaki), pp. 239–265. Tokyo: Japan Science Society Press; Berlin: Springer-Verlag.
- Bondad-Reantaso, M.G., Mcgladdery, S.E., East I. y Subasinghe, R.P. 2001. Asia diagnostic guide to aquatic animal diseases, Documento Técnico de Pesca de la FAO 402/2, FAO y NACA. 237 pp.
- Boyd, C.E. 1989. Water quality management and aeration in shrimp farming. In: Fisheries and Allied Aquacultures Departmental Series, Vol. 2. Alabama

Agricultural Experimental Station, Auburn University, Auburn, AL, USA.
83 pp.

Bray, W.A., Lawrence, A.L. y Leung-Trujillo, J.R. 1994. The effect of salinity on growth and survival of *Penaeus vannamei*, with observations on the interaction of IHHN virus and salinity. *Aquaculture*. 122: 133–146.

Briggs, M., Funge-Smith, S., Subasinghe, R.P. y Phillips, M. 2005. Introducciones y movimiento de dos especies de camarones peneidos en Asia y el Pacífico. FAO Documento Técnico de Pesca. No. 476. Roma. 86 pp.

Brito, R., Chimal, M.E. y Rosas, C. 2000. Effect of salinity in survival, growth and osmotic capacity in early juveniles of *Farfantepenaeus brasiliensis* (Decapoda: Penaeidae). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 244: 252–263.

Bückle, L.F, Barón, B y Hernández, M. 2006. Osmoregulatory capacity of the shrimp *Litopenaeus vannamei* at different temperatures and salinities, and optimal culture environment. *Revista de Biología Tropical*. 54: 745-753.

Castille, F.L., Jr. y Lawrence, A.L. 1981. The effect of salinity on the osmotic, sodium and chloride concentrations in the hemolymph of euryhaline

shrimp of the genus *Penaeus*. Comparative Biochemistry and Physiology. 68A: 75–80.

Chang, P.S., Lo, C.F., Wang, Y.C. y Kou, G.H. 1996. Identification of white spot syndrome associated baculovirus (WSBV) in experimental infected wild shrimp, crabs and lobsters by in situ hybridation. Diseases of Aquatic Organisms. 27: 131-139.

Charmantier, G., Charmantier-Daures, M. y Towle, D. T. 2007. Chapter 6: Crustaceans. In Osmotic and ionic regulation: cells and animals (ed. D. H. Evans), En preparación.

Charmantier G. Bouaricha, N., Charmantier-Daures, M., Thuet, P. y Trilles, J.P. 1989. Salinity tolerance and osmoregulatory capacity as indicators of the physiological state of penaeid shrimps. European Aquaculture Society Special Publication. 10: 65-66.

Chou, H.Y., Huang, C.Y., Wang C.H., Chiang H.C. y Lo C.F. 1995. Pathogenicity of a baculovirus infection causing white spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Taiwan. Diseases of Aquatic Organisms. 23: 165–173.

Clavero-Salas, A., Sotelo-Mundo, R.R., Gollas-Galvan, T., Hernandez-Lopez, J., Peregrino-Uriarte A.B., Muhlia-Almazan A. y Yepiz-Plascencia G. 2007. Transcriptome analysis of gills from the white shrimp *Litopenaeus*

vannamei infected with White Spot Syndrome Virus. Fish and Shellfish Immunology. 23: 459-472.

Davis, D.A., Samocha, T.M. y Boyd, C.E. 2004. Acclimating Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*, to Inland, Low-Salinity Waters. Southern Regional Aquaculture Center, Publication No. 2601.

De la Rosa Vélez, J. 2006. La camaronicultura: Panorámica del desarrollo de una industria millonaria en México y el mundo. Revista Universitaria. UABC.

Díaz, F., Farfán, C., Sierra, E. y Re, A.D. 2001. Effects of temperature and salinity fluctuation on the ammonium excretion and osmoregulation of juveniles of *Penaeus vannamei*, Boone. Marine Freshwater Behavior and Physiology. 34: 93-04.

