

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



**EL USO DE LA PROSTAGLANDINA A1 COMO AGENTE
ANTIVIRAL EN PENEÍDOS.**

T E S I S

**QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS
PARA OBTENER EL GRADO DE**

MAESTRO EN CIENCIAS EN OCEANOGRAFIA COSTERA

PRESENTA

SELMA MIKI TAKAYAMA

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA, MEXICO. ENERO de 2007

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS
POSGRADO EN OCEANOGRAFÍA COSTERA

**El uso de la prostaglandina A1 como agente
antiviral en peneidos**

TESIS

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

Maestro en Ciencias en Oceanografía Costera

PRESENTA

Selma Miki Takayama

Aprobada por:



Dr. Jorge de la Rosa Vélez
Presidente del jurado

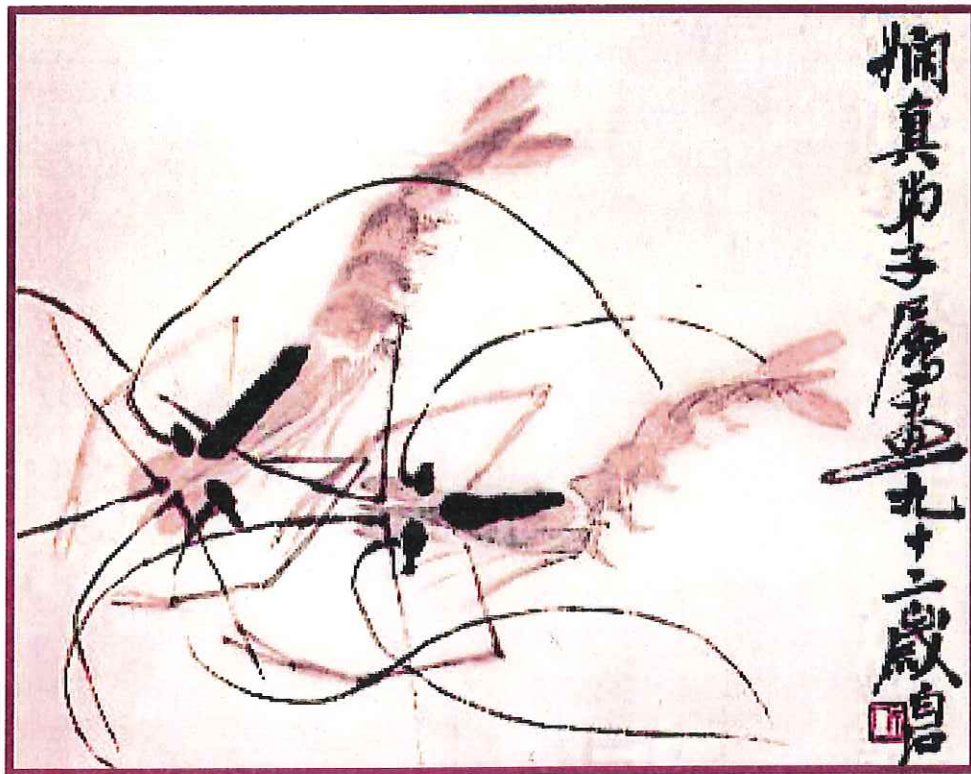


Dr. Alexei Fedorovich Licea Navarro
Sinodal



M.C. Herón Antonio Silva Loera
Sinodal

El Uso de la Prostaglandina A1 como Agente Antiviral en Peneidos.



Selma Miki Takayama

Agradecimientos

Agradezco primeramente a mi querido papá mexicano Jorge por todo el apoyo que me ha dado, tanto como papá, como amigo y como director de tesis.

Al Dr. Alexei Licea y Mc. Antonio Silva por las importantes contribuciones esenciales para la realización de este trabajo.

A mi familia por todo el amor, formación e apoyo que me dieron.

Agradezco también a Marce, Léo y Fernando por recibirme en su casa y hacerme sentir como en una gran familia.

A mis queridos amigos Cris, Déa, Mariana, Santa, Abraham, Polo, Paola, Fabi, Paula, Joe, ... (seguro se me olvida alguien, perdón), que mismo de lejos o de cerca siempre estuvieron presentes para proporcionarme apoyo y momentos de alegría.

A mis colegas y amigos del Lab. de Ecología Molecular: Ricardo, Jimena, Sandra, Luís, Yenelli, Josefina, Carmen, Yoli, Simona, Francesca y Filipo, por hacer de los momentos de labor, momentos divertidos y agradables.

A todos los funcionarios y amigos de la UABC, en especial a los de la Facultad de Ciencias Marinas, que de alguna forma directa o indirecta contribuyeron con este trabajo.

A AquaPacific, en especial a Joel y Marino por todo el apoyo sin el cual no sería posible la realización de este trabajo.

Al Dr. Stephano por el soporte técnico que fue de esencial importancia.

A CONACYT por el apoyo económico provisto por el proyecto n°. 4709 y igualmente a la U.A.B.C. por el apoyo brindado por el proyecto n°. 333.

Índice

Agradecimientos _____	ii
Índice _____	ii
Lista De Figuras _____	ii
Introducción _____	2
Camaronicultura _____	2
Biología y Ciclo de Vida de Peneidos _____	2
Enfermedades _____	2
WSSV _____	2
Distribución _____	2
Caracterización y Signos _____	2
Transmisión _____	2
Sistema de Defensa del Camarón _____	2
Sistema profenoloxidasa (proPO) _____	2
Fagocitosis _____	2
La influencia de la Temperatura en Infecciones Virales _____	2
Proteínas de Choque Térmico (HSP) _____	2
Prostaglandinas _____	2
Antecedentes _____	2
Hipótesis _____	2
Objetivos _____	2
Materiales y Métodos _____	2
Fase I _____	2
Bioensayo Hipertermia _____	2
Extracción de ARN total _____	2
Síntesis de ADN complementario _____	2
Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) _____	2
Bioensayo de Prostaglandina A1 _____	2
Extracción de ARNt, síntesis de ADNc y PCR _____	2
Histología _____	2
Fase II _____	2
Bioensayo Prostaglandina A1/ Hipertermia X WSSV _____	2

Extracción de Proteínas _____	2
SDS- PAGE _____	2
Electrotransferencia _____	2
Western Blot _____	2
Resultados _____	2
PCR a partir de ADN Complementario _____	2
Histología _____	2
Bioensayo PGA1/ Hipertermia X WSSV _____	2
Inducción de las HSPs 70 inducibles _____	2
Discusión _____	2
Bibliografía _____	2
Anexos _____	2
Anexo 01 _____	2
Protocolo de extracción de ARN _____	2
Anexo 02 _____	2
Protocolo para gel de agarosa para ARN - 1% _____	2
Protocolo para MOPS 10X, pH 7.0 _____	2
Anexo 03 _____	2
Protocolo para sintetización de ADN complementario _____	2
Anexo 04 _____	2
Protocolo de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) _____	2
Anexo 05 _____	2
Solución Davidson (1 Litro) _____	2
Anexo 06 _____	2
Inclusión en parafina utilizando procesador de tejidos automático _____	2
Anexo 07 _____	2
Inóculo de WSSV _____	2
Anexo 08 _____	2
Inóculo de prostaglandina A1 _____	2
Anexo 09 _____	2
Solución anticoagulante _____	2
Anexo 10 _____	2
Solución inicial de Bis/ Acrilamida (30%) _____	2
Anexo 11 _____	2
Amortiguador Tris - Cl / SDS (1.5M, 0.4 % SDS, pH 8.8) _____	2
Anexo 12 _____	2
Amortiguador Tris - Cl / SDS (0.5M, 0.4 % SDS, pH 6.8) _____	2

Anexo 13	2
Amortiguador de Electroforesis (5 X)	2
Anexo 14	2
Amortiguador de muestra	2
Anexo 15	2
Gel de Poliacrilamida - Apilamento (3.9 % Acrilamida)	2
Anexo 16	2
Gel de Poliacrilamida - Separación (10 % Acrilamida)	2
Anexo 17	2
Amortiguador de extracción de proteínas	2
Anexo 18	2
Amortiguador de transferencia	2
Anexo 19	2
Solución bloqueadora para membrana PVDF (WesternBreeze)	2
Anexo 20	2
Solución de anticuerpos primarios	2
Anexo 21	2
Solución de lavado	2
Anexo 22	2
Alineamiento realizado en el GenBank	2
Clave de las secuencias comparadas en alineamiento.	2

Lista de figuras

- Figura 01** - Incremento de la contribución de la acuicultura al total de la producción de camarones a nivel mundial a lo largo de los años. Pág. 01
- Figura 02** - Micrografía electrónica mostrando estructura viral de WSSV (Cortesía Dr. Bonami). Pág. 09
- Fig.03**- Extracción de hemolinfa a partir de la base de los pleópodos. Pág. 32
- Figura 04** -Procedimientos para la fijación de los camarones para fines histológicos. Pág. 36
- Figura 05** -Preparación de las muestras para la inclusión en bloques de parafina. Fuente: (Lightner, 1996) Pág. 37
- Figura 06** - Emparedado para la electrotransferencia de proteínas para membrana de PVDF. Pág. 41
- Figura 07**- Gel de agarosa con productos de PCR de hsp 70 de organismos control, tratados por hipertermia y PGA 1. Pág. 43
- Figura 08** - Alineamiento de la secuencia de Hsc 70 de *Fenneropenaeus chinensis* mostrando alto grado de similitud (%) entre secuencias de las hsp70 de diferentes especies de camarón. Pág. 44
- Figura 09** - Inducción de proteínas de peso molecular aproximado a 70 kDa por tratamiento con prostaglandina A1 en diferentes concentraciones a lo largo del tiempo. Pág. 45
- Figura 10** - Corte histológico del hepatopancreas de un organismo sano con aumento 10X - tinción HeEo Pág. 47
- Figura 11** - Corte histológico del hepatopancreas de un organismo tratado con PGA1 a una concentración de 30 µg/ml, con aumento de 10X -HeEo Pág. 47
- Figura 12** - SDS-PAGE de proteínas de branquias de camarones de los diferentes tratamientos a los tiempos de 3 y 6 horas, postratamiento. Pág. 50

Figura 13 - Western blot de proteínas de branquias de camarones infectados y sanos de los diferentes tratamientos a los tiempos de 3 y 6 horas postratamiento. Pág. 51

Figura 14 - SDS-PAGE de proteínas de branquias de camarones de los diferentes tratamientos a los tiempos de 12 y 24 horas postratamiento. Pág. 51

Figura 15 - Western blot de proteínas de branquias de camarones infectados y sanos de los diferentes tratamientos a los tiempos de 12 y 24 horas postratamiento. Pág. 52

Figura 16 - SDS-PAGE de proteínas de branquias de camarones de los diferentes tratamientos a los tiempos de 48 y 72 horas postratamiento. Pág. 52

Figura 17 - Western blot de proteínas de branquias de camarones infectados y sanos de los diferentes tratamientos a los tiempos de 48 y 72 horas postratamiento. Pág. 53

Figura 18 - SDS-PAGE de proteínas de branquias de camarones moribundos de los diferentes tratamientos. Pág. 53

Figura 19 - Western blot de proteínas de branquias de camarones moribundos de los diferentes tratamientos. Pág. 54

Figura 20 - Esquema del ciclo de temperaturas durante la reacción de síntesis de ADNc. Pág. 73

Figura 21 - Esquema del ciclo de temperaturas en la reacción de PCR. Pág. 74

Grafico 01 Supervivencia (%) de los organismos control y sometidos a los diferentes tratamientos. Pág. 48

Resumen

Debido a las dificultades de un rápido diagnóstico y eficiente tratamiento de las enfermedades virales en el cultivo de camarones, se hace importante la investigación de soluciones para minimizar las enormes pérdidas económicas ocasionadas por tales enfermedades. En los últimos años han surgido evidencias de que la hipertermia altera el proceso de infección viral en los camarones peneídos, siendo que fueron observadas bajas mortalidades de los organismos infectados cuando estos fueron sometidos a temperaturas extremas. Condiciones ambientales adversas inducen la síntesis de las proteínas de choque térmico (hsp), que evitan la desnaturalización de las proteínas en la célula. Las hsps también pueden ser inducidas por algunas sustancias químicas como las prostaglandinas ciclopentenonas (PGA y PGJ). La inducción de estas proteínas está asociada con una propiedad antiviral por parte de estas sustancias contra diversos tipos de virus. Con la finalidad de comprobar esta propiedad, camarones infectados con el virus de la mancha blanca (WSSV) fueron inyectados con un inóculo de PGA1 a una concentración de 30 µg/ml, un segundo grupo de organismos infectados fueron sometidos a tratamiento de hipertermia para comparar las tasas de mortalidad entre los dos tratamientos. Por medio de la técnica de western blot se pudo observar una inducción positiva de las hsps en todos los tratamientos. No fueron observadas diferencias de

mortalidad entre los organismos infectados tratados con PGA1 y aquellos infectados que no recibieron ningún tipo de tratamiento, sin embargo, no se observó mortalidades en los organismos infectados sometidos a hipertermia hasta más de 20 días de bioensayo. Los resultados obtenidos indican que a pesar de la evidencia de una inducción positiva de las hsps por los organismos tratados con PGA1, este tratamiento no proveyó una protección efectiva contra la infección de WSSV en *Litopennaeus vannamei*. Además se constató que la infección viral por si misma produce la inducción de las hsps, lo que parece indicar que la estimulación de la expresión de tales proteínas por parte del tratamiento de hipertermia, que si protegió los organismos ante el reto de la infección, no es el factor protector, sino que la hipertermia induce otro tipo de moléculas o mecanismos aún desconocidos que actúan en la protección del camarón ante las enfermedades virales.

Abstract

Because of the difficulty in treatment and early diagnostic of the viral diseases in shrimp culture, the research for new solutions to avoid the enormous economic losses is very important. Evidences have been showed in the last years that hyperthermia can alter the viral infection process in shrimp. Low mortalities were observed when the organisms are kept in extreme

temperatures. Adverse environment condition induces the production of the heat shock proteins (hsp) which avoid the denaturalization of the proteins in the cell. The hsps also can be induced by some chemical substances like the cyclopentenone prostaglandins (PGA and PGJ). The induction of the hsps is associated with the antiviral property of the prostaglandins against various types of viruses. With the purpose to prove this property, shrimps infected by white spot syndrome virus (WSSV) was injected with an inoculum of PGA1 at a concentration of 30 µg/ml, a second group was kept into a hyperthermic treatment (34° C) to compare the rate of mortality between both treatments. The induction of hsps was showed in all treatments by the Western blot technique. No difference in mortality was observed between PGA1 treated infected organism and those infected with no treatment. However, no mortality was noted in those organisms kept in hyperthermia treatment until 20 days of essay. These results show that in spite of the positive induction of the hsps by the PGA1 treated infected organisms, this treatment did not provide effective protection against the infection of WSSV in *Litopennaeus vannamei*. Also, it was checked that the viral infection by itself induces the hsps. This shows that the stimulation of expression of these proteins by hyperthermia, is not the factor that protects, but the hyperthermia induce another type of molecules or mechanisms still unknown that acts in the protection of the shrimp in front of viral diseases.

Introducción

Camaronicultura

El camarón es considerado uno de los productos pesqueros más importantes a nivel mundial, con una producción total estimada para 2005 de 3.2 millones de toneladas, que significa un valor cercano al billón de dólares (de la Rosa-Vélez, 2006). Del total de camarones disponible en el mercado, el 50 % proviene de la camaronicultura.

La camaronicultura es una rama importante de la acuicultura que se dedica a cultivar camarones tanto de agua dulce cuanto marinos. El cultivo moderno de camarones empezó en los años 30, cuando el investigador japonés Motosaku Fujinaga logró la reproducción exitosa de *Penaeus japonicus*. Este investigador cultivó las larvas hasta alcanzar la talla comercial en el laboratorio y lo llevó a escala comercial (de la Rosa-Vélez, 2006). En mediados de los años 70, la producción global de camarones cultivados empezó a aumentar rápidamente alcanzando 22,600 toneladas métricas en 1975. En la siguiente década, la producción creció a 200,000 toneladas métricas, de los cuales el 75% provenían de Asia. En 1988, la producción aumentó rápidamente excediendo las 560,000 toneladas métricas (Briggs et al., 2004).

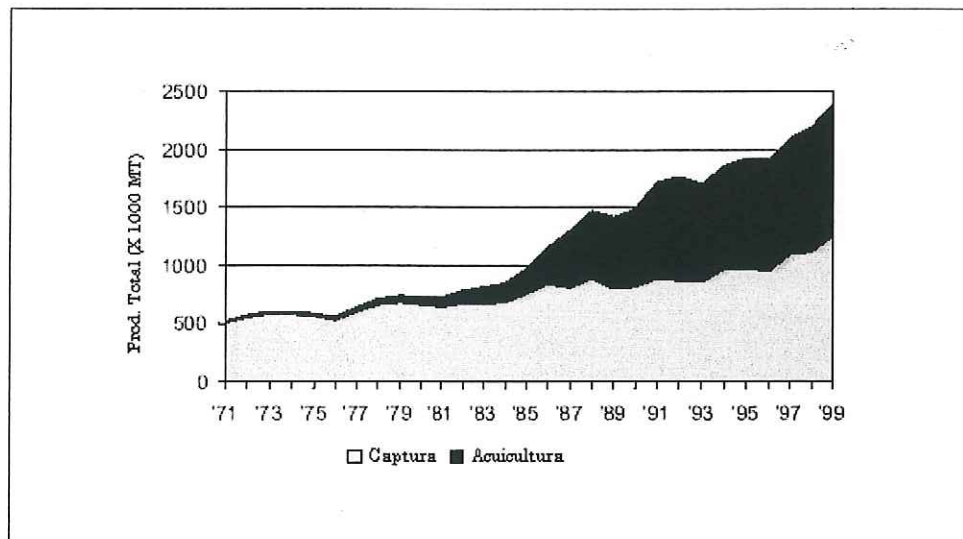


Figura 01 – Incremento de la contribución de la acuicultura al total de la producción de camarones a nivel mundial a lo largo de los años.

El Asia es considerada respecto al camarón comercial el área más productiva, ya que contribuye con la quinta parte de la producción mundial. Entre los principales países productores de camarón están: Tailandia, China, Vietnam, Indonesia, India, Ecuador, Brasil, México y Colombia.

En México, el cultivo de camarón se inició en mediados de los años 80, incrementándose progresivamente el área de cultivo y la producción en los últimos años, de manera que actualmente, en el ámbito mundial, ocupa el noveno lugar con una producción en 2005 de 14 000 toneladas, siendo los

estados de Sinaloa, Sonora, Nayarit y Tamaulipas los principales estados productores (Bustamante, 2001).

