

Efecto de la temperatura sobre la actividad de los mecanismos del sistema inmune en *Litopenaeus vannamei* inoculados con WSSV.

Nora Cárcamo-Arechiga^{1,2}, Jorge Hernández-López¹, José Grijalva-Chon², Alejandro Varela-Romero², Marco López-Torres², Luis Medina-Juárez².

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR)¹, Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas²

Universidad de Sonora

Hermosillo, Son., México

noramca@gmail.com, jhlopez04@cibnor.mx, [mgrijal, avarela, malopez, amedina]@guayacan.uson.mx

Abstract-- Shrimp, an important source of protein for human consumption, is attacked by the white spot syndrome virus (WSSV)- Due to its defense system is based in humoral responses, a bioassay was developed to compare the effect of temperature on the activity of the immune mechanisms and expression levels of heat shock genes (HSP). The differences were more related to temperature conditions, concluding that the effect of temperature can be equal or greater than that caused by the pathogen as it influences biological processes. Mismanagement of the temperature and the presence of WSSV can be devastating for the survival of cultured shrimp.

Key Words: Shrimp, aquaculture, WSSV, aquatic pathology.

Resumen- El camarón, importante fuente de proteína para consumo humano, es atacado por el virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV). Tomando en cuenta que su sistema de defensa se basa en respuestas humorales, se desarrolló un bioensayo para comparar el efecto de la temperatura sobre la actividad de los mecanismos del sistema inmune y los niveles de expresión de los genes de choque térmico (HSP). Las diferencias encontradas, se relacionan más a los tratamientos térmicos, concluyendo que el efecto de la temperatura pueden ser igual o mayor al provocado por el patógeno, pues influye sobre los procesos biológicos. El mal manejo de la temperatura y la presencia de WSSV puede ser devastador para la sobrevivencia del camarón de cultivo.

Palabras clave: Camarón, acuicultura, WSSV, patología, acuícola.

I. INTRODUCCIÓN

La acuicultura juega un papel fundamental en la producción de proteínas de origen animal para el consumo humano [1]. En este sentido, el camarón es uno de los recursos más utilizados y debido a la disminución observada en poblaciones silvestres, el cultivo satisface la mayor parte de la demanda mundial [2]. Sin embargo, uno de los principales problemas en la acuicultura del camarón es la aparición de enfermedades ya que estas pueden causar grandes pérdidas económicas. Una de esas enfermedades de etiología viral es el síndrome de la mancha blanca (WSSV) causada por un virus altamente letal que pertenece a la familia Nimaviridae y al género *Whispovirus* [3], e infecta a una amplia variedad de crustáceos acuáticos [4].

Los camarones utilizan un sistema de defensa llamado inmunidad innata, que responde a la presencia de antígenos de la superficie celular de los patógenos potenciales. Estas respuestas celulares incluyen la fagocitosis, formación de nódulos y encapsulación [5, 6]. Las respuestas humorales se llevan a cabo por mecanismos especiales, como la expresión de profenoloxidasas (ProPO), el sistema de coagulación, inhibidores de la proteasa, péptidos antimicrobianos y otros factores humorales que se encuentran en la hemolinfa, el plasma y los hemocitos [5, 6].

En la respuesta inmunitaria del camarón, el sistema de especies de oxígeno reactivo (ROS), la lectina y la lisozima muestran un aumento más dramático en la respuesta inmune de lo que admite ProPO, después de la estimulación. La intensidad de la respuesta inmune muestra diferentes respuestas para los distintos tipos de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) [7]. La α -2 macroglobulina (A2M) es un inhibidor no específico de proteasa que participa en la defensa del huésped. Ma, Wang, Zhang, Li, y Xiang [8] reportaron que la A2M tiene una actividad de opsonización al realizar el análisis de sus perfiles de expresión en tejidos de *Fenneropenaeus chinensis* sanos e infectados con WSSV.

Otra molécula que se ha encontrado en los crustáceos utiliza hemocianina como transportador de oxígeno. Ésta molécula es la superóxido dismutasa que contiene manganeso citoplásmico (cMnSOD), encontrándose transcripciones de cMnSOD en hemocitos y otros órganos de *Litopenaeus vannamei*. Dado que los hemocitos son las células clave en la defensa del organismo y sus reacciones producen transcriptos de radicales súperóxido, Gómez-Anduro, Barillas-Mury, Peregrino-Uriarte, Gupta, Gollas-Galván *et al.* [9] investigaron los niveles de cMnSOD en organismos infectados con WSSV, encontrando un incremento y luego una disminución (conforme la infección viral progresa) a niveles significativamente más bajos que los organismos control no infectados, 12 horas después de la infección.