Díaz, F., Re A.D., Sierra, E. y Díaz-Iglesias, E. 2004. Effects of temperature and salinity fluctuation on the oxygen consumption, ammonium excretion and osmoregulation of the blue shrimp *Litopenaeus stylirostris* (stimpson). Journal of Shellfish Research. 23: 903–910.

Durand S., Lightner, D.V., Nunan L.M., Redman R.M., Mari J. y Bonami J.R. 1996. Application of gene probes as diagnostic tools for white spot baculovirus (WSBV) of penaeid shrimp. Diseases of Aquatic Organisms. 27: 59–66.

- Durand, S.V y Lightner, D.V. 2002. Quantitative real time PCR for the measurement of white spot syndrome virus in shrimp. *Journal of Fish Diseases*. 25: 381–389.
- Durand, S.V., Tang, K.F.J. y Lightner, D.V. 2003. Frozen commodity shrimp: potential avenue for introduction of white spot syndrome virus and yellow head virus. *Journal of Aquatic Organisms*. 27: 59-66.
- Escobedo-Bonilla, C.M., Alday-Sanz, V., Wille, M., Sorgeloos, P., Pensaert, M.B. y Nauwynck, H.J. 2008. A review on the morphology, molecular characterization, morphogenesis and pathogenesis of white spot syndrome virus. *Journal of Fish Diseases*. 31: 1–18.
- Escobedo-Bonilla C.M., Audoorn L., Wille M., Alday - Sanz V., Sorgeloos P., Pensaert M.B. y Nauwynck H.J. 2006. Standardized white spot syndrome virus (WSSV) inoculation procedures for intramuscular or oral routes. *Diseases of aquatic organisms*. 68: 181-188.
- FAO. 2007. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2006. Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO. Roma, Italia. p. 100-176.
- Flegel, T.W. 1997. Special topic review, major viral diseases of the black tiger prawn *Penaeus monodon* in Thailand. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 13: 433-442.

- Galavíz-Silva, L., Molina-Garza, Z.J., Alcocer-González, J.M., Rosales-Encinas, J.L. and Ibarra-Gámez, C. 2004. White spot syndrome virus genetic variants detected in Mexico by a new multiplex PCR method. *Aquaculture*. 242: 53-68.
- Giffard-Mena, I. y Martínez, L.C. 2003. Desarrollo del cultivo de camarón en el valle de Mexicali, Baja California, México. *Panorama Acuicola*. 8: 14-16.
- Gjedren T. 2003. Improvement of disease resistance through genetic improvement. *Global Aquaculture Advocate*. p. 33-34.
- Gong, H., Jiang, D.H., Lightner, D.V., Collins, C. y Brock, D. 2004. A dietary modification approach to improve the osmoregulatory capacity of *Litopenaeus vannamei* cultured in the Arizona desert. *Aquaculture Nutrition*. 10: 227-236.
- Hossain, S., Chakraborty, A., Joseph, B., Otta, S.K., Karunasagar I. y Karunasagar I. 2001. Detection of new hosts for white spot syndrome virus of shrimp using nested polymerase chain reaction. *Aquaculture*. 198: 1–11.
- Huang, J., Cai, S., Song, X., Wang, C., Yu, J. y Yang, C. 1995. Study on artificial infection for *Penaeus chinensis* by the pathogen of the explosive epidemic disease of shrimp. *Marine Fisheries Research*. 16: 51-58.