Después del rápido crecimiento de la industria camaronera, ésta sufrió la primera reducción severa de su producción en mediados de los años 90, debido a problemas técnicos relacionados con el cultivo intensivo, la mano de obra poco calificada, la selección inadecuada del sitio de cultivo, condiciones de cultivo y manejo inadecuados, sobreutilización de una misma área, lo que condujo a una degradación y empobrecimiento de las condiciones ambientales del cultivo, favoreciendo el surgimiento de enfermedades (Sangamaheswaran y Jeyaseelan, 2001).

Biología y Ciclo de Vida de Peneidos

Globalmente, los camarones marinos dominan la acuicultura de crustáceos con tres principales especies: *P. monodon*, *P. chinensis* y *L. vannamei*, que significaron más del 75% de la producción total en 2002 (Briggs et al., 2004) 2004) .

La FAO (Food and Agriculture Organization) enlistó 343 especies de camarones que son consideradas actualmente como potencialmente importantes. De estas, 110 especies pertenecen a la familia *Penaeidae* e incluyen

cerca de 80% de los camarones silvestres capturados en el mundo (Bailey-Brock y Moss, 1992).

Los camarones peneidos pertenecen al phylum más abundante del reino *Animalia*, es decir, el phylum *Arthropoda*, cuyos integrantes se caracterizan por poseer apéndices articulados y un exoesqueleto o cutícula rígida que debe ser mudada periódicamente. El subphylum *Crustacea* es predominantemente acuático, y la mayoría de los crustáceos de importancia comercial pertenecen a la clase *Malacostraca*, donde están incluidos los camarones peneidos, que pertenecen a la orden *Decapoda*, suborden *Dendrobranchiata*, superfamilia *Penaeidea*, familia *Penaeidae* (Bailey-Brock y Moss, 1992).

Los peneidos tienen un ciclo de vida complejo que incluye varias fases de vida que habitan diferentes hábitats. La reproducción y desove ocurren en aguas oceánicas, donde los huevos son liberados por la hembra simultáneamente con el esperma. La fertilización es externa y los huevos se desarrollan en la columna de agua. El primero estadio larval es el nauplio; en este estadio la larva posee movimientos limitados y prácticamente deriva en la superficie del agua, formando parte del zooplacton marino. Su nutrición depende exclusivamente de la reserva vitelina. Después de pasar por cinco o seis estadios de nauplio, la larva pasa al estadio de protozoa. En este estadio, la larva desarrolla los apéndices que le da la capacidad de manipular su alimento, siendo un estadio crítico para el organismo, pues tiene que adaptarse a alimentarse por si mismo

del fitoplancton y microorganismos zooplanctónicos presentes en el medio. En el estadio de mysis el organismo desarrolla los apéndices torácicos para la natación. En el estadio de megalopa ya posee todos los apéndices locomotores, tanto los utilizados para la natación (pleópodos), como aquellos utilizados para caminar (pereópodos). En la fase juvenil los organismos migran a aguas costeras someras y de menor salinidad, donde hay abundancia de materia orgánica y ahí permanecen hasta terminar su desarrollo. Después, empiezan a migrar nuevamente a aguas oceánicas en el estadio adulto, cuando alcanzan la madurez sexual, y forman parte de la comunidad bentónica (FAO, 2003).

El camarón blanco del Pacífico, *L. vannamei*, es un crustáceo común en los sistemas estuarinos de zonas tropicales y subtropicales. Su distribución es amplia; abarca desde la parte norte del Golfo de California, hasta la costa norte de Perú y las islas Galápagos en el Ecuador. *L. vannamei* fue introducido en varios países de la América Central y del Sur reemplazando el cultivo de *L. stylirostris* en muchos países. Esto debido a que tiene una tasa de crecimiento más rápida y soporta ser cultivado en altas densidades por el hecho de ser menos agresivo cuando se compara con *P. monodon* y *L. stylirostris*. También es considerada la especie más resistente a las enfermedades virales en general en comparación con otros peneidos cultivados. Sin embargo es altamente susceptible a WSSV (White Spot Syndrome Virus) y TSV (Taura Syndrome Virus), además de ser portador de IHHNV (Infectious Hipodermal and

Haematopoietic Necrosis virus) y LOVV (Lymphoid Organ Vacuolization Virus), mientras que *P. monodon* es considerado altamente susceptible a YHV (Yellow Head Virus) y WSSV, pero resistente a IHHNV o TSV (Briggs et al., 2004).

Enfermedades

Al mismo ritmo que la camaronicultura fue avanzando, las enfermedades en los cultivos fueron surgiendo, principalmente aquellas de origen viral, las cuales causaron súbitas mortalidades masivas que provocaron enormes pérdidas económicas. Una de las principales causas por la cual las enfermedades se difundieron tan rápido por el mundo se debe a la gran movilización de especies vivas, congelados o insumos requeridos en la producción; de este modo se introdujeron especies patógenas a nuevas áreas geográficas (Subasinghe et al., 2001).

Lotz et al. (1995) clasificaron los patógenos que afectan los camarones en tres categorías basadas en su patogenicidad y el peligro para la industria y el cultivo de camarón: los patógenos de la categoría 3 (C3) son aquellos que causan un impacto mínimo y actúan de forma crónica; los de la categoría 2 (C2) ocasionan un daño relativo que afecta la productividad mediante la reducción de la tasa de crecimiento y la disminución de la tasa de supervivencia; y

finalmente los de la categoría 1 (C1) son los patógenos más peligrosos, que ocasionan mortalidades masivas y provocan grandes perjuicios económicos. Los agentes pertenecientes a esta categoría son altamente patogénicos y no existe tratamiento curativo para su control, por lo que se han convertido en la mayor preocupación para la industria camaronera. En esta categoría se incluyen los cuatro virus que han producido las epizootias más devastadoras para la industria camaronícola: WSSV, YHV, IHHNV y TSV.

Las enfermedades que sufre el camarón pueden tener su origen en agentes patógenos como los virus u otros microbios, en algún desequilibrio del ambiente, en algún aspecto nutricional o en factores genéticos. Más comúnmente, múltiples agentes pueden ocasionar la enfermedad, lo que hace complicado el diagnóstico. Por ejemplo, una enfermedad viral generalmente es acompañada por una infestación bacteriana epicomensal secundaria, que puede ser la causa de la muerte en camarones severamente afectados por una infección viral inicial (Lightner y Redman, 1998).

El modo de transmisión de las enfermedades virales puede ser por ingestión de organismos infectados o por contacto con agua contaminada por virus. Hay evidencias de que algunas enfermedades virales puedan ser transmitidas verticalmente, o sea, de madre para la progenie, como fue demostrado para el IHHNV que puede adherirse al huevo y contaminar la

larva en el momento de la eclosión. Otra posibilidad es que el virus puede ser transferido a la larva por intermedio del oocito (Lotz, 1997).

Según la OIE (Organización Mundial de Salud Animal), las principales enfermedades virales que afectan a los crustáceos actualmente son el síndrome de la mancha blanca (WSSV), el síndrome de la cabeza amarilla (YHV), el síndrome de Taura, la baculovirus tetraédrica, la baculovirus esférica, la necrosis infecciosa hipodérmica y hematopoyética (IHHNV), el virus de la enfermedad de la mortalidad aislada de Spawner y la plaga del lagostino (*Anphanomyces astaci*), todas ellas provocadas por virus, con excepción de la última (OIE, 2003).

WSSV

Distribución

El virus de la Mancha Blanca surgió a principios de la década de los 90 en Asia; y fue detectado por primera vez en cultivos de *P. chinensis* en China en 1992 (Sathish et al., 2004). El virus se esparció rápidamente por toda Asia y posteriormente al resto del mundo. En los Estados Unidos fue detectado por primera vez en Texas, en 1995, en un cultivo de *Litopenaeus setiferus* (Lightner y Redman, 1998). En 1999, el WSSV empezó a afectar los cultivos de la América Latina; su presencia fue detectada inicialmente en Honduras, Guatemala,

Nicaragua y Panamá, en América Central, Ecuador y Perú, en la América del Sur, y posteriormente en México (Briggs et al., 2004).

Actualmente, el WSSV es considerada la enfermedad viral de mayor importancia, principalmente por causa de las enormes pérdidas económicas que esta enfermedad ocasiona (Hameed et al., 2002). La mayoría de los camarones peneidos son susceptibles al WSSV y se ha demostrado que este virus puede infectar una gran diversidad de crustáceos, incluyendo copépodos y diversas especies de cangrejos, incluso los de agua dulce (Wang et al., 1998; Rajendran et al., 1999; Corbel et al., 2001).

Caracterización y Signos

El WSSV pertenece al género *Whispovirus* de la familia *Nimaviridae*. Es caracterizado por tener un genoma de doble cadena de ADN, envoltura trilaminar (Durand et al., 1997) y una estructura semejante a una cola en una de sus extremidades, de función desconocida (figura 02). Su genoma contiene aproximadamente 300 kbp, con la capacidad de codificar más de 180 proteínas diferentes incluyendo algunas enzimas involucradas en el metabolismo del ácido nucleico y la replicación del ADN, una proteína del tipo colágeno y proteínas estructurales. Estos virus en general se encuentran en el núcleo, causando una notable hipertrofia (OIE, 2003).

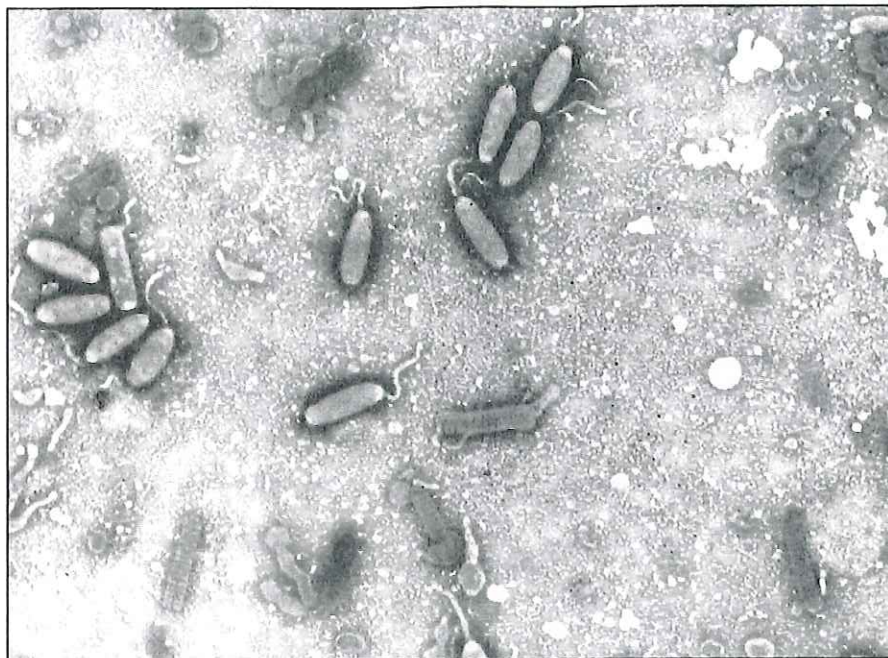


Figura 02 – Micrografía electrónica mostrando estructura viral de WSSV (Cortesía Dr. Bonami).

La infección por WSSV causa un comportamiento letárgico de los animales afectados; estos dejan de alimentarse, y adquieren una apariencia moribunda en pocos días. Al alcanzar esta etapa, los camarones generalmente nadan cerca de la superficie, en los extremos de los estanques. Poseen color rojizo característico, debido a la expansión de los cromatóforos, y pueden presentar inclusiones de color blanco en la cutícula, sin embargo, algunas veces estas manchas blancas no son fácilmente visibles o pueden ser provocadas por otros factores como infecciones bacterianas, altas alcalinidades u otros factores ambientales (OIE, 2003). Finalmente, sucede una rápida y masiva mortalidad, que puede alcanzar el 100% de la población cultivada en menos de una semana.

Los órganos afectados son principalmente el órgano linfoide, el tejido conectivo, epidermis cuticular, tejido hematopoiético, branquias y la glándula antenal (Wang et al., 1997).

Transmisión

La transmisión ocurre principalmente cuando los organismos sanos ingieren tejido contaminado por virus de organismos muertos o moribundos o cuando entran en contacto con agua contaminada por este patógeno (Sangamaheswaran y Jeyaseelan, 2001). Hammed (2002) demostró que los nauplios de *Artemia* no transmiten esta enfermedad a los camarones, ya sea cuando entran en contacto con el agua o el alimento contaminados con WSSV (Hameed et al., 2002).

En la actualidad no se tiene conocimiento del proceso de replicación de WSSV en las células huésped. Se especula que pudiera ser similar al de algunos baculovirus; es decir, inicia con la unión del virión en la célula huésped por medio del reconocimiento específico en la superficie de la célula (absorción); continua con la penetración y desnudamiento del genoma viral, para finalizar con la replicación del virus mediante la síntesis de proteínas virales y de su ácido nucleico. La síntesis de proteínas virales estructurales podrá ocurrir concurrentemente con la síntesis del ácido nucleico viral. La maduración de los nuevos viriones comienza con el ensamblaje de los genomas y proteínas

estructurales que llegan a estar disponibles y, finalmente, se alcanza la etapa de liberación de los nuevos viriones, la cual ocurre de diferentes maneras, dependiendo de la naturaleza de la célula huésped y de los viriones (Félix, 2002).

Sistema de Defensa del Camarón

El primero sistema de defensa del camarón es su resistente cutícula. Este tiene un papel fundamental actuando como una eficiente barrera física.

Estos organismos no cuentan con un sistema inmune específico ni con capacidad de memoria, lo que impide la utilización de vacunas eficientes. (Rendón y Balcázar, 2003). Sin embargo, las evidencias demuestran que el sistema inmune de los invertebrados es capaz de reconocer un gran grupo de patógenos, representados por patrones moleculares comunes, así como estructuras, o específicamente a microbios. El reconocimiento de organismos invasores es mediado por hemocitos y proteínas plasmáticas (Bachère, 2000).

Una vez que el material no propio es detectado, los hemocitos migran al sitio de invasión por proceso de quimiotaxis, resultando en un proceso de inflamación.

Los crustáceos poseen un sistema circulatorio abierto; por lo tanto, demandan una rápida y eficiente respuesta por parte del organismo, en lo cual

el sistema de cascada proteolíticas tiene un papel fundamental (Sritunyalucksana, 2001).

El sistema de defensa de los camarones está basado en efectores celulares y humorales, los cuales se conjugan para eliminar microorganismos potencialmente infecciosos. Los principales mecanismos de defensa celular son la fagocitosis, encapsulación, citotoxicidad mediada por la célula y coagulación. Entre los mecanismos humorales podemos citar las proteínas de coagulación, aglutininas, enzimas hidrolíticas y péptidos antimicrobianos (Braak, 2002).

Los hemocitos constituyen la fracción celular de la hemolinfa y son cruciales para la defensa ya que son capaces de fagocitar, encapsular, formar nódulos y de producir citotoxicidad. Se han utilizado diferentes criterios para identificar y clasificar los hemocitos: morfológicos, antigénicos y funcionales. Con base en ello se han descrito tres tipos de hemocitos: hialinos, semigranulosos y granulosos (Rodríguez et al., 1995).

Hemocitos hialinos

Presentan un delgado citoplasma basófilo, un núcleo amplio y céntrico. Son células que se adhieren y se extienden fácilmente, no contienen gránulos densos. Los hemocitos hialinos tienen capacidad fagocítica. Intervienen en la coagulación y no son refringentes en el microscopio de contraste de fases (Braak, 2002).

Hemocitos semigranulosos

Poseen un núcleo esférico o en forma de herradura y muchos gránulos pequeños de forma redondeada. En los camarones, estas células intervienen en la fagocitosis, encapsulación y en la liberación del sistema de profenoloxidasa (proPO).

Hemocitos granulosos

Se caracterizan por ser células grandes. Posen grandes gránulos, alta relación citoplasma-núcleo e inclusiones citoplasmáticas, así como un retículo endoplásmico liso y ribosomas libres en citoplasma. Estos hemocitos almacenan las enzimas que constituyen el sistema proPO en los crustáceos a un nivel más alto que los semigranulosos. Estas enzimas son liberadas por exocitosis cuando estos hemocitos son estimulados por la peroxinectina y la proteína fijadora de β -glucanos. Al igual que los hemocitos SG, sintetizan y almacenan las peneidinas. Intervienen además en el mecanismo de encapsulación (Destoumieux et al., 2000).

Sistema profenoloxidasa (proPO)

El sistema de defensa más estudiado en los crustáceos es el sistema proPO. Este tiene un papel fundamental en el reconocimiento de partículas no

propias, comunicación de hemocitos y producción de melanina. Después de la activación y degranulación de los hemocitos, el proPO inactivo es convertido en fenoloxidasa por la enzima activadora de profenoloxidasa (ppA). La enzima fenoloxidasa (PO) cataliza la oxidación de fenoles a quinonas, seguido por varios pasos intermedios que llevan a la formación de melanina. Algunos factores microbianos también son sintetizados durante esta formación. La melanina es un pigmento café oscuro que secuestra a los patógenos, previniendo así su contacto con el hospedero (Braak, 2002).

Otro factor importante que está asociado con la proPO es la peroxinectina, que fue recientemente clonada de *P. monodon*. La peroxinectina tiene dos funciones diferentes: la adhesión celular y la actividad de peroxidasa. La peroxinectina es sintetizada en los hemocitos, almacenada en las glándulas secretoras en la forma inactiva y liberada en respuesta a un estímulo y activada fuera de las células (Sritunyalucksana, 2001).

Fagocitosis

Es una reacción de defensa celular. La eliminación del material particulado en los crustáceos la realizan dos tipos de células: los hemocitos libres y los fagocitos fijos (en los sinus hemales del hepatopancreas en la mayoría de los decápodos). Jonson (1987) menciona que la fagocitosis es la eliminación de materiales extraños del homocel de crustáceos decápodos,

donde se ven involucradas varias clases de células. Proteínas y pequeños virus son eliminados por los podocitos, células especializadas en picnocitosis, ubicadas en las branquias y en la glándula antenal. La fagocitosis junto con otros mecanismos humorales constituye la primera línea de defensa inmunitaria cuando una partícula atraviesa la primera barrera de defensa que constituye la cutícula.

Después de la ingestión, los hemocitos de los camarones, así como las células sanguíneas de los vertebrados, usan radicales de oxígeno citotóxicos para matar las células invasoras. Si una gran cantidad de partículas entran en el cuerpo o si este es muy grande para ser internado, varios hemocitos van cooperar entre si para sellar al patógeno. Este fenómeno es llamado formación de nódulo y encapsulación, respectivamente (Braak, 2002).