Las proteínas de choque térmico (HSP) llevan a cabo una serie de funciones que son esenciales para la supervivencia celular, son altamente conservadas [10, 11], actúan como acompañantes, señalan la comunicación célula a célula, y participan en la duplicación, transporte y ensamble de las proteínas; son sintetizadas como respuesta al estrés, proveniente de temperaturas extremas, altas concentraciones de iones, gases y diversas sustancias tóxicas y otras condiciones fisiológicas entre las que se compromete la apoptosis y la respuesta inmune [12, 13, 14, 15].

La temperatura es un factor importante para el apropiado desempeño fisiológico de los organismos. Se han llevado a cabo experimentos para evaluar el efecto de las variaciones de temperatura del agua en camarones, bajo la premisa de que la temperatura óptima para el crecimiento (temperatura de más rápido crecimiento) en camarones pequeños (<5 g) es superior al de los camarones más grandes (16 g) [16, 17]. El aumento de la temperatura en el agua de mar tiene un efecto sobre la infección por WSSV ya que altera significativamente la historia natural de la enfermedad. Se ha observado que temperaturas de 32 °C ayudan a prevenir la enfermedad, reducir la mortalidad y bloquear la replicación del virus en etapas tempranas de la infección en los juveniles de camarón blanco *L. vannamei* infectado con el virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV) [18, 19].

Teniendo en cuenta todo lo anterior, se llevó a cabo el presente trabajo para determinar el efecto de la temperatura sobre la actividad de las moléculas involucradas en el sistema de defensa de *L. vannamei* sometido a un proceso de infección con WSSV, esperando que las reacciones de los camarones fueran diferentes, en las distintas temperaturas utilizadas.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

A) Colección de muestras.

El experimento se llevó a cabo con 120 *Litopenaeus vannamei* de aproximadamente 15 g, proporcionados por la granja camaronícola Cruz de Piedra, ubicada en el municipio de Guaymas, Sonora, México, 110.68° de longitud oeste y 27.95° de latitud norte. Durante una semana, los camarones fueron colocados en tanques de 200 L para su adaptación a las condiciones de manipulación de laboratorio. Pasado este tiempo, se tomaron muestras de hemolinfa a todos los camarones y se

analizaron por PCR para verificar que los organismos fueran negativos a infecciones por WSSV y al virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa (IHHNV).

B) *Diseño del experimento*

De los 120 *L. vannamei* iniciales, se seleccionaron al azar 90 y se distribuyeron homogéneamente en seis acuarios de 60 L: tres acuarios a 20 °C (bajo), tres a 29 °C (medio), y tres a 32 °C (alto); en los que se mantuvieron una semana para su adaptación, antes de iniciar con los tratamientos. Los organismos fueron alimentados una vez al día con una dieta comercial (pellets Malta Clayton) y se realizaron recambios de agua con la temperatura correspondiente.

Para la infección experimental, se preparó un inóculo a partir del tejido muscular de camarón infectado por WSSV obtenido de una granja de cultivo del sur de Sonora, de acuerdo con la técnica propuesta por Escobedo-Bonilla, Audoorn, Wille, Alday-Sanz, Sorgeloos *et al.* [20]. Antes de la inoculación, se tomaron 500 µl de hemolinfa a cada camarón con una jeringa que contenía 500 µl de anticoagulante, de acuerdo con la técnica propuesta por Vargas-Albores, Guzmán, y Ochoa [21], correspondiendo ésta a la muestra al tiempo 0. Después, se inocularon en la región dorsal en el segundo segmento del cuerpo a 20 organismos de cada tratamiento térmico. Posteriormente, se tomaron muestras (500 µl de hemolinfa) a las 24 y 48 horas posteriores a la inoculación (hpi), las cuales fueron procesadas para determinar el efecto del tratamiento térmico sobre algunas de las actividades del sistema inmunitario del camarón y la expresión genética de *Pro-PO* y *Hsp* en camarones no inoculados e inoculados con WSSV.

C) *Proteínas totales*

La concentración de proteínas totales se midió usando la técnica de biuret (Randox, TP3869), adaptado al formato de microplaca de acuerdo con Hernández-López [22]. La concentración de proteína se estimó utilizando albúmina de suero de bovino (BSA) para la curva estándar.