- Jiang, D. H., A. L. Lawrence, W. H. Neill y Gong, H. 2000. Effects of temperature and salinity on nitrogenous excretion by *Litopenaeus vannamei* juveniles. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 253: 193-209.
- Jiménez, R, Barniol, R, Barniol, L, Machuca, M, Romero, X. 2000. Viral-like particles associated with cuticular epithelium necrosis in cultured *Litopenaeus vannamei* (Decapoda: *Crustacea*) in Ecuador. *Aquaculture Research*. 31:519-528.
- Jiravanichpaisal, P., Bangyeekhun, E., Soderhall, K. y Soderhall, I. 2001. Experimental infection of white spot syndrome virus in freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *Diseases Aquatic Organisms*. 47: 151–157.
- Johansson, M.W., y Söderhäll, K. 1989. Cellular immunity in crustaceans and the proPO system. *Parasitology Today*. 5:171-176.
- Jory, D.E. 1999. Shrimp farms in the desert: a new direction for the industry. *Aquaculture Magazine*. 25: 72-79.
- Joseph, A. y Philip, R. 2007. Acute salinity stress alters the haemolymph metabolic profile of *Penaeus monodon* and reduces immunocompetence to white spot syndrome virus infection. *Aquaculture*. 272: 87-97.
- Kou G.H., Peng, S.E. Chiu, Y.L. y Lo, C. F. 1998. Tissue distribution of white spot syndrome virus (WSSV) in shrimp and crabs. *Advances in shrimp*

biotechnology. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok. p. 267-271.

Laramore S., Laramore, C.R. y Scarpa, J. 2001. Effect of low salinity on growth and survival of the Pacific white shrimp *Penaeus vannamei*. Journal of World Aquaculture Society. 32: 385-392.

Le Moullac, G., y Haffner, P., 2000. Environmental factors affecting immune responses in Crustacean. Aquaculture. 191: 121–131.

Leu, J.H., Tsai, J.M., Wang, H.C., Wang, A.H., Wang, C.H., Kou, G.H. y Lo, C.F. 2005. The unique stacked rings in the nucleocapsid of the white spot syndrome virus virion are formed by the major structural protein VP664, the largest viral structural protein ever found. Journal of Virology. 79: 140–149.

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 y Huang, H.C. 2007. Comparative analysis of differentially expressed genes in normal and white spot syndrome virus infected *Penaeus monodon*. Biomed Central Genomics. 8: 1471-2161.

Li, E., Chen, L., Zeng, C., Yu, N., Xiong, Z., Chen, X. y Qin, J.G. 2008. Comparison of digestive and antioxidant enzymes activities, haemolymph oxyhemocyanin contents and hepatopancreas histology of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, at various salinities. Aquaculture. 274: 80–86.

- Li, E.C., Chen, L.Q., Zeng, C., Chen, X.M., Yu, N., Lai, Q.M. y Qin, J.G., 2007a. Growth, body composition, respiration and ambient ammonia nitrogen tolerance of the juvenile white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, at different salinities. *Aquaculture*. 265: 385–390.
- Li, Z., Lin, Q., Chen, J., Wu, J.L., Lim, T.K., Loh, S.S., Tang, X. y Hew, C.L. 2007b. Shotgun identification of the structural proteome of shrimp white spot syndrome virus and iTRAQ differentiation of envelope and nucleocapsid subproteomes. *Molecular and Cellular Proteomics*. 6: 1609-1620.
- Lightner, D.V. 1996. A handbook of pathology and diagnostic procedures for diseases of penaeid shrimp. World Aquaculture Society. Baton Rouge. LA, USA. 304 pp.
- Lightner, D.V., Hasson, K.W., White, B.L., y Redman, R.M. 1998. Experimental infection of Western hemisphere penaeid shrimp with Asian white spot syndrome virus and Asian yellow head virus. *Aquatic Animal Health*. 10: 271-281.
- Lightner, D.V., Redman, R.M., Poulos, B.T., Nunan, L.M., Mari, J.L. y Hasson, K.W. 1997. Risk of spread of penaeid shrimp viruses in the Americas by international movement of live shrimp for aquaculture and frozen shrimp for commodity markets. *Review Scientific and Technical, Office International Epizooties*. 16: 146-160.