Nodulación

En los nódulos, los agentes extraños son aprisionados por varias capas de hemocitos, formando pequeñas cápsulas desde las cuales ciertos hemocitos se desprenden y se infiltran en la masa bacteriana intentando fagocitarla.

Encapsulación

La encapsulación es un tipo de respuesta multicelular para eliminar partículas extrañas que no pueden ser destruidas por los mecanismos

humorales. Cuando una partícula es demasiado grande para ser fagocitada, muchos hemocitos cubren a la partícula grande formando capas alrededor de ella.

Coagulación

Otro importante proceso en los crustáceos es el rápido sellado de las heridas que previenen la pérdida de la hemolinfa y evitan el ingreso de partículas extrañas al organismo. La proteína de la coagulación es un dímero plasmático cuyo monómero tiene aproximadamente 200 kDa.

Síntesis y liberación de péptidos antimicrobianos

Los péptidos antimicrobianos son proteínas que presentan actividades antimicrobianas (bacterias Gram positivas) y antifúngicas. En particular, la caracterización de péptidos antimicrobianos, que matan o inhiben el crecimiento de microorganismos ha sido ampliamente investigada (Destomieux et al., 2000).

Proteínas de reconocimiento

Diversos tipos de proteínas de reconocimiento fueron descritos y fueron llamados proteínas de reconocimiento patrón (PRPs). Los PRPs reconocen carbohidratos que son componentes de la pared celular de microorganismos, como por ejemplo, los liposacáridos (LPs) o los peptidoglucanos (PG) de

bacterias, o β -1,3-glucanos de hongos. Algunos PRPs son lectinas y pueden trabajar directamente como aglutininas u opsoninas.

La influencia de la Temperatura en Infecciones Virales

La temperatura del agua es probablemente la variable ambiental de mayor importancia porque afecta directamente el metabolismo, el consumo de oxígeno, la muda y la supervivencia. También tiene efectos directos en otros parámetros ambientales tales como la salinidad y la oxigenación del agua (Moullac y Haffner, 2000). Los camarones tropicales, incluyendo *L. vannamei*, requieren temperaturas superiores a 20° C, y tienen crecimiento óptimo a temperaturas de 26° C a 32° C (FAO, 2003).

En estudios realizados con hipertermia se verificó que las altas temperaturas afectan los camarones tanto en el aspecto fisiológico, como en el inmunológico y reproductivo. Se ha comprobado que las altas temperaturas provocan la pérdida de capacidad osmótica (diferencia entre la presión osmótica de la hemolinfa y del medio externo), la reducción de metabolitos en la hemolinfa, la reducción en la concentración de hemocitos, la variación de actividad proPO y una dramática reducción en la calidad del espermatozoide, en comparación con organismos capturados en el ambiente natural (Pascual et al., 2003).

Sin embargo, estudios realizados con infecciones virales experimentales en camarones sujetos a tratamiento de hipertermia, demostraron una baja concentración viral tanto en tratamientos con bajas temperaturas (Jiravanichpaisal et al., 2004) como en tratamientos con temperatura elevadas (Vidal et al., 2001; Guan et al., 2003), pero ninguno de los autores pudo explicar exactamente cuál es el mecanismo responsable de la baja concentración viral.

Jiravanichpaisal et al. (2004) mostraron que langostinos infectados con WSSV tuvieron mortalidad de 100% en un periodo de 12 días cuando fueron sometidos a la temperatura de 22° C (temperatura ideal para el organismo), pero cuando estos fueron sometidos a bajas temperaturas (4-12° C) los organismos sobrevivieron por más de 45 días sin demostrar señales aparentes de la enfermedad. Sin embargo, cuando estos organismos fueron transferidos a temperaturas más elevadas, murieron en pocos días.

Otro trabajo que confirma la influencia de las bajas temperaturas en la supervivencia de crustáceos infectados por WSSV, es el realizado por Guan et al. (2003). Los autores observaron que camarones (*M. japonicus*) infectados con WSSV sometidos a temperatura de 15° C presentaron un mayor tiempo de supervivencia que los organismos mantenidos a 28° C. Los autores demostraron también que los organismos infectados presentaban un menor número de hemocitos (THC; Total Hemocyte Count); sin embargo, los organismos

mantenidos a la temperatura de 15° C fueron los que presentaron los valores de THC más elevado.

En el campo de la medicina humana, varios trabajos fueron realizados con la finalidad de entender el mecanismo de la fiebre (Kluger et al., 1975; Hasday y Singh, 2000) y los efectos de los tratamientos de hipertermia en la replicación viral (Conti et al., 1999; Hirayama et al., 2004). En estos estudios se observó una influencia de las proteínas de choque térmico (hsp) tanto en los mecanismos de la fiebre como en la replicación viral.

También fue demostrado que células monoblastóides humanas sometidas a tratamientos de hipertermia mostraron una mayor resistencia a la apoptosis. Esta resistencia fue relacionada con la inducción de las hsp de pesos molecular aproximado de 27, 70 y 90 kDa (Samali y Cotter, 1996).

Proteínas de Choque Térmico (HSP)

El medio ambiente en que habitan los organismos sufre frecuentemente alteraciones físicoquímicas; estas alteraciones pueden provocar un cambio estructural en las proteínas generando una respuesta fisiológica liderada principalmente por las proteínas de choque térmico, conocidas por sus siglas en inglés como HSP (Heat Shock Proteins) (Prohászka y Füst, 2004). Esta respuesta tiene un sistema genético conocido, altamente conservado, existente en cada

organismo conocido, desde las arqueobacterias hasta las eubacterias, de plantas a animales superiores. Aunque ciertas características varían de organismo a organismo, muchas de estas respuestas son prácticamente universales. Todos los organismos hasta hoy estudiados producen proteínas codificadas por una familia de genes hsp 70 y hsp 90 en respuesta a elevadas temperaturas, siendo consideradas éstas las proteínas más conservadas existentes (Linguist y Craig, 1988).

Estas proteínas están presentes en casi todos los compartimientos celulares, y son expresadas a bajo niveles en células no estresadas cumpliendo funciones biológicas esenciales en condiciones fisiológicas normales y sobreexpresadas en condiciones de estrés. En todos los organismos, la inducción de las hsps es rápida e intensa y constituye una respuesta de emergencia. Además, hay una relación cercana entre la temperatura de inducción y el ambiente que se encuentra adaptado el organismo (Linguist y Craig, 1988).

Las funciones atribuidas a las hsp incluyen: (i) prevenir la agregación de las proteínas bajo condiciones de estrés; (ii) funcionar como chaperones moleculares en el transporte entre organelos celulares; y (iii) contribuir con el plegamiento de proteínas nacientes y alteradas. Aunque, además, muchas otras funciones específicas fueron caracterizadas para los tipos particulares de hsp, incluyendo un papel en el proceso inmunológico (Robert, 2003).

El proceso de infección es estresante para ambos hospedero y huésped, por lo tanto incrementa la producción de chaperones moleculares por ambos organismos. Las Hsps son posibles candidatas para señalar los daños tisulares o estrés celular al sistema inmune. Cuando un patógeno entra al hospedero este tiene que enfrentar grandes cambios ambientales, como por ejemplo, el de temperatura, pH y disponibilidad de oxígeno, además de los mecanismos de defensa del hospedero, como la fagocitosis. Para protegerse del hospedero, el patógeno activa varios mecanismos de evasión incluyendo la síntesis de hsp. Por ejemplo, fue mostrado que la *Salmonella typhimurium* que sobreexpresa las hsp muestra ser resistente a altas temperaturas y una gran variedad de agentes oxidantes, sin embargo las mutantes que no expresan esta proteína son altamente susceptibles a la acción de los macrófagos y presentan una menor virulencia (Zugel y Kaufmann, 1999).

En algunos vertebrados, fue demostrado que ambos los anticuerpos circulantes y las células T activadas tienen especificidad para la mayoría de las proteínas de choque térmico de diversos microorganismos como *Micobacterium leprae*, *M. tuberculosis*, *Coxiella burnelli*, *Plasmodium falciparum*, *Schistosoma mansoni*, *Brugia malayii*, *Tripanosoma cruzi* y *Leishmania major*. Debido al hecho de que tantas hsp diferentes han sido reportadas como antígenos inmunodominantes, la mejor explicación para esta antigenicidad es que estas proteínas son extremadamente abundantes a altas temperaturas y son

procesadas por macrófagos al ser los antígenos externos de mayor abundancia para la presentación a linfocitos (Linguist y Craig, 1988).

Las hsp son clasificadas en familias, denominadas de acuerdo a su peso molecular aproximado en kDa, homología de secuencia y función (Cimino et al., 2002). Las mejor estudiadas son las de peso molecular aproximado de 110, 90, 70 y 60 kDa. Estas proteínas son expresadas a 37° C en mamíferos en ausencia de estrés, aunque en condiciones de estrés hay una sobreexpresión principalmente de las proteínas de peso 70 y 90. Un segundo grupo es inducido por las proteínas reguladoras de glucosa (grp) y un tercer grupo de bajo peso molecular con funciones diversas, como por ejemplo la Hsp 32, mejor conocida como hemooxigenasa, que tiene la función de regular el estado redox de la célula (Prohászka y Füst, 2004).

La inducción de hsp requiere la activación y translocación de una proteína transregulatoria, el factor de transcripción de choque térmico (HSF), que tiene la función de convertir la hsp de una forma no ligante de ADN monomérico a una forma oligomérica que se liga a elementos promotores específicos (HSE), localizado río arriba de los genes de choque térmico (Rossi et al., 1996).

Los mecanismos de regulación de las hsp todavía es incierto, la hipótesis más aceptada es que el factor de choque térmico (HSF) es inhibido por la hsp70 constitutiva bajo condiciones normales. El aumento en el nivel de proteínas

desnaturalizadas compiten por ligarse a las hsps, y esto induce a la activación de HSF, resultando en un aumento en la expresión de los genes de transcripción de hsp (Aufrecht, 2005).

En los invertebrados, dos diferentes miembros hsp70 son expresados en el citosol. El cognato hsc70, que es constitutivamente expresado a bajos niveles y es apenas tenuemente inducido, mientras que el hsp70 no es expresado en la mayoría de los tejidos y es altamente inducido por estrés (Robert, 2003).

Muy poca información ha sido generada al respecto de las hsps en crustáceos, entre los cuales sólo un trabajo cita la posible influencia de las hsps en la enfermedad viral por GAV (Vega et al., 2006).

Prostaglandinas

Las prostaglandinas son una clase de ácidos grasos cíclicos de 20 carbonos, de ocurrencia natural, sintetizado por la mayoría de los tipos celulares de eucariontes a partir de precursores de ácidos grasos poliinsaturados (Santoro et al., 1990). Tienen función de hormonas intracelulares involucradas en la en la regulación de varios procesos fisiológicos y patológicos, incluyendo la proliferación y diferenciación celular, la respuesta inmune, la inflamación, la citoprotección y la respuesta febril (Amici et al., 1992). En particular, las prostaglandinas que contienen un grupo carboxil α - β -insaturado en el anillo ciclopentano de la molécula (PGAs y PGJs) poseen una potente actividad

antiviral contra una gran variedad de virus de ADN y ARN. Asimismo, ha sido demostrado que protege células humanas ante los posibles daños térmicos. Ambas actividades anti-viral y citoprotectora son asociadas con la habilidad de estas moléculas para inducir la expresión de las proteínas de choque térmico, siendo la PGA1 la de mayor capacidad de inducción a concentraciones que no causan daños celulares (Amici et al., 1992). La inducción de hsp70 por prostaglandinas requiere la presencia de un grupo carboxil α - β -insaturado en el anillo ciclopentano. Esta porción permite a la molécula formar un aducto de Michael con nucleofílicos celulares y ligarse covalentemente con residuos proteicos cisteínicos vía un puente tioester (Rossi et al., 1996). Las hsps con mayor capacidad de ser inducidas son las de las familias de las hsp 70 y 90 (Amici et al., 1992). Sin embargo, poco se sabe del mecanismo de acción para la inducción de las prostaglandinas ciclopentenonas. Fue reportado que la PGA1 es rápidamente incorporada a las células y se liga a proteínas nucleares y ADN. Una posibilidad es que la PGA1 interactúa y modifica la conformación de ciertas proteínas, activando la respuesta transcripcional de choque térmico (Amici et al., 1992).

Muchos autores consideran que las prostaglandinas son eficientes antivirales (Santoro et al., 1980; Amici et al., 1994; Conti et al., 1996; Conti et al., 1999).

La acción antiviral de las ciclopentenonas, en comparación con otros agentes quimioterapéuticos, se caracteriza por:

- ❖ Amplio espectro de acción, ya que afecta virus con y sin envoltura, de ADN o ARN. Lo anterior ha sido demostrado en varios mamíferos, e incluso en células humanas.
- ❖ Actividad a concentraciones no tóxicas para las células hospederas. Generalmente, no afecta significativamente la síntesis de ADN, ARN ni proteínas de las células no infectadas.
- ❖ Habilidad de suprimir la replicación viral, incluso hasta cuando son administradas en estadios relativamente tardíos del ciclo de replicación viral.

Estas características hacen de las PGs interesantes agentes antivirales, que pueden ser sintetizados químicamente u obtenidos de recursos naturales, especialmente de algunos organismos marinos. La baja solubilidad de esta sustancia en agua, la hace viable para ser utilizada en la confección de alimento artificial para organismos acuáticos, como vectores de agentes antivirales en el tratamiento de enfermedades que afectan estos organismos (Amici et al., 1994).

Antecedentes

Conti et al. (1999) averiguaron que una de las proteínas de mayor inducción en el tratamiento de hipertermia en cultivos de células HeLa infectadas con el Rinovirus Humano (HRV) es la hsp 70, y que el tratamiento de hipertermia cuando era aplicado en estadios específicos del ciclo viral, es extremadamente efectivo para inhibir la replicación de HRV hasta en 99%, comparado con líneas celulares control. Los mismos autores probaron los efectos de los inductores químicos de hsp como la prostaglandina A1 y la Δ^{12} -PGJ₂ (PGs) y notó que estas sustancias también tenían efecto drástico en la replicación viral cuando las hsp eran inducidas. Asimismo, notó que el efecto de las PGs era transitorio, induciendo la expresión de hsps hasta por 24 horas. Después de este periodo hubo un aumento en la replicación viral. Los autores afirman que la actividad antiviral de estas moléculas ha sido asociada con su capacidad de funcionar como señal para la inducción de la síntesis de hsp 70 por la acción de la activación de la vía sensitiva de cicloheximida del factor de transcripción de HSF1. También sugiere que la hsp 70 pueda participar de la estrategia de defensa intracelular durante una infección de HRV. Sin embargo, muchas preguntas sobre el mecanismo mediante el cual la hsp 70 puede

interferir en la replicación de rinovirus durante un estrés térmico permanecen sin respuesta.

Bajo tratamiento con prostaglandinas, otros virus alteraron su replicación, por ejemplo, el poliovirus (Conti et al., 1996), el virus de la influenza (Pica et al., 2000; Conti et al., 2001), el virus de la estomatitis vesicular (Parker et al., 1995), el HIV (Rozera et al., 1996) y el Virus Mayaro en células de mosquito (Barbosa y Rebello, 1998).

Sin embargo, se han hecho pocos estudios en relación con las proteínas de choque térmico en crustáceos. Cimino et al., (2002) estudiaron la inducción de proteínas de choque térmico en *Cherax quadricarinatus* y *Penaeus monodon* bajo condiciones de estrés térmico, por medio de las técnicas de SDS-PAGE y ELISA. Notaron que en estas condiciones los organismos estaban expresando una proteína de peso molecular de 86 kDa (hsp 86), cuya expresión fue atribuida a las condiciones de estrés a que los organismos estaban sujetos. Lo et al., (2004) clonaron y caracterizaron molecularmente el cognato de choque térmico de *Penaeus monodon* y llegaron a la conclusión de que la hsc 70 también es inducida en condiciones de estrés, así como que proveen una protección en estas condiciones.

La única referencia bibliográfica encontrada en que se relaciona la hsp 70 con la replicación viral en camarón es el de Vega et al. (2006), en que los autores

demuestran una inducción de la hsp 70 en tratamiento de hipertermia y la asocia como siendo responsable de la baja replicación viral del GAV.

Otros autores intentaran utilizar diversas sustancias antivirales como: β -1,3-glucano extraída de hongos (Chang et al., 2003), extracto de algas pardas (Chotigeat et al., 2004), péptidos sintéticos de gasterópodos (Dupuy et al., 2004), proteínas de la envoltura de WSSV (Namikoshi et al., 2004; Witteveldt et al., 2004) y WSSV inactivo (Namikoshi et al., 2004). Todos los tratamientos resultaron en una atenuación de la infección viral por un tiempo limitado.

Hipótesis

Ha sido demostrado que la inducción de las hsps provoca una alteración de la replicación viral en líneas celulares de mamíferos. La inducción de hsp puede ser por medio de tratamientos de hipertermia o por medio de inductores químicos como las prostaglandinas. Por el hecho de que las hsps son proteínas evolutivamente antiguas y extremadamente conservadas, es factible suponer que induciendo las hsps de los camarones tendremos el mismo efecto en la replicación viral, pudiendo así controlar las altas mortalidades ocurridas por infecciones virales, como es el caso de WSSV.

Objetivos

Debido al difícil diagnóstico y tratamiento de las enfermedades virales que afectan a los camarones, se hace necesaria la búsqueda de soluciones para reducir las grandes mortalidades y enormes perjuicios causados por estas enfermedades en la camaronicultura. Este trabajo busca elucidar la factibilidad de usar la prostaglandina como un agente antiviral en peneidos, teniendo como objetivos:

- ❖ Determinar la concentración de prostaglandina A1 necesaria para inducir las hsps en *Litopenaeus vannamei* sin causar ningún tipo de daño celular.
- ❖ Comparar el nivel de inducción de hsp por medio de tratamientos de prostaglandina A1 y tratamiento de hipertermia.
- ❖ Verificar los efectos de la inducción de hsp en la infección viral de WSSV en ambos tratamientos y compararlos
- ❖ Determinar las diferencias en la expresión de proteínas del camarón en los tratamientos con Prostaglandina A1 e hipertermia.
- ❖ Observar la influencia de ambos tratamientos en el proceso de infección viral.