D) *Determinación de la actividad de fenoloxidasas*

Se estimó la actividad de fenoloxidasas (PO) usando un sustrato L-DOPA. Se colocó en una microplaca 10 µl de hemolinfa y 250 µl de L-DOPA (3 mg/ml) disuelto en agua destilada inyectable comercial. Se incubó 20 minutos a 37 °C y se leyó a 490 nm. La actividad total del PO se midió por la pre-incubación de la hemolinfa (10 µl) con 10 ml de tripsina (1mg/ml), de acuerdo con el protocolo propuesto por Hernández-López [22].

E) *Actividad de lisozima*

La actividad de la lisozima se obtuvo mediante la reducción de la turbidez de *Micrococcus luteus* (Sigma-Aldrich, M3770) en solución amortiguadora de fosfato, de acuerdo con Hernández-López [22]. En una microplaca se colocaron 50 µl de muestra y 200 µl de una suspensión de *Micrococcus* en PBS, se incubó a 37 °C durante 1 hora y se midió la disminución en la absorbancia a 405 nm. El resultado se obtiene utilizando una curva estándar con lisozima comercial (Sigma-Aldrich, L7651).

F) *Actividad antibacteriana*

Esta actividad se midió al verter en una microplaca 200 µl de hemolinfa y 10 µl de una suspensión de *Vibrio* en fase de crecimiento logarítmico. La placa se incubó durante 8 horas a 30 °C y se mide a

una absorbancia de 415 nm. Se utilizó el antibiótico florfenicol (Sigma-Aldrich, 32492) para generar una curva estándar [22].

G) Actividad de proteínas tipo tripsina

Esta técnica se basa en la hidrólisis de BAPNA (Na-benzoil-DL-arginina-4-nitroanilida, hidrocloreto, Sigma-Aldrich, B4875) en microplaca con 50 μ l de hemolinfa y 200 μ l de BAPNA (1 mg/ml). Se incubó por 1 hora a temperatura ambiente y se leyó a una absorbancia de 415 nm. Se utilizó Tripsina (Sigma-Aldrich, T0303) para generar una curva estándar [22].

F) Actividad de α 2 macroglobulina

Se colocaron 50 μ l de hemolinfa en una microplaca con 10 μ l de tripsina (1 mg/ml) y se incubó durante 10 min a temperatura ambiente. Después de eso, se añadieron 10 μ l de inhibidor de tripsina de soya (Sigma-Aldrich, T7659 (ITS) 2 mg/ml) y se incubó por 10 min a temperatura ambiente. Por último, se añadieron 200 μ l de sustrato BAPNA (1 mg/ml) y se incubó durante 30 min y se leyó a una absorbancia de 415 nm. Se utilizó tripsina comercial para generar una curva estándar [22].

G) Actividad de súper óxido dismutasa

Para la detección de SOD se utilizó un kit comercial (RANDOX, SD125) y se realizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante pero adaptado para microplaca [22].

H) Expresión de Pro-PO, Hsp10, Hsp70 y Hsp90

Los niveles de expresión de *Pro-PO*, *Hsp10*, *Hsp60* y *Hsp90* se midieron usando PCR cuantitativa (qPCR) y el método de cuantificación relativa con el Factor de Elongación Alfa ($EF1\alpha$) como un gen constitutivo, utilizado en previos reportes [23]. En base a la secuencia identificada, con el programa Primer3 se diseñaron iniciadores específicos (Tabla 1) para amplificar cada gen.

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

Gen	Oligo	Secuencia
<i>Pro-PO</i>	Pro-POF	5'-ACGCTTGCCCTGGCATCA-3'
	Pro-POR	5'-CGCGCACAGTCATTTGTTGT-3'
<i>Hsp10</i>	HSP10F	5'-TGTGTTTCAGGTGATGTTGAAGTG-3'
	HSP60R	5'-CAAGGCACTAAAACTCTACTACTG-3'
<i>Hsp60</i>	HSP60F	5'-CGGGATAGAGCAAGTCACAA-3'
	HSP60R	5'-TCCACCAACCACCACCTTG-3'
<i>Hsp90</i>	HSP90F	5'-CCACCAATTACGAAGACAGG-3'
	HSP90R	5'-CTCACCTCAAAAACGGCAGA-3'
<i>EF1α</i>	EF1 α F	5'-TCGCCGAAGTGCAGACCATGA-3'
	EF1 α R	5'-GCTGCCTCCTCCAGTTTACC-3'

La amplificación se realizó con una temperatura de alineación a 60 °C, en un termociclador tiempo real LightCycler 480 de Roche, donde se obtuvieron los valores de CP [24] a partir de cada muestra analizada usando la fórmula $\Delta\Delta C_t$, de acuerdo con Livak y Schmittgen [25].