- Lignot, J.H., Spanings-Pierrot, C. y Charmantier, G. 2000. Osmoregulatory capacity as a tool in monitoring the physiological condition and the effect of stress in crustaceans. *Aquaculture*. 191: 209-245.
- Lignot, J.H., Cochrad, J.C., Soye, C., Lemaire, P. y Charmantier, G. 1999. Osmoregulatory capacity according to nutritional status, molt stage and body weight in *Penaeus stylirostris*. *Aquaculture*. 170: 79-92.
- Liu, B., Yu, Z., Song, X., Guan, Y., Jian, X. y He, J. 2006. The effect of acute salinity change on white spot syndrome (WSS) outbreaks in *Fenneropenaeus chinensis*. *Aquaculture*. 253: 163-170.
- Lo, C.F., Ho, C.H., Chen, C.H., Liu, Y.L., Yeh, P.Y., Peng, S.F., Hus, H.C., Chang, C.F., Su, M.S., Wang, C.H., y Kou, G.H. 1997. Detection and tissue tropism of white spot syndrome baculovirus (WSBV) captured brooders of *Penaeus monodon* with a special emphasis on reproductive organs. *Diseases of Aquatic Organisms*. 30: 53-72.
- López-Félix, S.C. 2002. Determinación y evaluación por PCR, de la presencia del virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV), en unidades de producción camaronícola del estado de Sinaloa. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Mazatlán, Sinaloa, México. 124 pp.

- Magbanua, F.O., Natividad, K.T., Migo, V.P., Alfafara, C.G., de la Peña F.O., Miranda, R.O., Albaladejo, J.D., Nadala, E.C.B. Jr., Loh, P.C. y Mahilum-Tapay, L. 2000 White spot syndrome virus (WSSV) in cultured *Penaeus monodon* in the Philippines. *Diseases of Aquatic Organisms*. 42: 77–82.
- Martin, G.G. y Hose, J.E. 1992. Vascular elements and blod (hemolymph). *Microscop Anat. Inv.* 10: 117-146.
- Martin, G.G., Quintero, M., Quigley, M. y Khosrovian, H. 2000. Elimination of sequestered material from the gills of decapod crustaceans. *Journal of Crustacean Biology*. 20: 209-217.
- Masek, T., Vopalensky, V., Suchomelova P. y Pospisek, M. 2005. Denaturing RNA electrophoresis in TAE agarose gels. *Analytical Biochemistry*. 336: 46-50.
- McGraw, W.J. y Scarpa, J. 2004. Mortality of freshwater-acclimated *Litopenaeus vannamei* associated with acclimation rate, habituation period, and ionic challenge. *Aquaculture*. 236: 285-296.
- McGraw, W.J., Davis, D.A., Teichert-Coddington, D. y Rouse, D.B., 2002. Acclimation of *Litopenaeus vannamei* postlarvae to low salinity: influence of age, salinity, endpoint and rate of salinity reduction. *Journal of the Word Aquaculture Society*. 33: 78–84.

- Méndez-Payan, J.C. 2003. Presencia y prevalencia de algunos agentes virales en granjas camaronícolas de Nayarit y Sinaloa, evaluadas mediante técnicas de biología molecular. Tesis de Maestría en Ciencias. Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas. Universidad de Sonora. Hermosillo, Sonora, México. 56 pp.
- Mijangos-Alquisires, Z.G. 2002. Detección del virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV) y otras enfermedades infecciosas en camarones silvestres de *Penaeus* (*Litopenaeus vannamei*) (Boone, 1931) frente a las costas de Sinaloa, México. Tesis de Maestría en Ciencias en Acuicultura. Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas. Universidad de Sonora. Hermosillo, Sonora, México. 81pp.
- Montesdeoca, M, Amano, Y., Echeverría, F., Betancourt, I., Panchana, F., Sotomayor, M. y Rodríguez, J 2002. La respuesta inmunitaria celular del camarón *Litopenaeus vannamei* al WSSV y su utilidad en el control de la enfermedad en los estanques. *El Mundo Acuícola* 8: 38-42.
- Morales C.M.S. 2007. Enfermedades de camarones peneidos causados por diferentes agentes patógenos en la camaronicultura de las Américas. *Industria Acuicola*. 6: 4-6.
- Nadala Jr., E.C.B, Tapay, L.M., Cao, S. y Loh, P.C. 1997. Detection of yellow head virus and Chinese baculovirus in penaeid shrimp by the Western blot technique. *Journal of Virology*. 69: 39–44.