Materiales y Métodos

Fase I

Bioensayo Hipertermia

Anteriormente al bioensayo, los camarones provenientes del Laboratorio de Producción Larvaria - AquaPacific S. A. de C.V. de Mazatlán - Sinaloa, fueron aclimatados por 15 días en acuarios de 60 litros de capacidad, a la temperatura de 28° C. En el tiempo cero, un grupo de organismos fue transferido a una temperatura de 15° C y otro a 34° C, mientras que un tercer grupo permaneció en la temperatura de 28° C. La hemolinfa de tres organismos de cada grupo fue colectada de la base de los pleópodos en el primer segmento abdominal (figura 03) en los siguientes tiempos: 1, 3, 6, 12, 24 y 48 horas después del cambio de temperatura; para esto se utilizó una jeringa de 2 ml que contenía 500 µl de solución anticoagulante. La solución de hemolinfa fue centrifugada inmediatamente después de la colecta a 8000 x g a 4° C por 20 minutos de forma individual con la finalidad de precipitar los hemocitos. Posteriormente, todos los hemocitos del mismo grupo fueron juntados y nuevamente centrifugados en las mismas condiciones anteriormente citados.

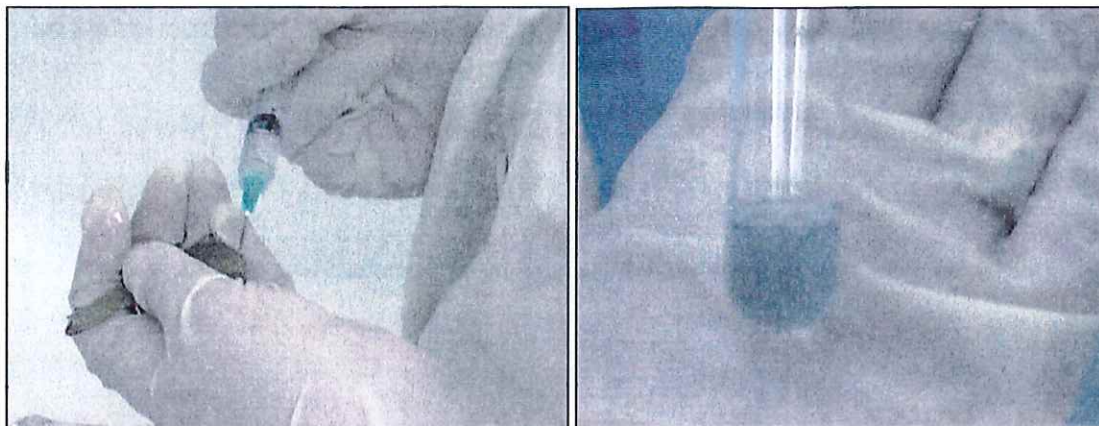


Fig.03- Extracción de hemolinfa a partir de la base de los pleópodos.

Extracción de ARN total

La extracción de ARN total fue realizada inmediatamente después de la precipitación de hemocitos, homogenizando el precipitado, utilizando para esto un pistilo de Teflon[®] y el reactivo Trizol[®] (Invitrogen), de acuerdo con las instrucciones indicadas por el fabricante (Anexos 01 y 02)

Síntesis de ADN complementario

La síntesis de ADN complementario fue realizada por PCR-RT utilizando para esto la enzima Superscript[®] de la casa comercial Invitrogen, siguiendo las instrucciones del fabricante (Anexo 03).

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La PCR fue realizada (Anexo 04) utilizando el producto de la síntesis de ADN complementario y un par de cebadores que fue diseñado a partir de una región conservada de la secuencia de Hsp70 de *Litopennaeus vannamei*, disponible en el Genbank (AY645906), mediante el programa FastPCR.

Tabla 01

Compatible Primers Combination:
>F_19_(3->24) 5'-ccctccgtgatgcgaagatgg Tm=60.0°C Tm(10)=34.7°C CG%=61.9 MW=6447.2 21 bp: PCR efficiency (quality)=83
>R_12_(94<=115) 5'-ttgccgttgaagaagtcctgg Tm=57.3°C Tm(10)=32.4°C CG%=52.4 MW=6477.2 21 bp: PCR efficiency (quality)=87
Length of PCR Product= 113 The Optimal Annealing Temperature of PCR = 64.3°C

Bioensayo de Prostaglandina A1

Ochenta organismos previamente aclimatados en peceras de 60 litros a una temperatura de 26°C, fueron inoculados con tres diferentes concentraciones de prostaglandina A1 (Cayman Chemical). Una solución inicial fue preparada a la concentración de 10 mg/ml, utilizando alcohol absoluto de grado molecular como vehículo. A partir de la solución inicial fueron preparados tres inóculos

cuyas las concentraciones finales fueron de 5 µg/ml, 10 µg/ml y 30 µg/ml, diluyendo la solución inicial en solución salina de NaCl al 2%. También fue preparado un inóculo con alcohol absoluto en concentración de 1.5 µl/ml, utilizando igualmente solución salina; basada esta concentración en la concentración máxima de alcohol encontrada en los inóculos de prostaglandina para fines de control y para comprobar la influencia del vehículo en el organismo. La cantidad de 500 µl de inóculo fue inyectada intramuscularmente en el penúltimo segmento abdominal y los organismos fueron mantenidos a la temperatura de 26 °C. En los tiempos de 1, 3, 6, 12 y 24 horas después de la inoculación, la hemolinfa fue colectada como se describió anteriormente. Los pleópodos y las branquias fueron diseccionados e inmediatamente congelados a -20° C. Dos organismos fueron fijados utilizando solución de Davidson por 48 horas y posteriormente fueron pasados a alcohol al 50% siguiendo el protocolo de (Lightner, 1996) para ser procesados histológicamente.

Extracción de ARNt, síntesis de ADNc y PCR

La extracción de ARN, síntesis de ADN complementario y amplificación por PCR fue realizado como se describió anteriormente.

Histología

Dos de los organismos del bioensayo de prostaglandina A1 fueron fijados vivos, inyectando solución de Davidson (Anexo 05) en el hepatopancreas y a lo largo del abdomen (figura 04). También fue hecho un corte raso en el caparazón, de forma a no dañar el tejido muscular, para que la solución fijadora pueda alcanzar el músculo. Después de 48 horas los camarones fueron transferidos de la solución de Davidson a alcohol al 50% de acuerdo con los procedimientos utilizados por (Lightner, 1996) y posteriormente procesadas histológicamente (figura 05) para determinar diferencias histológicas entre los diferentes tratamientos de prostaglandina A1. Los cortes histológicos fueron hechos con un grosor aproximado de 7-8 μm y fueron teñidos con hematoxilina y eosina, de forma que los compuestos celulares acidófilos fueron teñidos de violeta y los basófilos de rosado.

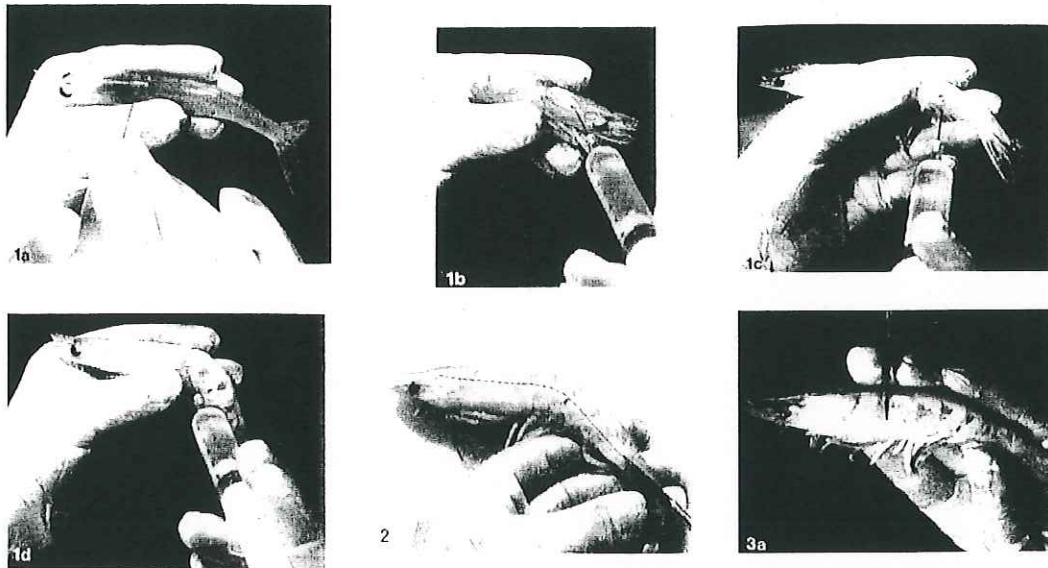


Figura 04 –Procedimientos para la fijación de los camarones para fines histológicos.

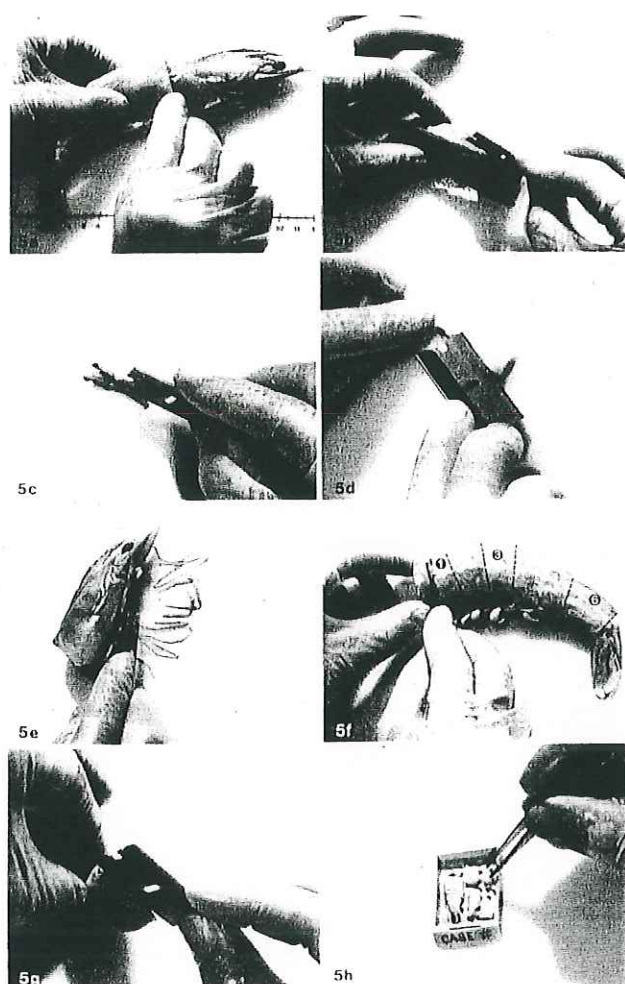


Figura 05—Preparación de las muestras para la inclusión en bloques de parafina. Fuente: (Lightner, 1996)

Fase II

Bioensayo Prostaglandina A1/ Hipertermia X WSSV

Se realizaron bioensayos para determinar los efectos de la prostaglandina A1 e hipertermia en la infección viral con WSSV.

Los organismos provenientes del Laboratorio de Producción Larvaria - Aquapacific S.A. de C.V. fueron previamente aclimatados a 26° C, mantenidos en peceras de 60 litros. Posteriormente fueron inyectados con un inóculo viral de WSSV preparado a partir de pleópodos de organismos infectados experimentalmente en el Laboratorio de Ecología Molecular de la UABC y solución salina (NaCl 2%) (Anexo 07). Tres horas post-infección (p.i.), a un grupo experimental se le inyectó un inóculo de prostaglandina A1 en una concentración de 10 µg/ml (Anexo 08) en el penúltimo segmento abdominal; un segundo grupo fue sometido a tratamiento de hipertermia, es decir, fueron transferidos a peceras que contenían agua marina a 34° C; un tercer grupo de animales infectados se mantuvieron en las mismas condiciones en que fueron aclimatados. Cinco camarones fueron colectados al azar a las 3, 6, 12, 24, 48 y 72 horas p.i. y se colectaron hemolinfa y branquias. Lo que restó del organismo fue conservado a -70° C para la extracción de ADN para la prueba de PCR.

Extracción de Proteínas

La extracción de proteínas totales fue hecha a partir del tejido de branquias, por ser este el tejido en el que fue demostrada una buena inducción de las proteínas de choque térmico en experimentos previos del laboratorio y por ser este uno de los primeros tejidos afectados en una infección viral de WSSV.

Aproximadamente 0.15 g de tejido branquial fueron homogenizados con 500 µl de amortiguador de extracción (Anexo 17). El homogenizado fue hervido a 100° C por tres minutos y posteriormente centrifugado a 14 000 x g por 10 minutos a 4° C. El sobrenadante fue recuperado y transferido a un tubo limpio. La muestra fue sometida a una segunda centrifugación y nuevamente transferida a un tubo limpio.

SDS- PAGE

Dos geles de poliacrilamida discontinuos fueron preparados conforme los anexos 15 y 16. El extracto de proteínas fue mezclado en una proporción de 1:1 con el amortiguador de muestra (Anexo 14) y posteriormente desnaturalizado a 100° C por 5 minutos. Inmediatamente después la muestra fue puesta en hielo antes de ser cargada en el gel. Fueron cargados 30 µl de cada muestra en orden idéntico en dos geles, 10 µl del estándar de proteínas (SeeBlue® Plus 2 -

Invitrogen) y 5 μ l del estándar para western blot (Magic Mark™ XP - Invitrogen). Los extractos de proteínas totales fueron separados mediante electroforesis en geles de poliacrilamida discontinuos desnaturalizantes (Laemli, 1970) (Anexo 10), en amortiguador de electroforesis (Anexo 13) por 1 hora y media a 100 V. Uno de los geles fue teñido con azul de Comassie y el otro fue utilizado para la electrotransferencia.

Electrotransferencia

Después de la electroforesis el gel fue pre-equilibrado en amortiguador de transferencia (Anexo 18) por 15 minutos, para evitar que el exceso de sales altere la transferencia de las proteínas a la membrana, así como la fibra absorbente y el papel filtro utilizado en la transferencia. La membrana de PVDF fue primeramente humedecida en metanol y posteriormente equilibrada en el mismo amortiguador citado anteriormente. El emparedado fue montado conforme la figura 06, tomado el cuidado de no atrapar ninguna burbuja de aire entre el gel y la membrana. La temperatura del amortiguador fue controlada utilizando bolsas de gel térmicas y la cámara fue puesta con un agitador magnético para circular el agua de forma a mantener una temperatura homogénea en toda la cámara.

La electrotransferencia tuvo duración de una hora a 100 V y posteriormente el gel fue teñido con azul de Coomassie para determinar la eficiencia de la transferencia.

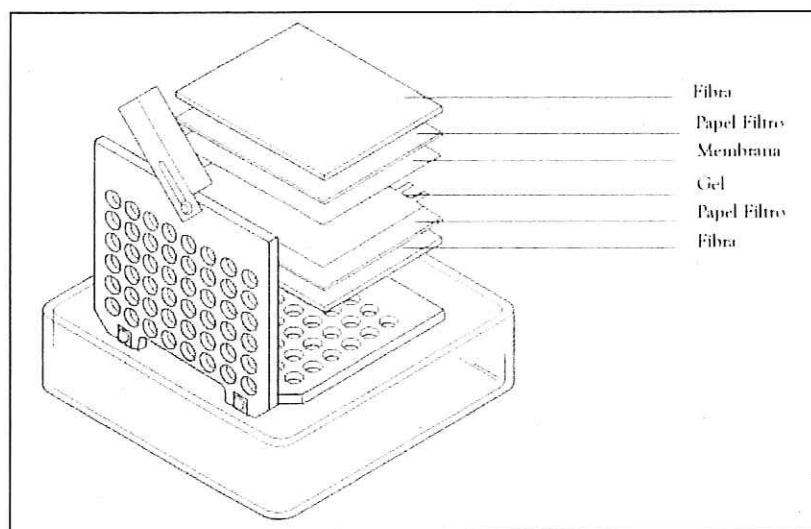


Figura 06 –Emparedado para la electrotransferencia de proteínas para membrana de PVDF.

Western Blot

La técnica de western blot fue realizada empleando el kit comercial WesternBreeze de la casa comercial Invitrogen, siguiendo las instrucciones del protocolo del manual del kit:

Primeramente, la membrana fue bloqueada con solución bloqueadora proporcionada por el fabricante (Anexo 19) con agitación constante durante 30 minutos a 1 revolución por segundo. Esta solución fue decantada y la

membrana enjuagada con agua desionizada por 5 minutos. Este procedimiento fue repetido una vez. Posteriormente, ésta fue expuesta a los anticuerpos primarios policlonales de conejo contra la forma inducible de HSP 70 de humanos recombinante (StressGene) (Anexo 20) por 1 hora. Después la membrana fue lavada con solución de lavado de anticuerpos (Anexo 21) por 5 minutos, repitiéndose por 3 veces el lavado. En seguida, la misma fue expuesta a los anticuerpos secundarios de conejo (proporcionado en el kit) por 30 minutos. Nuevamente la membrana fue lavada con solución de lavado de anticuerpos (Anexo 21) por 3 veces, 5 minutos por vez, y posteriormente en agua desionizada 2 veces de 5 minutos. La membrana fue puesta encima de una lámina de plástico transparente y fueron aplicados 2.5 ml de substrato quimioluminescente, tomando el cuidado de no tocar la membrana. La reacción procedió por 5 minutos y el exceso de substrato fue secado con un papel filtro. La membrana fue cubierta con otra lamina de plástico y expuesta a una película para diagnóstico sensible a la luz azul (X - Omat XK-1, Kodak) en cuarto oscuro por 2 minutos. Inmediatamente después, la película fue inmersa en solución reveladora (Kodak GBX) por 5 minutos, seguido por un enjuague de agua en agitación constante por 30 segundos, inmersión en solución fijadora (Kodak GBX) por 5 minutos y por último un enjuague de agua destilada, en agitación constante por 30 segundos.

Resultados

PCR a partir de ADN Complementario

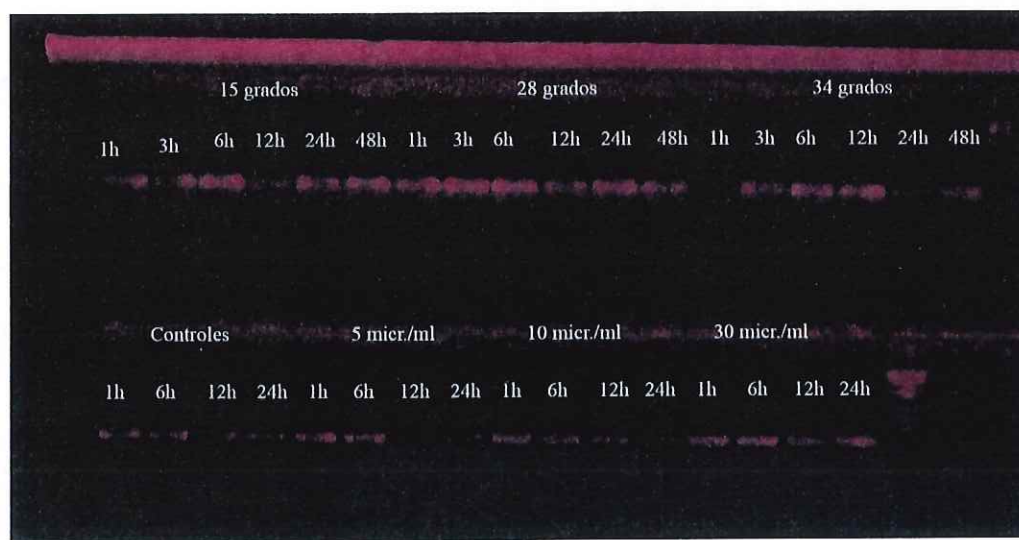


Figura 07- Gel de agarosa con productos de PCR de hsp 70 de organismos control, tratados por hipertermia y PGA 1.