I) *Análisis estadístico.*

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

III. RESULTADOS

Una vez realizados los análisis correspondientes para evaluar el efecto de las temperaturas del agua sobre cada una de las actividades inmunes a medir en el camarón se encontró que en la concentración de proteínas totales, los valores promedio oscilaron desde 45.72 hasta 87.01 mg/ml, siendo los organismos control los que se ubicaban en los extremos de este rango, y los valores obtenidos por los organismos inoculados se ubicaron en los valores medios del mismo. Las temperaturas utilizadas no tuvieron ningún efecto significativo ($P > 0.05$) sobre la concentración de proteína en el plasma durante todo el experimento y tampoco hubo ninguna diferencia al comparar esos valores entre camarones infectados y control para una misma condición de tiempo y temperatura (Fig. 1A y 1B).

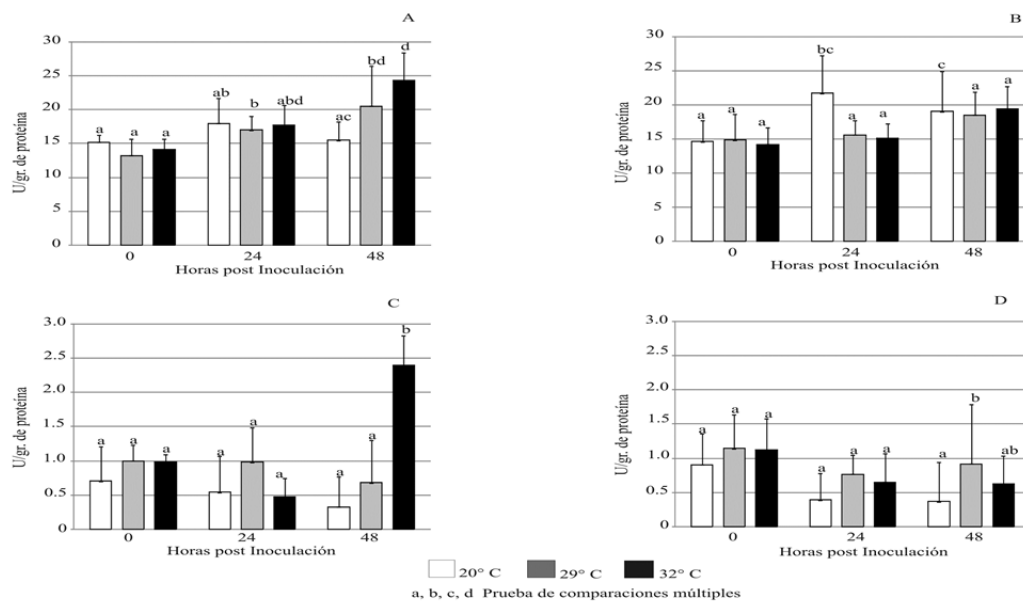


Fig. 1. Niveles de proteína plasmática de (A) camarones control e (B) infectados con WSSV. Actividad de la SOD en (C) organismos control y (D) organismos infectados.

La actividad enzimática de súperóxido dismutasa fue baja hasta las 24 hpi tanto en los organismos control como en los infectados. El incremento observado a las 48 hrs en todas las temperaturas fue más marcado en los organismos infectados (Fig. 1C y 1D). Sólo a 29 °C la actividad enzimática en los organismos control fue mayor que en los organismos infectados (Tabla 2).

Aunque se presentaron pequeños incrementos en la actividad de la fenoloxidasa entre los tratamientos, la concentración de la misma en la hemolinfa de los camarones control mostró diferencia significativa sólo en el aumento exhibido en 48 hpi para el tratamiento de 32 °C ($P < 0.05$) (Figura 2A).

Por otro lado, los organismos infectados experimentalmente mostraron un incremento significativo en la actividad de la enzima ($P < 0.05$) a las 24 hpi a 20 °C (Figura 2B).

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

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

En el caso de la expresión de *Pro-PO*, los organismos control mantenidos a 20 °C presentaron en promedio un incremento cinco veces mayor en la expresión a las 24 hpi, y un incremento ocho veces mayor a las 48 hpi, al ser comparados con el gen constitutivo EF1 α (Figura 2C). No se encontraron diferencias significativas a los 29 o 32 °C. Los camarones infectados experimentalmente con WSSV mostraron un aumento de cinco veces en la expresión génica a las 24 hpi a 20 °C, pero los valores disminuyeron a su expresión normal en 48 hpi (Figura 2D).