- Nunan, L.M., Poulos, B.T. y Lightner, D.V. 1998. Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) used for the detection of Taura syndrome virus (TSV) in experimentally infected shrimp. *Disease of Aquatic Organisms*. 34:87–91.
- Ogle, J.T., Beaugez, K. y Lotz, J.M. 1992. Effects of salinity on survival and growth of postlarval *Penaeus vannamei*. *Gulf Research Reports* 8:415–421.
- Palacios, E., Bonilla, A., Luna, D. y Racotta, I.S. 2004. Survival, Na⁺/K⁺–ATPase and lipid responses to salinity challenge in fed and starved white pacific shrimp (*Litopenaeus vannamei*) postlarvae. *Aquaculture*. 234: 497–511.
- Panikkar, N. K. 1968. Osmotic behaviour of shrimps and prawns in relation to their biology and culture. *FAO Fisheries Report*. 57: 527-538.
- Passarelli, A.L. y Guarino, L.A. 2007. Baculoviruses late and very late gene regulation. *Current Drug Targets*. 8: 1103-1115
- Péqueux, A. 1995. Osmotic regulation in crustaceans. *Journal of Crustacean Biology*. 15: 1-60.
- Péqueux, A., Dandrifosse, G., Loret, S., Charmantier, G., Charmantier-Daures, M., Spanings-Pierrot, C. and y Schoffeniels, E. 2006 Osmoregulation : Morphological, physiological, biochemical, hormonal, and developmental

aspects. In: *The crustacean*. (Forest, J. y Klein, V. eds.) Editorial Brill. Leiden, Boston, EUA. 205-308 pp.

Pérez-Velázquez, M., González-Félix, M.L. y Jaimes-Bustamante, F. 2007a. Growth of *Litopenaeus vannamei* raised at extreme salinities. *Panorama Acuicola Magazine*. Nov-Dic, 46-53.

Pérez-Velásquez, M., González-Félix, M. L., Jaimes-Bustamante, F., Martínez-Córdova, L. R. y Trujillo-Villalba D. A., 2007b. Investigation of the effects of salinity and dietary protein level on growth and survival of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* *Journal of the World Aquaculture Society*. 38: 475-485.

Ponce-Palafox, J., Martínez Palacios, C.A. y Ross, L.G. 1997. The effects of salinity and temperature on the growth and survival rates of juvenile white shrimp *Penaeus vannamei* Boone 1931. *Aquaculture*. 157: 107-115.

Prior, S., Browdy, C.L., Shepard, E.F., Laramore, R. y Parnell, P.G., 2003. Controlled bioassay systems for determination of lethal infective doses of tissue homogenates containing taura syndrome or white spot syndrome virus. *Disease of Aquatic Organisms*. 54: 89-96.

Rahman M.M, Corteel, M., Escobedo-Bonilla, C.M., Wille, M., Alday-Sanz, V., Pensaert, M.B., Sorgeloos, P. y Nauwynck, H.J. 2008. Virulence of white spot syndrome virus (WSSV) isolates may be correlated with the degree

of replication in gills of *Penaeus vannamei* juveniles. Diseases of Aquatic Organisms. 79: 191-198.

Re, A.D., Díaz, F., Sierra, E. y Gómez-Jiménez, S. 2004. Oxygen consumption, ammonium excretion and osmoregulatory capacity of *Litopenaeus stylirostris* (Stimpson) exposed to different combinations of temperature and salinity. Ciencias Marinas. 30: 443-453.