Al analizar los productos de la PCR (figura 07) no fue posible determinar diferencias claras en la transcripción por inducción de las hsp, entre los tratamientos.

En busca de una explicación para lo anterior, se realizó un alineamiento (BLAST) (Altschul et al., 1997) de la secuencia amplificada respecto a las hsp70 de *L. vannamei* y otros artrópodos (Anexo 22), contra la secuencia de una proteína de estrés térmico de cognato (hsc 70) de *F. chinensis* depositada en el Genebank (No de acceso: AY74350.1), con el fin de comparar el grado de

similitud entre estos dos tipos de proteínas de choque térmico (la constitutiva y la inducible), utilizando el programa Mega 3.0 (Kumar et al. 2004) (figura 08). Se pudo notar que las secuencias son prácticamente idénticas con sólo algunas diferencias puntuales, que, inclusive, no coinciden entre las especies y entre las proteínas. Este hecho reveló la dificultad en la construcción de un cebador específico para amplificar únicamente las hsp70 inducibles. Otra dificultad encontrada fue que la mayoría de las secuencias encontradas en el Genebank están denominadas como "hsp70", sin distinguir entre inducibles y constitutivas, sino considerándolas a todas como una familia de proteínas de 70 KDa altamente conservada.

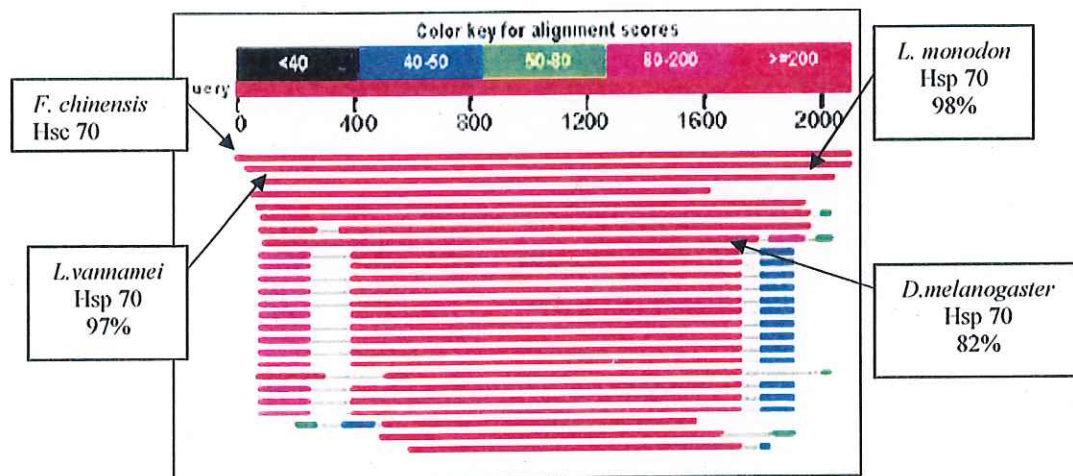


Figura 08 – Alineamiento de la secuencia de Hsc 70 de *Fenneropenaeus. chinensis* mostrando alto grado de similitud (%) entre secuencias de las hsp70 en diferentes especies de camarón.

Por la falta de diferencias en la transcripción de los diferentes tratamientos, deducimos que el cebador diseñado amplifica muy

probablemente, además de las hsp70 inducibles, las constitutivas, lo que convierte a esta herramienta de estudio en inútil para los propósitos de esta investigación.

Sin embargo, al realizar las observaciones al nivel de la expresión de las proteínas, el análisis de los electroforegramas en geles de poliacrilamida demuestra que hay una inducción positiva de un grupo de proteínas de peso molecular aproximado a 70 kDa en los organismos tratados con PGA1 a diferentes concentraciones (figura 09), y esta inducción parece mantenerse a lo largo del tiempo.

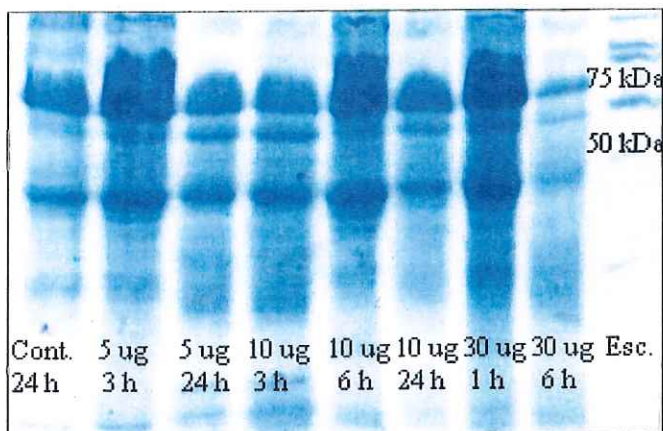


Figura 09 - Inducción de proteínas de peso molecular aproximado a 70 kDa con tratamiento de prostaglandina A1 en diferentes concentraciones a lo largo del tiempo.

Histología

No hubo evidencia de de ningún tipo de daño celular al analizar cortes histológicos de los organismos provenientes de los distintos tratamientos con PGA1 a diferentes concentraciones y compararlos con las preparaciones obtenidas con controles sin tratamiento, por medio de microscopia óptica. Sin embargo, durante el bioensayo se observó que los organismos que recibieron la concentración más alta de PGA 1 mostraron señales de estrés, como falta de apetito y color rojizo. Esto pudo ser confirmado en el análisis histológico, donde se observó que las vacuolas digestivas del hepatopancreas se encontraban semivacías, prácticamente sin lípidos, en comparación con los organismos control y con los que se les aplicaron los otros tratamientos (figuras 10 y 11) Lo anterior indica que los organismos del tratamiento con la más alta concentración de PGA1 no se estaban alimentando de forma adecuada, lo que puede ser interpretado como un señal de estrés.

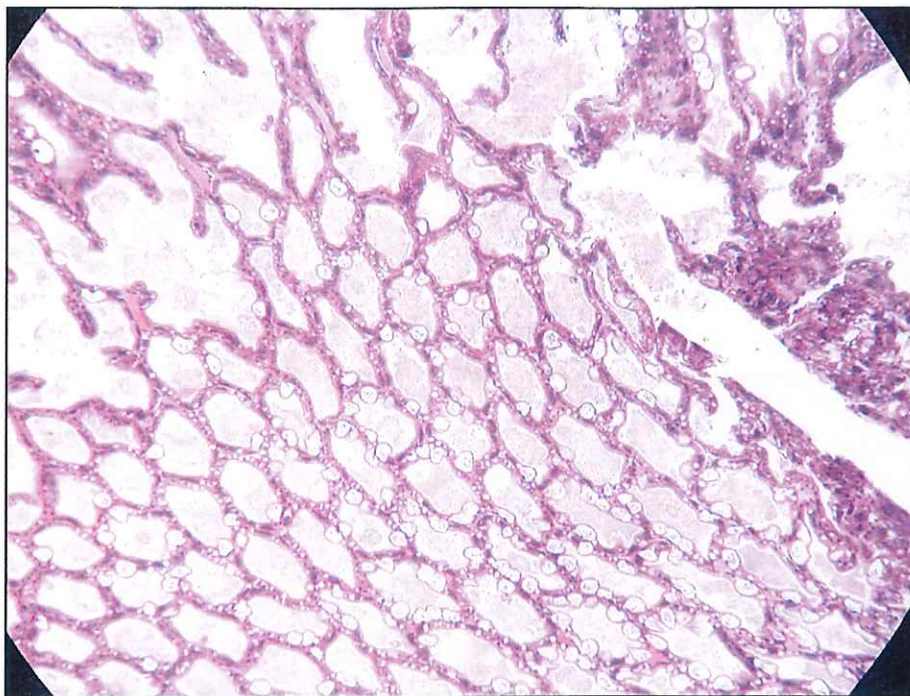


Figura 10 - Corte histológico del hepatopancreas de un organismo sano con aumento 10X - tinción HeEo

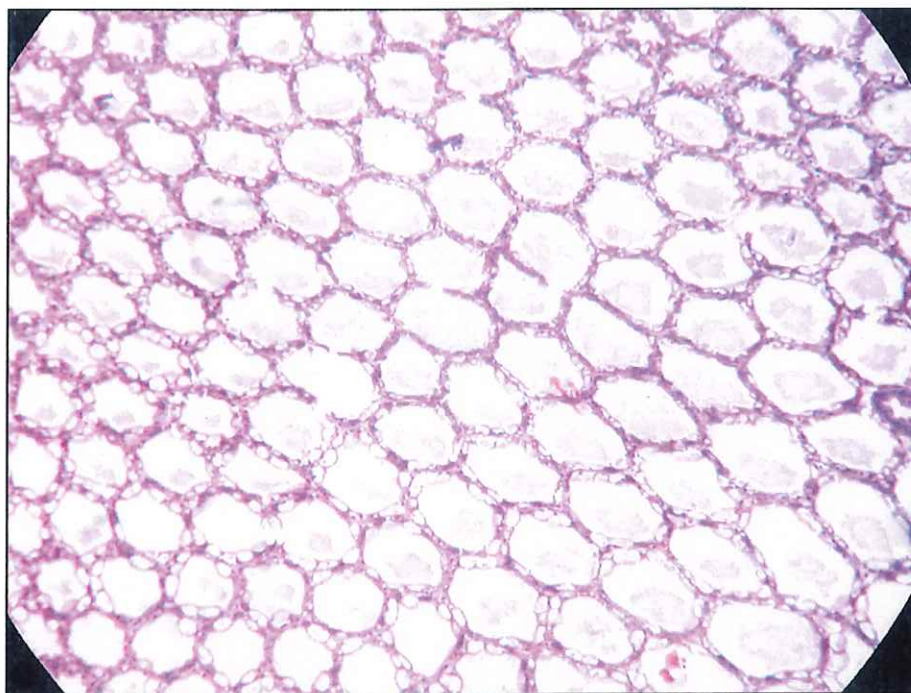


Figura 11 - Corte histológico del hepatopancreas de un organismo tratado con PGA1 a una concentración de 30 µg/ml, con aumento de 10X - tinción HeEo.

Bioensayo PGA1/Hipertermia X WSSV

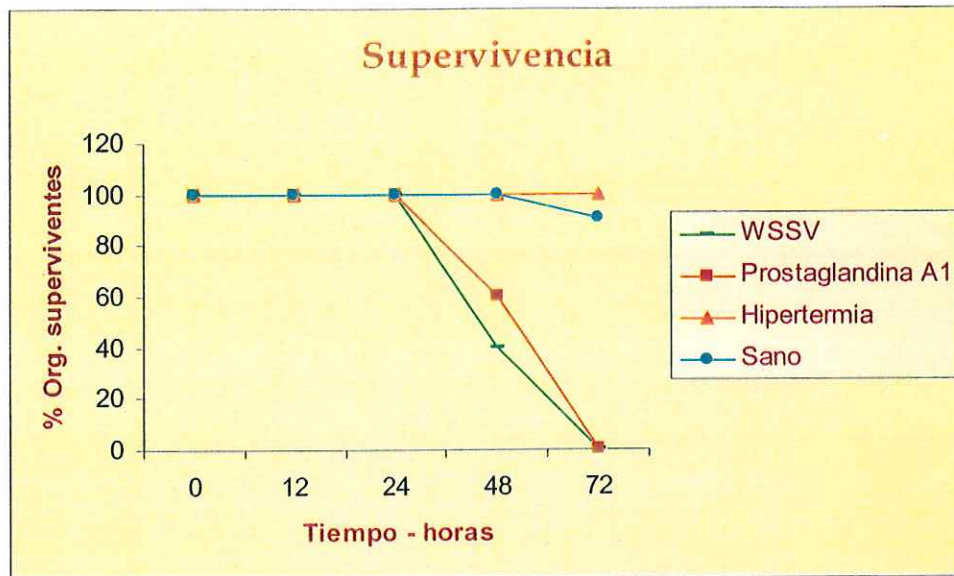


Grafico 01 Supervivencia (%) de los organismos control y sometidos a los diferentes tratamientos.

En la gráfica 01 se observa que no hubo diferencias significativas de supervivencia entre los organismos tratados con PGA1 y los organismos control infectados con WSSV. Sin embargo, los organismos sometidos a hipertermia mostraron una supervivencia de 100 % hasta los 20 días de bioensayo. No se encontraron diferencias significativas entre este grupo experimental y los organismos control.

Inducción de las HSPS 70 (forma inducible)

Los geles de SDS-PAGE teñidos con azul de Comassie (figuras 12, 14, 16 y 18) muestran una gran complejidad de proteínas que difieren entre los tratamientos realizados. En estos geles se pudo observar una banda de gran intensidad con peso molecular correspondiente aproximado a los 70 kDa.

Los resultados obtenidos a partir de la aplicación del Western blot (figuras 13, 15, 17 y 19) indican, en primera instancia, que una proteína de 70 Kda es inducida y que ésta, ya que reacciona contra el antígeno policlonal anti-hsp70 inducible, es la hsp70 de camarón. Por otro lado, también indican que hay una inducción positiva de las hsp 70 inducibles en los organismos de todos los tratamientos. La intensidad de expresión parece aumentar proporcionalmente con el tiempo. Algunos organismos control no infectados también presentaron inducción de las hsp70. Esta inducción puede haber sido ocasionada por algún estresor desconocido, como factores ambientales o manipulación.

A pesar de que fue observada una inducción positiva de algunos organismos control no infectados, también se observó que hay organismos pertenecientes a este mismo grupo en que no se observa esta inducción.

Los organismos que recibieron el tratamiento de PGA1 mostraron una inducción más baja a las tres y seis horas post-tratamiento, al compararlos con

los organismos de otros tratamientos; pero los resultados indican que los organismos sometidos a hipertermia e infectados con WSSV mostraron una inducción progresiva a lo largo del tiempo.

La mayor inducción observada fue la de los organismos infectados que fueron colectados en estado moribundo, tanto aquellos que recibieron el tratamiento de PGA1 cuanto aquellos que no recibieron ningún tipo de tratamiento.

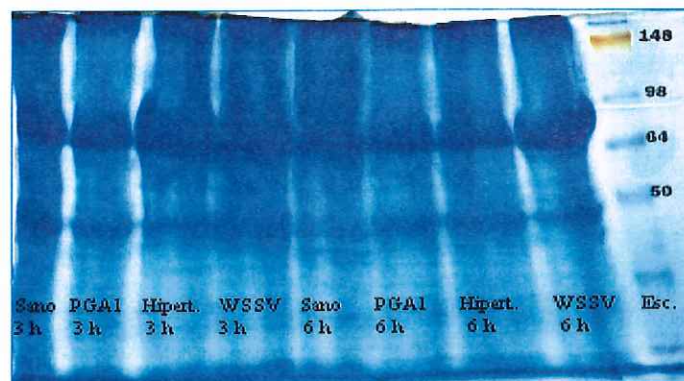


Figura 12 - SDS-PAGE de proteínas de branquias de camarones de los diferentes tratamientos a los tiempos de 3 y 6 horas postratamiento.

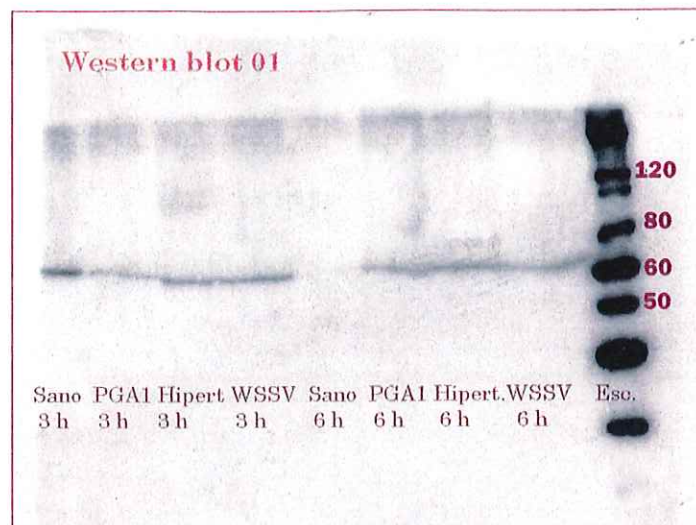


Figura 13 – Western blot de proteínas de branquias de camarones infectados y sanos de los diferentes tratamientos a los tiempos de 3 y 6 horas postratamiento.

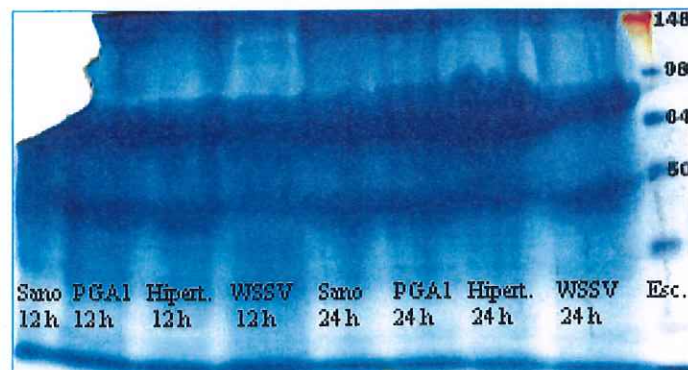


Figura 14 - SDS-PAGE de proteínas de branquias de camarones de los diferentes tratamientos a los tiempos de 12 y 24 horas postratamiento.

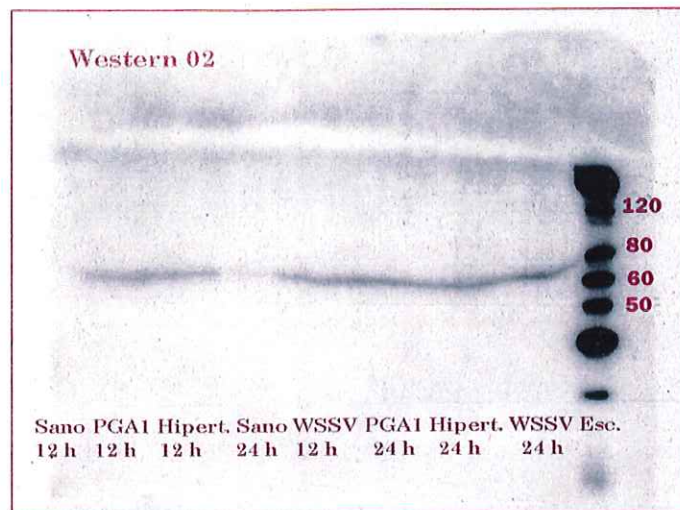


Figura 15 – Western blot de proteínas de branquias de camarones infectados y sanos de los diferentes tratamientos a los tiempos de 12 y 24 horas postratamiento.

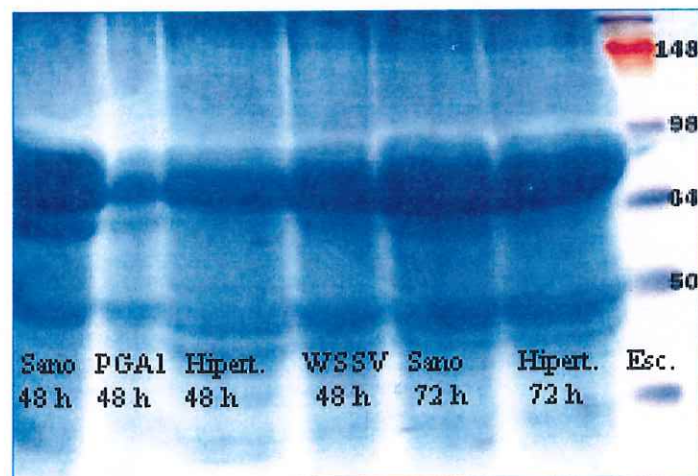


Figura 16 - SDS-PAGE de proteínas de branquias de camarones de los diferentes tratamientos a los tiempos de 48 y 72 horas postratamiento.

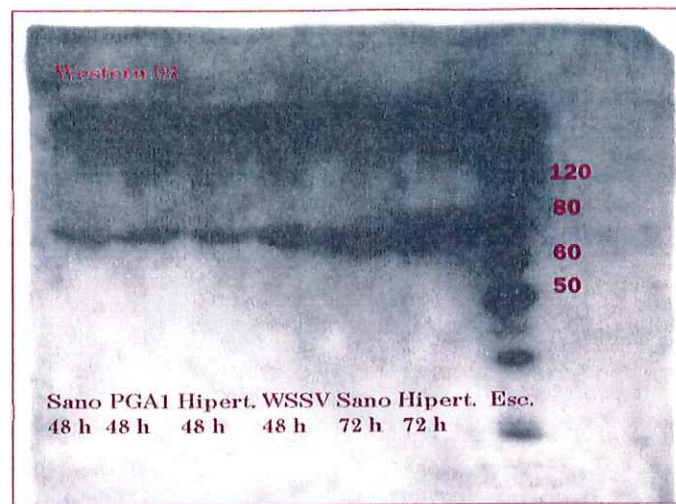


Figura 17 – Western blot de proteínas de branquias de camarones infectados y sanos de los diferentes tratamientos a los tiempos de 48 y 72 horas postratamiento.

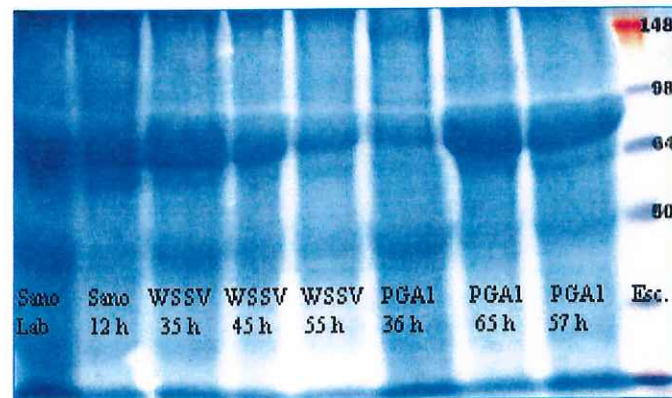


Figura 18 - SDS-PAGE de proteínas de branquias de camarones moribundos de los diferentes tratamientos.

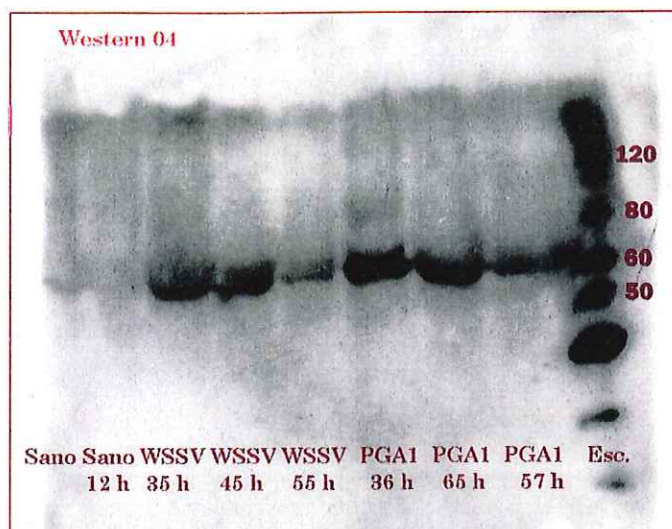


Figura 19 – Western blot de proteínas de branquias de camarones moribundos de los diferentes tratamientos.

Discusión

El hecho de que las secuencias de los genes codificantes de las proteínas de choque térmico sean tan conservadas dificulta el análisis de los elementos transcritos. En los resultados obtenidos por este tipo de análisis no se pudieron observar diferencias significativas de transcripción del gen ante los diferentes tratamientos, cuando se comparaban con los organismos que no recibieron ningún tipo de tratamiento. Al realizar un alineamiento de las secuencias, éste mostró que las secuencias de los genes de las hsp 70 (forma inducible) y hsc 70 (forma constitutiva) son prácticamente idénticas.

El hecho de que no hubo diferencias significativas en la intensidad de las bandas en los análisis de PCR puede indicar que los cebadores diseñados no eran específicos para la forma inducible de hsp70, y que la transcripción continua de la forma constitutiva enmascaró la transcripción de la forma inducible. Otras posibles explicaciones para el resultado obtenido, son de índole metodológico y se refieren a, por ejemplo, la precisión de medida del ARN total para normalizar la reacción de síntesis de ADNc. Diferencias en la cantidad de ARN total pueden afectar la cantidad final de ADNc en función de la proporción ARN total-ARNm de la muestra original. Otros factores que también influyen en la síntesis del ADNc son las condiciones de reacción que afectan directamente el desempeño

de la transcriptasa reversa, entre ellos; el pH, la temperatura y la fuerza iónica. Los dos primeros factores pueden ser seguramente controlados y no deben diferir entre las muestras en una misma reacción, sin embargo, la fuerza iónica puede variar entre muestras dependiendo de la cantidad de sales que contengan. Una tercera posibilidad es que la reacción de síntesis haya alcanzado su punto máximo en todas las muestras, en función de la concentración de enzima: la síntesis de ADNc, como cualquier reacción bioquímica catalizada por una enzima con pH, temperatura y fuerza iónicas óptimas y dependiente de la concentración de sustrato, es una reacción que sigue una cinética caracterizada por una función de tipo logarítmico que tiene su punto máximo relacionado con la actividad de la transcriptasa reversa. Una vez que se alcanza la velocidad máxima de reacción por la saturación del sitio catalítico de la enzima, la producción de ADNc deja de incrementarse, independientemente de la cantidad de ARN mensajero presente en la reacción (Nelson y Cox, 2000).

Sin embargo, en el nivel de la expresión proteica, los resultados obtenidos a partir de los análisis de proteínas totales por SDS-PAGE, mostró una inducción de una banda de peso aproximado de 70 kDa en los organismos tratados con PGA1, indicando que probablemente había una inducción positiva por parte de las hsps70 en los organismos tratados.

Esta inducción fue confirmada por los análisis de Western blot utilizando anticuerpos policlonales de conejo, específicos para la forma inducible de

hsp70. Los resultados demuestran que las hsps son inducidas en todos los tratamientos, incrementando a lo largo del tiempo, inclusive en algunos organismos controles sanos y en los organismos infectados por WSSV, ya que no hubo diferencias significativas entre los diferentes tratamientos.

A pesar de una inducción positiva de las hsps en los tratamientos de PGA1 e hipertermia, no hubo diferencias en la supervivencia entre los camarones infectados por WSSV tratados con PGA1 y aquellos que no recibieron ningún tipo de tratamiento. Todos los organismos infectados que recibieron inóculo de PGA1 y aquellos sin tratamiento alguno murieron hasta las 72 horas pos tratamiento.

Sin embargo, los organismos infectados que fueron sometidos a hipertermia sobrevivieron por más de 20 días, sin que hubiera diferencias significativas de mortalidad cuando se compararon con los organismos control no infectados. Esto concuerda con los resultados observados en trabajos realizados anteriormente, en donde siempre existió una mayor supervivencia de los camarones infectados por virus cuando éstos eran sometidos a hipertermia (Vidal et al., 2001; Guan et al., 2003; Jiravanichpaisal et al., 2004; Vega et al., 2006).

Todos los organismos infectados por WSSV que no recibieron ningún tipo de tratamiento mostraron una clara inducción de la hsp70 inducible, ya que esta inducción aparentemente no le proveyó protección alguna contra la

enfermedad. Adicionalmente, las muestras provenientes de aquellos organismos que fueron colectados moribundos, son los que presentaron la mayor inducción de la hsp70; este hecho parece indicar que el proceso de la muerte induce a estas proteínas a altos niveles. Debemos considerar que probablemente los organismos en avanzado proceso de infección pueden tener sus órganos afectados por la enfermedad, lo que debe provocar un mal funcionamiento de estos y, por lo tanto, estrés fisiológico al animal. Aunque es factible suponer que la simple presencia de partículas virales induzca a la inducción de las hsps, como ya ha sido mencionado anteriormente (Prohászka y Füst, 2004).

En estudios realizados con infecciones virales a partir de WSSV, en que los organismos fueron sujetos a diferentes temperaturas, se demostró que la patogenicidad del virus es menor a temperaturas extremas: (Vidal et al., 2001; Guan et al., 2003; Jiravanichpaisal et al., 2004) realizaron infecciones experimentales con WSSV en camarones sujetos a diferentes temperaturas y notaron una tasa de supervivencia mayor en organismos sujetos a temperaturas por debajo de 15° C o superiores a 32° C. (Guan et al., 2003). Estos autores consideraron la posibilidad de que a estas temperaturas el sistema de defensa de los crustáceos fuese estimulado, pero tampoco descartaron la posibilidad de que esas temperaturas pudiesen afectar alguna etapa de la replicación de WSSV. Más recientemente, (Vega et al., 2006) demostraron que un tratamiento de

hipertermia por un corto período de tiempo seguido de la recuperación de la temperatura inicial induce a la hsp70 en camarones infectados crónicamente por el virus asociado a las branquias (GAV; Gill Associated Virus) y relacionó esta inducción con una baja replicación viral. Sin embargo, no pudo notar diferencias significativas de supervivencia cuando fueron comparados con los organismos control no infectados.

Los resultados obtenidos en este trabajo no concuerdan con los resultados obtenidos por estos autores. Al parecer la inducción de las proteínas de choque térmico no está relacionada con la baja replicación viral de WSSV en *L. vannamei* en este ensayo. Algunas consideraciones como diferencias interespecíficas, y el hecho de que el GAV sea un virus de ARN, mientras que el WSSV es un virus de ADN deben ser tomadas en cuenta y realizar más investigación al respecto.

Los mecanismos por los cuales las hsp están involucradas en la baja replicación viral todavía no han sido elucidados. Amici et al. (1994) mencionan que la PGA1 altera la glicosilación y el transporte de las glicoproteínas virales ocasionando un bloqueo de la madurez del virus Sedai. Se observó que este bloqueo en la replicación viral era dependiente de la inducción de la hsp70, y sólo se mantuvo mientras que sus niveles fuesen altos.

La mayoría de los virus posee glicoproteínas en la envoltura que son reconocidas por las proteínas receptoras de las células del hospedero. Este reconocimiento permite al virus penetrar al ambiente interno celular para poder replicarse. Hasta el presente momento no se conoce exactamente los mecanismos de infección del WSSV, ya que se ha observado que las proteínas mayores de la envoltura de este virus (VP 28 y VP 19) no son glicosiladas (Hulten et al., 2002).

Otra consideración importante es la posibilidad de que la inhibición viral por la prostaglandina sea transitoria y dosis dependiente (Conti et al., 1999), y por el hecho de la imposibilidad de medir la replicación viral durante la realización del presente trabajo, este bloqueo temporáneo de la replicación viral puede haber pasado desapercibido.

Si se ha demostrado que la PGA1 es una sustancia que induce la expresión de una familia de proteínas altamente conservada como es la de las hsp70, el hecho de haber tal diferencia de supervivencia entre los organismos tratados con hipertermia y aquellos tratados con PGA1, aun cuando este trabajo demuestra que sí hubo tal inducción, llama la atención sobre cuales son los verdaderos motivos de las altas tasas de supervivencia por parte de los organismos tratados con hipertermia. Pareciera ser que hay algo más que la simple expresión de esa familia de proteínas que influye en la protección.

Cada día son más abundantes los registros de que la hipertermia protege a los camarones de las enfermedades virales, pero todavía es desconocido cuáles son los mecanismos involucrados en este proceso. Es evidente que hay una necesidad de conocer mejor cuáles son los mecanismos o las moléculas involucrados para contrarrestar el estrés térmico por parte del camarón, cómo influye la hipertermia sobre virus o afecta el proceso de replicación viral y cuáles son los mecanismos involucrados en la replicación del WSSV. También sería interesante saber cual sería el efecto de la PGA 1 en otros modelos virales que afectan los camarones y conocer sus efectos en la replicación viral.

Como conclusión, en este trabajo se ha obtenido evidencia experimental acerca de inducción de las hsps70 por parte de PGA1, aunque no se logró la protección efectiva contra la infección de WSSV en camarones *L. vannamei*. Además, se constató que la infección viral por sí misma produce la inducción de las hsps70, lo que parece indicar que la estimulación de la expresión de esas proteínas por parte del tratamiento de hipertermia, que sí protegió adecuadamente a los camarones ante el reto, no es el factor protector, sino que la hipertermia induce otro tipo de moléculas o mecanismos aún desconocidos para la protección del camarón ante las enfermedades virales.

Literatura Citada

- Amici, C., C. Giorgi, A. Rossi y M. G. Santoro (1994). Selective Inhibition of Virus Protein Synthesis by Prostaglandin A1: a Translational Block Associated with HSP70 Synthesis. Journal of Virology 68(11): 6890-6899.
- Amici, C., L. Sistonen, M. G. Santoro y R. I. Morimoto (1992). Antiproliferative prostaglandins activate heat shock transcription factor. Biochemistry 89: 6227-6231.
- Aufricht, C. (2005). Heat-shock protein 70: molecular supertool? Pediatric Nephrology 20: 707-713.
- Bachère, E. (2000). Shrimp Immunity and Disease Control. Aquaculture 191: 3-11.
- Bailey-Brock, J. H. y S. M. Moss (1992). Penaeid Taxonomy, Biology and Zoogeography, Elsevier Science Publishers.
- Barbosa, J. A. y M. A. Rebello (1998). Inhibition of Mayaro Virus Replication by Prostaglandin A1 in Aedes Albopictus cells. Revista de Microbiologia 29: 1-12.
- Braak, K. v. d. (2002). Haemocytic defense in black tiger shrimp (Penaeus monodon). Wageningen Institute of Animal Sciences. Wageningen, Wageningen University. PhD thesis.
- Bell A. T. y D. Lightner. (1988). A handbook of Normal Penaeid Shrimp Histology. World Aquaculture Society. Baton Rouge, Louisiana.
- Briggs, M., S. Funge-Smith, R. Subasinghe y M. Phillips (2004). Introductions and movement of Penaeus vannamei and Penaeus stylirostris in Asia and the Pacific. Bangkok, Food and Agricultural Organization of the United Nations.

- Bustamante, M. L. U. (2001). Distribucion, Incidencia y Transmision del Virus del Sindrome de la Mancha Blanca (WSSV) en el Cultivo de Camaron Blanco del Pacifico (*Litopenaeus vannamei*) Cultivado en el Noroeste de Mexico. Departamento de Bitotecnologia Marina. Ensenada, Centro de Investigacion Cientifica y de Educacion Superior de Ensenada. Doctor: 110.**
- Chang, C.-F., M.-S. Su, H.-Y. Chen y I.-C. Liao (2003). Dietary beta-1,3-glucan effectively improves immunity and survival of *Penaeus monodon* challenged with white spotsyndrome virus. Fish & Shellfish Immunology 15: 297-310.**
- Chotigeat, W., S. Tongsupa, K. Supamataya y A. Phongdara (2004). Effect of Fucoidan on Disease Resistance of Black Tiger Shrimp. Aquaculture 233: 23-30.**
- Cimino, E. J., L. Owens, E. Bromage y T. A. Anderson (2002). A newly developed ELISA showing the effect of environmental stress on levels of hsp86 in *Cherax quadricarinatus* and *Penaeus monodon*. Comparative Biochemistry and Physiology 132(Part A): 591-598.**
- Conti, C., A. d. Marco, P. Mastromarino, P. Tomao y M. G. Santoro (1999). Antiviral Effect of Hyperthermic Treatment in Rhinovirus Infection. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 43(4): 822-829.**
- Conti, C., P.Mastromarino, P.Tomao, A. d. Marco, F. Pica y M. G. Santoro (1996). Inhibition of Poliovirus Replication by Prostaglandins A and J in Human Cells. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 40(2): 367-372.**
- Conti, G., P. Portincasa, S. Visalli y C. Chezzi (2001). Inhibition by prostaglandin PGA1 on the multiplication of influenza virus is a dose-dependent effect. Virus Research 75: 43-57.**
- Corbel, V., Zuprizal, Z. Shi, C. Huang, Sumartono, J.-M. Arcier y J.-R. Bonami (2001). Experimental infection of European crustaceans with white spot syndrome virus (WSSV). Journal of Fish Diseases 24: 377-382.**
- de la Rosa-Vélez, J. 2006. La camaronicultura: panorama del desarrollo de una industria millonaria en México y en el mundo. Revista Universitaria 55: 2-9**

- Destoumieux, D., M. Muñoz, C. Cosseau, J. Rodriguez, P. Bulet, M. Comps y E. Bachère (2000). Penaeidins, antimicrobial peptides with chitin-binding activity, are produced and stored in shrimp granulocytes and released after microbial challenge. Journal of Cell Science 113: 461-469.
- Dupuy, J.-W., J.-R. Bonami y P. Roch (2004). A synthetic antibacterial peptide from *Mytilus galloprovincialis* reduces mortality due to white spot syndrome virus in palaemonid shrimp. Journal of Fish Diseases 27: 57-64.
- Durand, S., D. V. Lightner, R. M. Redman y J.-R. Bonami (1997). Ultrastructure and morphogenesis of White Spot Syndrome Baculovirus (WSSV). Diseases of Aquatic Organisms 29: 205-211.
- FAO (2003). Biología de Camarones Peneidos, FAO.
- Félix, S. d. C. L. (2002). Determinación y Evaluación por P.C.R., de la Presencia del Virus del Síndrome de la Mancha Blanca (WSSV), en Unidades de Producción Camaronícola del Estado de Sinaloa. Unidad Mazatlán en Acuicultura y Manejo Ambiental. Mazatlán, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Maestría: 120.
- Guan, Y., Z. Yu y C. Li (2003). The effects of temperature on white spot syndrome infections in *Marsupenaeus japonicus*. Journal of Invertebrate Pathology 83: 257-260.
- Hameed, A. S. S., B. L. M. Murthi, M. Rasheed, S. Sathish, K. Yoganandhan, V. Murugan y K. Jayaraman (2002). An investigation of *Artemia* as a possible vector for white spot syndrome virus (WSSV) transmission to *Penaeus indicus*. Aquaculture 204: 1-10.
- Hasday, J. D. y I. S. Singh (2000). Fever and the heat shock response: distinct, partially overlapping process. Cell Stress & Chaperones 5(5): 471-480.
- Hirayama, E., H. Atagi, A. Hiraki y J. Kim (2004). Heat Shock Protein 70 Is Related to Thermal Inhibition of Nuclear Export of the Influenza Virus Ribonucleoprotein Complex. Journal of Virology 78: 1263-1270.