Rodríguez, J., Bayot, B., Amano, Y., Panchana, F., de Blas, I., Alday, V. y Calderón, J. 2003. White spot syndrome virus infection in cultured *Penaeus vannamei* (Boone) in Ecuador with emphasis on histopathology y ultrastructure. Journal of Fish Diseases. 26: 439-450.

Rosas, C., López, N., Mercado, P. y Martínez, E. 2001. Effect of salinity acclimation on oxygen consumption of juvenile of the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Journal of Crustacean Biology. 21: 912–922.

Rosenberry, B. 2001. World shrimp farming 2000. In: Shrimp News International, USA (ed. B. Rosenberry), pp. 324. Shrimp News International, San Diego, CA, USA.

Rout, N., Citarasu, T., Ravindran, R. and Murugan, V. 2005. Transcriptional and translational expression profile of a white spot syndrome viral (WSSV) gene in different organs of infected shrimp. Aquaculture. 245: 31-38.

- Roy, L.A., Davis, D.A., Saoud, I.P. y Henry, R.P. 2007. Effects of varying levels of aqueous potassium and magnesium on survival, growth, and respiration of the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, reared in low salinity waters. *Aquaculture*. 262: 461-469.
- Sahul H.A.S., Yoganadhan, K., Sathish, S., Rasheed, M., Murugan, V. y Jayaraman, K. 2001. White spot syndrome virus (WSSV) in two species of freshwater crabs (*Paratelphusa hydrodomous* and *P. pulvinata*). *Aquaculture*. 201: 179–186.
- Sahul, H.A.S., M.X. Charles y M. Anilkmar. 2000. Tolerance of *Macrobrachium rosenbergii* to white spot syndrome virus. *Aquaculture*. 183: 207-213.
- Sambrook, J. y Russell. W. D. 2006. The Condensed Protocols from molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. 800 pp.
- Sang, H. M. y R. Fotedar. 2004. Growth, survival, haemolymph osmolality and organosomatic indices of the western king prawn (*Penaeus latisulcatus* Kishinouye, 1986) reared at different salinities. *Aquaculture*. 234:601–614.
- Saoud, I.P., Davis, D.A. y Rouse, D.B. 2003. Suitability studies of inland well waters for *Litopenaeus vannamei* culture. *Aquaculture*. 217: 373–383.

- Shahadat H.Md., Chakraborty, A., Joseph, B., Otta, S.K., Karunasagar, I. y Karunasagar, I. 2001. Detection of new hosts for white spot syndrome virus of shrimp using nested polymerase chain reaction. *Aquaculture*. 198: 1-11.
- Sudha, P.M., Mohan, C.V., Shankar, K.M. y Hegde, A.I. (1998): Relationship between white spot syndrome virus infection and clinical manifestation in Indian cultured penaeid shrimp. *Aquaculture*. 167: 95-101.
- Takahashi, Y., Itami, T., Kondo, M., Maeda, M., Fujii, R., Tomonaga, S., Supamattaya, K. y Boonyaratpalin, S. 1994. Electrón microscopic evidence of bacilliform virus infection in kuruma shrimp (*Penaeus japonicus*). *Fish Pathology*. 29: 121-125.
- Tan L.T, Soon, S., Lee, K.L., Shariff, M., Hassan, M.D y Omar, A.R. 2001. Quantitative analysis of an experimental white spot syndrome virus (WSSV) infection in *Penaeus monodon* (Fabricius) using competitive polymerase chain reaction. *Journal of Fish Diseases*. 24: 315-323.
- Tsai, J.M., Wang, H.C., Leu, J.H., Hsiao, H.H., Wang, H.A., Kou, G.H. y Lo, C. F. 2004. Genomic and proteomic analysis of thirty-nine structural proteins of shrimp white spot syndrome virus. *Journal of Virology*. 78: 11360–11370.