- Hulten, M. C. W. v., M. Reijns, A. M. G. Vermeesch, F. Zandbergen y J. M. Vlak (2002). Identification of VP19 and VP15 of white spot syndrome virus (WSSV) and glycosilation status of the WSSV major structural proteins. Journal of General Virology 83: 257-265.
- Jiravanichpaisal, P., K. Soderhall y I. Soderhall (2004). Effect of water temperature on the immune response and infectivity pattern of white spot syndrome virus (WSSV) in freshwater crayfish. Fish & Shellfish Immunology 17: 265-275.
- Kumar S. y K. Tamura. (2004) MEGA 3: Integrated Software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and Secuence Alignments. Briefings in Bioinformatics 5, 2: 150-163.
- Kluger, M. J., D. H. Ringler y M. R. Anver (1975). Fever and Survival. Science 188: 166-168.
- Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685.
- Lightner, D. V. (1996). A Handbook of Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Penaeid Shrimp., The World Aquaculture Society.
- Lightner, D. V.y R. M. Redman (1998). Shrimp diseases and current diagnostic methods. Aquaculture 164: 201-220.
- Linquist, S.y E. A. Craig (1988). The Heat shock Proteins. Annual Reviews in Genetics 22: 631-677.
- Lo, W.-Y., K.-F. Liu, I.-C. Liao y Y.-L. Song (2004). Cloning and molecular characterization of heat shock cognate 70 from tiger shrimp (*Penaeus monodon*). Cell Stress & Chaperones 9(4): 332-343.
- Lotz, J. M. (1997). Special topic review: Viruses, biosecurity and specific pathogen-free stocks in shrimp aquaculture. World Journal of Microbiology & Biotechnology 13: 405-413.
- Moullac, G. L. y P. Haffner (2000). Environmental factors affecting immune responses in Crustacea. Aquaculture 191: 121-131.

Namikoshi, A., J. L. Wu, T. Yamashita, T. Nishizawa, T. Nishioka, M. Arimoto y K. Muroga (2004). Vaccination trials with *Penaeus japonicus* to induce resistance to white spot syndrome virus. Aquaculture 229: 25-35.

OIE (2003). Chapter I.3 - Crustaceans Diseases, OIE.

Parker, J., P. B. Ahrens y H. Ankel (1995). Antiviral effect of cyclopentenone prostaglandins on vesicular stomatitis virus replication. Antiviral Research 26: 83-96.

Pascual, C., A. Sánchez, A. Sánchez, F. Vargas-Albores, G. LeMoullac y C. Rosas (2003). Haemolymph metabolic variables and immune response in *Litopenaeus setiferus* adult males: the effect of an extreme temperature. Aquaculture 218: 637-650.

Pica, F., A. T. Palamara, A. Rossi, A. d. Marco, C. Amici y G. Santoro (2000). Delta12-Prostaglandin j2 Is a Potent Inhibitor of Influenza A Virus Replication. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 44(1): 200-204.

Prohászka, Z. y G. Füst (2004). Immunological aspects of heat-shock proteins - the optimum stress of life. Molecular Immunology 41: 29-44.

Rajendran, K. V., K. K. Vijayan, T. C. Santiago y R. M. Krol (1999). Experimental host range and histopathology of white spot syndrome virus (WSSV) infection in shrimp, prawns, crabs and lobsters from India. Journal of Fish Diseases 22: 183-191.

Rendón, L. y J. L. Balcázar (2003). Inmunología de camarones: Conceptos básicos y recientes avances. AquaTic 19: 27-33.

Robert, J. (2003). Evolution of heat shock protein and immunity. Developmental and Comparative Immunology 27: 449-464.

Rodriguez, J., V. Boulo, E. Mialhe y E. Bachere (1995). Characterization of shrimp haemocytes and plasma components by monoclonal antibodies. Journal of Cell Science 108: 1043-1050.

- Rossi, A., G. Elia y M. G. Santoro (1996). 2-Cyclopenten-1-one, a New Inducer of Heat Shock Protein 70 with Antiviral Activity. The Journal of Biological Chemistry 271(50): 32192-32196.
- Rozera, C., A. Carattoli, A. D. Marco, C. Amici, C. Giorgi y M. G. Santoro (1996). Inhibition of HIV-1 Replication by Cyclopentenone Prostaglandins in Acutely Infected Human Cells. J. Clin. Invest. 97(8): 1795-1803.
- Samali, A. y T. G. Cotter (1996). Heat Shock Proteins Increase Resistance to Apoptosis. Experimental Cell Research 223: 163-170.
- Sangamaheswaran, A. P. y M. J. P. Jeyaseelan (2001). White Spot Viral Disease in Penaeid Shrimp - A Review. Naga, The ICLARM Quartely 24(3 &4): 16-22.
- Santoro, M. G., A. Benedetto, G. Carruba, E. Garaci y B. M. Jaffe (1980). Prostaglandin A Compounds as Antiviral Agents. Science 209: 1032-1034.
- Santoro, M. G., E. Garaci y C. Amici (1990). Induction of HSP70 by Prostaglandins.
- Sathish, S., C. Selvakkumar, A. S. S. Hameed y R. B. Narayanan (2004). 18-kDa protein as a marker to detect WSSV infection in shrimps. Aquaculture 238: 39-50.
- Sritunyalucksana, K. (2001). Characterisation of Some Immune Genes in the Black Tiger Shrimp, *Penaeus monodon*. Department of Comparative Physiology, Evolutionary Biology Centre. Uppsala, University of Uppsala. Doctor: 45.
- Subasinghe, R. P., M. G. Bondad-Reantaso y S. E. McGladdery (2001). Aquaculture Development, Health and Wealth. Bangkok, NACA/FAO.
- Vega, E. d. I., M. R. Hall, B. M. Degnan y K. J. Wilson (2006). Short-term hyperthermic treatment of *Penaeus monodon* increases expression of heat shock protein 70 (HSP70) and reduces replication of gill associated virus (GAV). Aquaculture 253: 82-90.

- Vidal, O. M., C. B. Granja y F. Aranguren (2001). A Profound Effect of Hyperthermia on Survival of *Litopenaeus vannamei* Juveniles with White Spot Syndrome Virus. Journal of the World Aquaculture Society 32(4): 364-372.
- Wang, C. S., K. F. J. Tang, G. H. Kou y S. N. Chen (1997). Light and Electron microscopic evidence of White Spot Disease in the Giant Tiger Shrimp, *Penaeus monodon* (Fabricius), and the kuruma shrimp, *Penaeus japonicus* (Bate), culture in Taiwan. Journal of Fish Diseases 20: 323-331.
- Wang, Y.-C., C.-F. Lo, P.-S. Chang y G.-H. Kou (1998). Experimental infection of white spot baculovirus in some cultured and wild decapods in Taiwan. Aquaculture 164: 221-231.
- Witteveldt, J., J. M. Vlaskovits y M. C. W. v. Hulst (2004). Protection of *Penaeus monodon* against white spot syndrome virus using a WSSV subunit vaccine. Fish & Shellfish Immunology 16: 571-579.
- Zugel, U. y S. H. E. Kaufmann (1999). Role of heat shock proteins in protection from and pathogenesis of infectious diseases. Clinical Microbiology Reviews 12(1): 19-39.

Anexos

Anexo 01

Protocolo de extracción de ARN

Adicionar 400 μ l de Trizol y homogenizar con vórtex. Dejar incubar por 10 minutos a temperatura ambiente.

Adicionar 50 μ l de agua destilada estéril con 0.1% DEPC y agitar vigorosamente. Incubar por 10 minutos.

Adicionar 100 μ l de cloroformo, agitar e incubar por 5 minutos.

Centrifugar a 14 000 X g por 15 minutos a 4°C.

Sacar el sobrenadante tomando el cuidado de no tocar la interfase y transferir a un tubo limpio.

Adicionar 200 μ l de cloroformo y agitar suavemente. Incubar por 10 minutos.

Centrifugar a 14 000 X g por 15 minutos a 4°C .

Sacar el sobrenadante y transferir a un tubo limpio.

Adicionar isopropanol frío en una proporción de 1:1 con el sobrenadante recuperado. Agitar suavemente y dejar reposar por 10 minutos en temperatura ambiente.

Centrifugar a 14 000 X g por 15 minutos a 4°C.

Eliminar el sobrenadante vertiendo el contenido del tubo cuidadosamente para no desprender el precipitado de la pared del tubo.

Adicionar 1000 μ l de etanol al 75% frío y agitar suavemente tomando el cuidado de no desprender el precipitado de la pared del tubo.

Centrifugar a 7500 X g por 5 minutos a 4°C.

Verter el sobrenadante con cuidado para no desprender el precipitado de la pared del tubo.

Secar bien para eliminar cualquier vestigio de etanol.

Resuspender el precipitado en 20 μ l de agua estéril tratada con DEPC (dietilpiracarbonato).

Anexo 02

Protocolo para preparación de la solución MOPS 10X, pH 7.0

- 200 mM de MOPS (ácido 4-morfolinpropanesulfónico)
- 50 mM de acetato de sodio
- 20mM de EDTA (etilendiaminotetraacético)
- hidróxido de sodio

Disolver el MOPS, el Acetato de Sodio y el EDTA en agua estéril con 0.1% DEPC y ajustar el pH con NaOH.

Protocolo para separación de ARN en gel de agarosa - 1%

- 1 g de agarosa
- 10 ml de MOPS 10X
- 85.76 ml de agua estéril 0.1% DEPC
- 4.23 ml de formaldehído 37%
- 2.3 μ l de bromuro de etidio

Mezclar el MOPS 10X y el agua, adicionar la agarosa y calentar la solución hasta que se vea transparente. Cuando la solución alcance 40° C aproximadamente adicionar el formaldehído y el bromuro de etidio. Mezclar bien y verter el gel en el recipiente (libre de RNAsas) para polimerizar el gel.

El amortiguador del electrodo utilizado para la electroforesis es MOPS 1X.

Anexo 03

Protocolo para la síntesis de ADN complementario (Super Script® - Invitrogen)

Cóctel para una reacción (20µl):

- 1 µl de oligo dT
- 2 µl de dNTPs
- 4 µl de amortiguador provisto por el kit
- 2 µl de DTT (ditiotreitól)
- 0.2 µl de transcriptasa reversa Super Script® (Invitrogen)
- [X] de ARN
- [X] de agua estéril con 0.1% de DEPC

Preparar el cóctel dependiendo de la cantidad de reacciones necesarias. Aparte, adicionar el ARN al agua y calentar a 65° C por 5 minutos. Transferir la muestra inmediatamente en hielo. Adicionar el cóctel a cada muestra.

El termociclador debe estar programado de la siguiente manera:

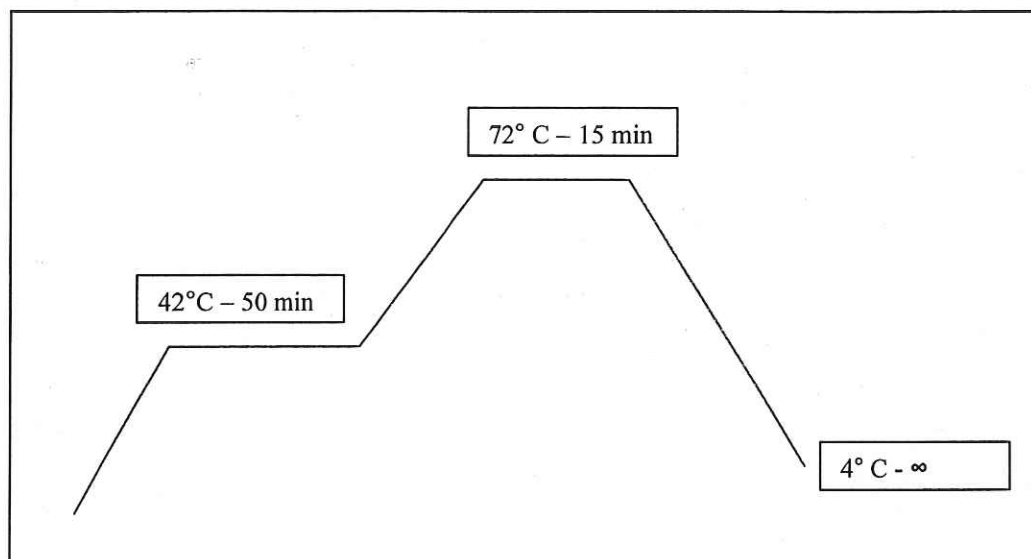


Figura 20 – Ciclo de temperaturas durante la reacción de síntesis de ADNc.

Anexo 04

Protocolo de reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Cóctel para una reacción (25µl):

- 0.75µl de cloruro de magnesio (50mM)
- 2.75 µl de amortiguador de PCR
- 2 µl de dNTPs (10 mM)
- 0.7 µl de cebador *forward* (10 mM)
- 0.7 µl de cebador *reverse* (10 mM)
- 16.1µl de agua estéril tratada con DEPC
- 2 µl de Taq polimerasa (producida en el Lab. de Ecología Molecular – UABC)

Adicionar 1 μ l de ADN en cada reacción. Hacer una reacción de más y adicionar agua estéril en el lugar del ADN como control negativo para tener la seguridad de que los reactivos no están contaminados.

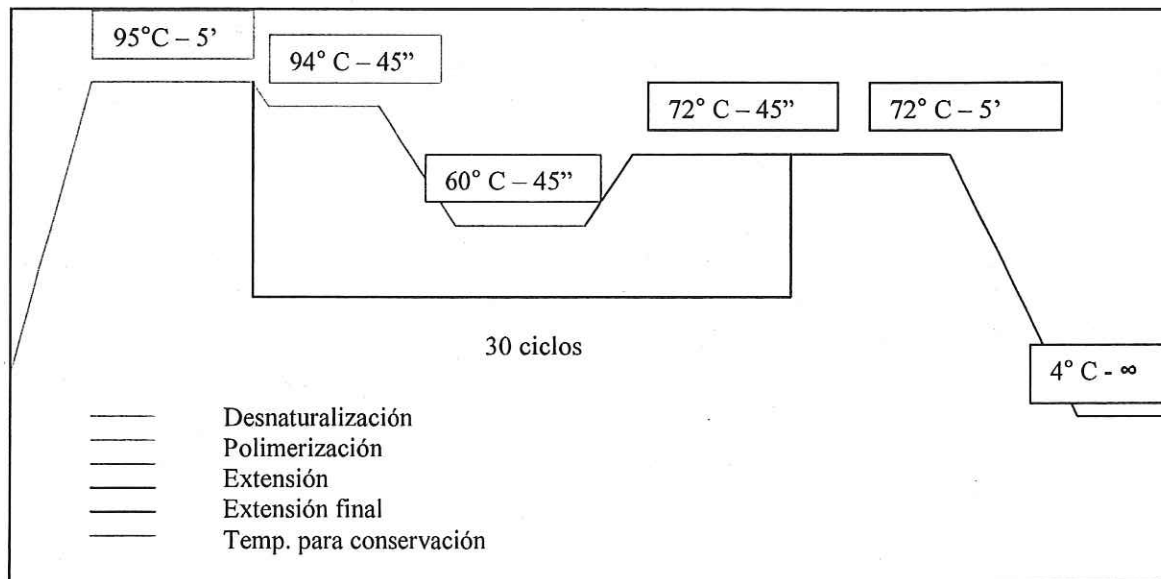


Figura 21 – Ciclo de temperaturas en la reacción de PCR.

Anexo 05

Solución Davidson (1 Litro)

- 330 ml de etanol
- 220 ml de formalina
- 115 ml de ácido acético glacial
- 335 ml de agua destilada

Anexo 06

Inclusión en parafina utilizando procesador de tejidos automático

Los tejidos fijados fueron incluidos en casetes especiales para el procesamiento de muestras histológicas. El procesador automático de tejidos fue programado de la siguiente manera:

- Etanol 70% - 1 hora
- Etanol 70% - 1 hora
- Etanol 80% - 1 hora
- Etanol 80% - 1 hora
- Etanol 95% - 1 hora
- Etanol 95% - 1 hora
- Etanol 100% - 1 hora
- Etanol 100% - 1 hora
- Xileno - 1 hora
- Xileno - 1 hora
- Paraplast - 1 hora
- Paraplast - 1 hora

Después del último baño de parafina el tejido fue puesto en los moldes para la formación del bloque de parafina, teniendo cuidado de eliminar cualquier burbuja de aire presente en los tejidos con la ayuda de una aguja de disección. Los bloques fueron conservados a -20°C hasta el momento del corte. El bloque fue cortado con un micrótopo ajustado a un grosor de $7\ \mu\text{m}$. Posteriormente, los cortes fueron transferidos a un

baño de agua a 40° C con 1 g de grenetina y entonces adheridos a una laminilla de vidrio.

Después de secadas las laminillas fueron teñidas siguiendo el siguiente procedimiento:

- Xileno – 5 minutos
- Xileno – 5 minutos
- Etanol 100% - 10 inmersiones
- Etanol 100% - 10 inmersiones
- Etanol 95% - 10 inmersiones
- Etanol 95% - 10 inmersiones
- Etanol 80 % - 10 inmersiones
- Etanol 80 % - 10 inmersiones
- Etanol 50 % - 10 inmersiones
- Agua destilada – 6 enjuagues cambiando el agua a cada enjuague
- Hematoxilina – 5 minutos
- Agua corriente – 5 minutos
- Eosina – 2 minutos
- Etanol 95% - 10 inmersiones
- Etanol 100% - 10 inmersiones
- Xileno – 10 inmersiones
- Xileno – 10 inmersiones
- Xileno – 10 inmersiones
- Xileno – 10 inmersiones

Inmediatamente después del último baño de xileno, fue aplicada la resina a un lado de la laminilla y colocado el cubreobjetos, tomando la precaución de no atrapar burbujas de aire. Fue hecho de forma rápida a modo de evitar que el tejido se seque.

Anexo 07

Inóculo de WSSV

El inóculo viral se hizo a partir de homogenizado de tejido de 5 organismos infectados (comprobado por medio de PCR). De cada organismo se extrajo un pleópodo (peso total aproximado de 0.244 g) y fueron adicionados 500 μ l de solución salina al 2%. El homogenizado fue centrifugado aumentando la velocidad de forma progresiva:

- 1 500 x g – 10 minutos
- 3 000 x g – 10 minutos
- 7 000 x g – 10 minutos
- 10 000 x g – 10 minutos
- 14 000 x g – 20 minutos
- 14 000 x g – 20 minutos

El sobrenadante fue recuperado y a este se le adicionó solución salina en una proporción de 1:1. Posteriormente el inóculo fue filtrado a 2 μ m.

Anexo 08

Inóculo de prostaglandina A1

- 1 μ l de solución inicial de prostaglandina A1 (10 mg/ml)
- 1 ml de solución salina (NaCl al 2%)

La prostaglandina fue adicionada a la solución salina y la mezcla fue filtrada utilizándose un filtro de jeringa de 2 μm , resultando en una concentración final de 10 $\mu\text{g/ml}$.

Anexo 09

Solución anticoagulante

- NaCl – 450 mM
- KCl – 10 mM
- Hepes – 10 mM
- EDTA – 10 mM

Disolver todos los solutos en 1 litro de agua destilada estéril y ajustar el pH a 7.3. Conservar a 4° C.

Anexo 10

Solución inicial de Bis/Acrilamida (30%)

- 29% de acrilamida (p/v)
- 1% N, N'- metilenobisacrilamida

La solución debe ser preparada con agua desionizada y posteriormente filtrada a 0.4 μm .

El pH no debe ser menor a 7.0. La solución debe ser almacenada en botella ámbar a 4° C por un máximo de dos meses.

Anexo 11

Amortiguador Tris - HCl/ SDS (1.5M, 0.4 % SDS, pH 8.8)

- 36.4 g de Tris base
- 0.8 g de SDS (dodecil sulfato de sodio)
- Agua desionizada
- HCl (ácido clorhídrico)

Disolver el Tris en 100 ml de agua desionizada y ajustar el pH a 8.8 con HCl 1M. Adicionar el SDS y aforar a 200 ml. Almacenar a 4° C hasta por un mes.

Anexo 12

Amortiguador Tris - HCl/ SDS (0.5M, 0.4 % SDS, pH 6.8)

- 3.025 g de Tris base
- 0.2 g de SDS
- Agua desionizada
- HCl

Disolver el Tris en 20 ml de agua desionizada y ajustar el pH a 6.8 con HCl. Adicionar el SDS y aforar a 50 ml. Almacenar a 4° C hasta por un mes.

Anexo 13

Amortiguador de electroforesis (5 X)

- 15.1 g de Tris base (conc. final 0.125 M)
- 72 g de glicina (conc. final 0.96 M)
- 5 g de SDS (conc. final 0.5 % p/v)

Disolver en 800 ml de agua desionizada y aforar a 1 litro. No es necesario ajustar el pH, este debe ser de 8.3 en la solución de trabajo (1 X). Almacenar a 4° C por un máximo de dos meses.

Anexo 14

Amortiguador de muestra

- 15 ml de amortiguador Tris - HCl (0.5 M, pH 6.8)
- 1.07 g SDS (conc. final 10% - p/v)
- 2.25 ml de glicerol (conc. final 15%)
- 300 µl de β-mercaptoetanol
- 0.0075 g de azul de bromofenol (0.05%)

Anexo 15

Gel de poliacrilamida - Concentrador (3.9 % acrilamida)

- 0.65 ml de acrilamida (30%) – Anexo 10
- 1.25 ml de amortiguador Tris-Cl, pH 6.8 – Anexo 12
- 3.05 ml de agua desionizada
- 25 µl de persulfato de amonio 1% (preparado inmediatamente antes del uso)
- 5 µl de TEMED

Adicionar la solución de acrilamida, el amortiguador y el agua en un kitasato, mezclar bien. Conectar el kitasato en una bomba de vacío por 30 segundos para eliminar el aire del gel. Adicionar el persulfato de amonio y el TEMED, mezclar bien y verter la mezcla sobre el gel de separación.

Anexo 16

Gel de poliacrilamida - Separación (10 % acrilamida)

- 5 ml de acrilamida (30 %) – Anexo 10
- 3.75 ml de amortiguador Tris-Cl, pH 8.8 – Anexo 11
- 6.25 ml de agua desionizada
- 50 µl de persulfato de amonio 1% (preparado inmediatamente antes del uso)
- 10 µl de TEMED

Adicionar la solución de acrilamida, el amortiguador y el agua en un kitasato, mezclar bien. Conectar el kitasato en una bomba de vacío por 30 segundos para eliminar el aire del gel. Adicionar el persulfato de amonio y el TEMED, mezclar bien y verter la mezcla entre los vidrios para formar el gel.

Anexo 17

Amortiguador de extracción de proteínas

- 10 mM Tris-HCl (pH 7.8)
- 10 mM EDTA
- 1.5 % SDS (p/v)
- 2 μ M de inhibidor de proteínasa

La solución debe ser preparada diluyendo los solutos en agua desionizada. Conservar en temperatura ambiente.

Anexo 18

Amortiguador de transferencia

- 39 mM de glicina
- 48 mM de Tris base
- 0.037% de SDS

Disolver todos los solutos en agua desionizada. Conservar a 4° C. La solución debe ser cambiada a cada transferencia.

Anexo 19

Solución bloqueadora para membrana PVDF (difluoruro de polivinilideno) (WesternBreeze)

- 5 ml de agua desionizada estéril
- 2 ml de diluyente bloqueador (A) – provisto en el kit
- 3 ml de diluyente bloqueador (B) – provisto en el kit

Preparar la solución en el mismo día del uso.

Anexo 20

Solución de anticuerpos primarios

- 7 ml de agua desionizada estéril
- 2 ml de diluyente bloqueador (A) – provisto en el kit
- 1 ml de diluyente bloqueador (B) - provisto en el kit
- 1 µl de anticuerpo policlonal – Anti HSP 70 inducible de humano (1:30,000) (StressGene)

Preparar inmediatamente antes del uso.

Anexo 21

Solución de lavado

- 150 ml de agua desionizada estéril
- 10 ml de solución lavadora del anticuerpo (16X) – provista en el kit

Preparar en el mismo día del uso.

Anexo 22

Alineamiento realizado en el GenBank

Clave de las secuencias comparadas en alineamiento.

Distribution of 325 Blast Hits on the Query Sequence

Sequences producing significant alignments: (Bits) Value

gi 58373285 gb AY748350.1 Fenneropenaeus chinensis heat choc...	4143
0.0	
gi 33319728 gb AF474375.1 Penaeus monodon heat shock protein 70	3784
0.0	
gi 48766850 gb AY645906.1 Litopenaeus vannamei heat shock prote	3481
0.0	
gi 107123921 gb DQ663761.1 Marsupenaeus japonicus heat shock...	2321
0.0	
gi 94470204 gb DQ486134.1 Metapenaeus ensis HSC70 (Hsc70) mRNA,	1788
0.0	
gi 74274967 gb DQ173922.1 Pachygrapsus marmoratus heat shock...	1604
0.0	
gi 107123898 gb DQ663760.1 Callinectes sapidus heat shock pr...	1217
0.0	
gi 74274969 gb DQ173923.1 Homarus americanus heat shock protein	1049
0.0	
gi 77403898 gb BT023894.1 Drosophila melanogaster LP19893 full	769 0.0
gi 28571720 ref NM_176503.1 Drosophila melanogaster Heat sho...	769
0.0	
gi 28571718 ref NM_176502.1 Drosophila melanogaster Heat sho...	769
0.0	

gi|24647037|ref|NM_169627.1| *Drosophila melanogaster* Heat sho... 769
0.0
gi|24647035|ref|NM_169626.1| *Drosophila melanogaster* Heat sho... 769
0.0
gi|24647033|ref|NM_169625.1| *Drosophila melanogaster* Heat sho... 769
0.0
gi|28571722|ref|NM_079632.4| *Drosophila melanogaster* Heat sho... 769
0.0
gi|15451478|gb|AC009904.7| *Drosophila melanogaster*, chromosom... 769
0.0
gi|13096034|gb|AC007648.6|AC007648 *Drosophila melanogaster*, c... 769
0.0
gi|23171318|gb|AE003708.3| *Drosophila melanogaster* chromosome... 769
0.0
gi|94468965|gb|DQ440299.1| *Aedes aegypti* clone AET-381 heat s... 761
0.0
gi|157660|gb|L01500.1|DROHSC4A *Drosophila melanogaster* heat s... 761
0.0
gi|19527632|gb|AY084193.1| *Drosophila melanogaster* RH04426 full 753
gi|157663|gb|M36114.1|DROHSC4A2 *D.melanogaster* heat shock cognat 729
0.0
gi|7363335|gb|AF182195.1|AF182195 *Guancha lacunosa* heat shock pr 708
0.0
gi|33598989|gb|AY219845.1| *Cyprinus carpio* constitutive heat ... 700
0.0
gi|7715510|gb|AF252689.1|AF252689 *Drosophila simulans* strain ... 688
0.0
gi|7715506|gb|AF252687.1|AF252687 *Drosophila simulans* strain ... 688
0.0
gi|7716925|gb|AF255317.1|AF255317 *Drosophila yakuba* heat shoc... 672
0.0
gi|56428823|gb|AY804677.1| *Drosophila yakuba* strain Tail8 Hsc... 670
0.0
gi|56428821|gb|AY804676.1| *Drosophila santomea* strain STO.4 H... 662
0.0
gi|7715518|gb|AF252693.1|AF252693 *Drosophila simulans* strain ... 648
0.0
gi|7715514|gb|AF252691.1|AF252691 *Drosophila simulans* strain ... 648
0.0
gi|7715512|gb|AF252690.1|AF252690 *Drosophila simulans* strain ... 648
0.0
gi|82941223|dbj|AB214973.1| *Plutella xylostella* hsc70 mRNA fo... 644
0.0
gi|60223020|dbj|AB196460.1| *Oncorhynchus mykiss* HSC70A mRNA f... 642
1e-180
gi|7715516|gb|AF252692.1|AF252692 *Drosophila simulans* strain ... 640
5e-180
gi|6457365|gb|AF194819.1|AF194819 *Manduca sexta* heat shock cogna 634
3e-178
gi|39979268|dbj|AB006814.1| *Paralichthys olivaceus* mRNA for hsc7 620
4e-174
gi|32813264|dbj|AB114672.1| *Canis familiaris* hsp70 mRNA for h... 603
1e-168

gi|32813270|dbj|AB114675.1| *Canis familiaris* hsp70 mRNA for h... 603
1e-168
gi|32813268|dbj|AB114674.1| *Canis familiaris* hsp70 mRNA for h... 603
1e-168
gi|32813266|dbj|AB114673.1| *Canis familiaris* hsp70 mRNA for h... 603
1e-168
gi|55731225|emb|CR860185.1| *Pongo pygmaeus* mRNA; cDNA DKFZp46... 601
4e-168
gi|60223022|dbj|AB196461.1| *Oncorhynchus mykiss* HSC70B mRNA f... 597
6e-167
gi|55729578|emb|CR859344.1| *Pongo pygmaeus* mRNA; cDNA DKFZp46... 593
1e-165
gi|188489|gb|M59830.1|HUMMHSP2 Human MHC class III HSP70-2 gene 587
6e-164
gi|32967447|gb|AY226078.1| *Monosiga brevicollis* type Mb_C 70-... 585
2e-163
gi|39645781|gb|BC063507.1| *Homo sapiens* heat shock 70kDa prot... 579
1e-161
gi|33876702|gb|BC002453.2| *Homo sapiens* heat shock 70kDa prot... 579
1e-161
gi|4529886|gb|AF134726.1| *Homo sapiens* BAC clone 215O12 NG35,... 579
1e-161
gi|27848025|emb|AL929592.8| Human DNA sequence from clone DAQ... 579
1e-161
gi|21212198|emb|AL671762.10| Human DNA sequence from clone XX... 579
1e-161
gi|18673924|emb|AL662834.8| Human DNA sequence from clone XXb... 579
1e-161
gi|26787973|ref|NM_005345.4| *Homo sapiens* heat shock 70kDa prote 579
1e-161
gi|56369810|emb|CR759915.6| Human DNA sequence from clone DAA... 579
1e-161
gi|54606625|emb|CR388202.9| Human DNA sequence from clone DAD... 579
1e-161
gi|50507099|emb|CR626292.1| full-length cDNA clone CS0DF038YK... 579
1e-161
gi|50505685|emb|CR624878.1| full-length cDNA clone CS0DF012YA... 579
1e-161
gi|50502585|emb|CR621778.1| full-length cDNA clone CS0DE003YF... 579
1e-161
gi|50501507|emb|CR620700.1| full-length cDNA clone CS0DM001YK... 579
1e-161
gi|50499568|emb|CR618761.1| full-length cDNA clone CS0DN003YF... 579
1e-161
gi|50489994|emb|CR609187.1| full-length cDNA clone CS0DF023YF... 579
1e-161
gi|50489901|emb|CR609094.1| full-length cDNA clone CS0DF023YO... 579
1e-161
gi|50488917|emb|CR608110.1| full-length cDNA clone CS0DJ004YG... 579
1e-161
gi|50487679|emb|CR606872.1| full-length cDNA clone CS0DF021YI... 579
1e-161
gi|50487177|emb|CR606370.1| full-length cDNA clone CS0DI037YG... 579
1e-161

gi|50486659|emb|CR605852.1| full-length cDNA clone CS0DA010YP... 579
1e-161
gi|50486459|emb|CR605652.1| full-length cDNA clone CS0DF033YK... 579
1e-161
gi|50484619|emb|CR603812.1| full-length cDNA clone CS0DF020YJ... 579
1e-161
gi|50480065|emb|CR599258.1| full-length cDNA clone CS0DF007YE... 579
1e-161
gi|50479487|emb|CR598680.1| full-length cDNA clone CS0DC028YM... 579
1e-161
gi|50476480|emb|CR595673.1| full-length cDNA clone CS0DE002YK... 579
1e-161
gi|50474665|emb|CR593858.1| full-length cDNA clone CS0DF022YI... 579
1e-161
gi|50472193|emb|CR591386.1| full-length cDNA clone CS0DI003YO... 579
1e-161
gi|90657251|gb|DQ451402.1| Homo sapiens heat shock 70kDa prot... 579
1e-161
gi|88698111|gb|DQ388429.1| Homo sapiens heat shock 70kDa prot... 579
1e-161
gi|46358448|gb|AC148662.1| Macaca mulatta Major Histocompatib... 579
1e-161
gi|61372080|gb|AY891855.1| Synthetic construct Homo sapiens c... 579
1e-161
gi|60655190|gb|AY889368.1| Synthetic construct Homo sapiens c... 579
1e-161
gi|110624134|dbj|AK225699.1| Homo sapiens mRNA for Heat shock... 579
1e-161
gi|110624127|dbj|AK225692.1| Homo sapiens mRNA for Heat shock... 579
1e-161
gi|47118306|dbj|BA000025.2| Homo sapiens genomic DNA, chromosome 579
1e-161
gi|188487|gb|M59828.1|HUMMHSP Human MHC class III HSP70-1 gene 579 1e-
161
gi|50490862|emb|CR610055.1| full-length cDNA clone CS0DF018YG... 577
6e-161
gi|34783613|gb|BC057397.1| Homo sapiens heat shock 70kDa prot... 571
4e-159
gi|26787974|ref|NM_005346.3| Homo sapiens heat shock 70kDa prote 571
4e-159
gi|39644862|gb|BC009322.2| Homo sapiens heat shock 70kDa prot... 571
4e-159
gi|50506765|emb|CR625958.1| full-length cDNA clone CS0DF029YC... 571
4e-159
gi|50493714|emb|CR612907.1| full-length cDNA clone CS0DF036YM... 571
4e-159
gi|17511779|gb|BC018740.1| Homo sapiens heat shock 70kDa prot... 571
4e-159
gi|62089221|dbj|AB209818.1| Homo sapiens mRNA for heat shock ... 571
4e-159
gi|77999571|gb|DQ202278.1| Fundulus heteroclitus macrolepidot... 565
2e-157
gi|109149647|ref|XM_001115060.1| PREDICTED: Macaca mulatta he... 563
9e-157

gi|74271760|dbj|AB206478.1| Chilo suppressalis hsc70 mRNA for... 523
7e-145
gi|29468049|gb|AY150182.1| Balanus amphitrite 70kDa heat shock p 511
3e-141
gi|32451997|gb|BC054782.1| Mus musculus heat shock protein 1A... 502
3e-138
gi|50080208|ref|NM_010479.1| Mus musculus heat shock protein 1A 502 3e-
138
gi|14010866|ref|NM_031971.1| Rattus norvegicus heat shock 70kD p 502
3e-138
gi|294567|gb|L16764.1|RATHSP70A Rattus norvegicus heat shock ... 502
3e-138
gi|46359615|dbj|AB122064.1| Crassostrea gigas HSC71 mRNA for ... 468
4e-128
gi|407163|emb|X75357.1|RNHS70P R.norvegicus (Wistar) hsp70 gene 466 2e-
127