- Valdez, G., Díaz, F., Re, A.D. y Sierra, E. 2008. Efecto de la salinidad sobre la fisiología energética del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (Boone). Hidrobiológica. 18: 105-115.
- Valencia, Y.R. 2004. Estudio genómico de los aislados del virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV). Tesis de licenciatura en Biología. Facultad de Ciencias Marinas. Universidad Autónoma de Baja California. Ensenada, B.C. México. 81 pp.
- Vargas-Albores, F. y Ochoa, J.P. 1992. Variation of pH, osmolality, sodium and potassium concentrations in the haemolymph of sub-adult blue shrimp (*Penaeus stylirostris*) according to size. Comparative Biochemistry and Physiology. 102A: 1-5.
- Vázquez, L., Sierra, C., Juárez, S., Agundis, C., Zavala, A. y Zenteno, E. 1998. Mecanismos de inmunidad en crustáceos. Interciencia 23. 6: 344-348.
- Vega-Pérez, C. 2003. Detección de la presencia de los agentes patógenos el síndrome de la mancha blanca (WSSV), síndrome de Taura (TSV) y virus de cabeza amarilla (YHV), mediante técnicas moleculares, en granjas camaronícolas de la zona Noreste de México. Tesis de Maestría en Ciencias en Acuicultura, Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas. Universidad de Sonora, Hermosillo, Sonora, México. 56 p.

- Vidal, O.M., Granja C.B., Aranguren F., Brock J.A. y Salazar M. 2001. A profound effect of hyperthermia on survival of *Litopenaeus vannamei* juveniles infected with white spot syndrome virus. *Journal of World Aquaculture Society*. 32: 364-372.
- Villareal, H., Hernández-Llamas, A. y Hewitt, R. 2003. Effect of salinity on growth, survival and oxygen consumption of juvenile brown shrimp, *Farfantepenaeus californiensis* (Holmes). *Aquaculture Research*. 34: 187–193.
- Wang, C.H., Lo, C.F., Leu, C.M., Yeh, P.Y., Chou, H.Y., Tung, M.C., Chang C.F., Su, M.S. y Kou, G.H. 1995. Purification and genomic analysis of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) of *Penaeus monodon*. *Diseases of Aquatic Organisms*. 23: 239-242.
- Wang, Q., White, B.L., Redman. R.M. y Lightner, D.V. 1999. Per os challenge of *Litopenaeus vannamei* postlarvae and *Farfantepenaeus duorarum* juveniles with six geographics isolates of white spot syndrome virus. *Aquaculture*. 170: 179-194.
- Wu, J.L., Namikoshi, A., Nishizawa, T., Mushiake, K., Teruya, K. and Muroga, K. 2001. Effects of shrimp density on transmission of penaeid acute viremia in *Penaeus japonicus* by cannibalism and the waterborne route. *Diseases of Aquatic Organisms*. 47: 129–135.

- Yang, F., He, J., Lin, X.H., Li, Q., Deng, P., Zhang, X.B. y Xu, X. 2001.
Complete genome sequence of the shrimp white spot bacilliform virus.
Journal of Virology. 75: 11811–11820.
- Yoganandhan K, Sathish S, Murugan V, Narayanan R.B. y Sahul H.A.S. 2003.
Screening the organs for early detection of white spot syndrome virus in
penaeid shrimp by histopathology and PCR techniques. Aquaculture.
215: 21–29.
- Zar, J.H. 1999. Biostatistical Analysis. Fourth Edition. Department of Biological
Sciencie. Prentice hall. New Jersey. pp. 220-225.
- Zhu, C.B., Dong, S.L. y Wang, F. 2006. The interaction of salinity and Na/K ratio
in seawater on growth, nutrient retention and food conversion of juvenile
Litopenaeus vannamei. Journal of Shellfish Research. 25: 107-112.