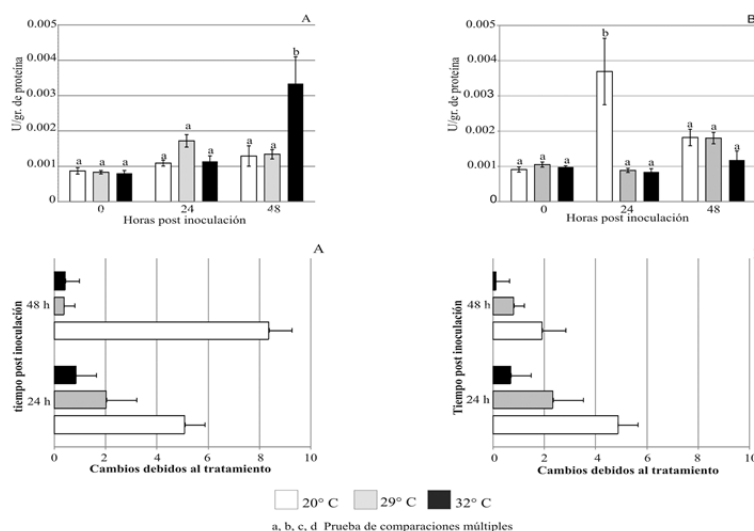


Fig. 2. Promedio de los niveles de actividad de fenol oxidasa en A) organismos control e B) infectados. Niveles de expresión de *Pro-FO* en C) camarones control e D) inoculados.

En el caso de α -2 macroglobulina, cuando se comparan los niveles de actividad en una condición de temperatura específica, no se encontraron diferencias significativas entre el control y los organismos inoculados. Las pruebas múltiples mostraron que se encontraron algunas pequeñas diferencias entre los diferentes ensayos en organismos control (Fig. 3A), así como entre los diferentes ensayos de los organismos infectados (Fig. 3B).

Para la lisozima, la única diferencia entre los niveles de actividad en camarones control y camarones infectados se presentó a las 48 hpi a 32 °C, con valores más altos en los camarones del grupo control (Tabla 2); también se observaron diferencias a las 48 hpi tanto en los organismos control para la temperatura más alta, como en los infectados en las dos temperaturas más altas (Fig. 3C y 3D).

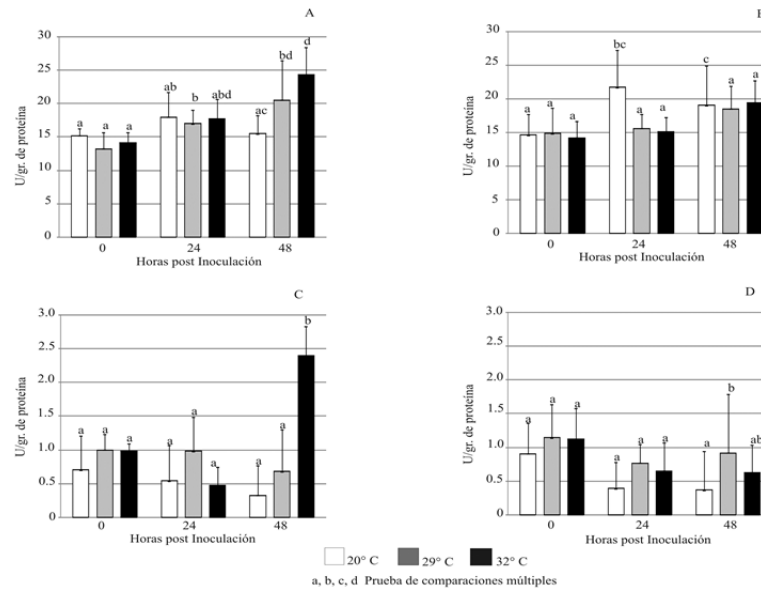


Fig. 3. Actividad de α 2-macroglobulina para (A) organismos control e (B) infectados. Actividad de Lisozima en (C) organismos control e (D) infectados.

En cuanto a la respuesta antimicrobiana, no se detectaron diferencias entre los grupos control e infectados en ninguna comparación hpi-temperatura (fig. 4A y 4B). En la actividad de las proteínas tipo tripsina, se obtuvieron altos valores a las 48 hpi a 20 °C en camarones infectados en comparación con los camarones del grupo control (Tabla 2). En el grupo de los infectados se obtuvieron altos valores a 48 hpi, pero se observó la misma tendencia en el ensayo control (Fig. 4C y 4D).

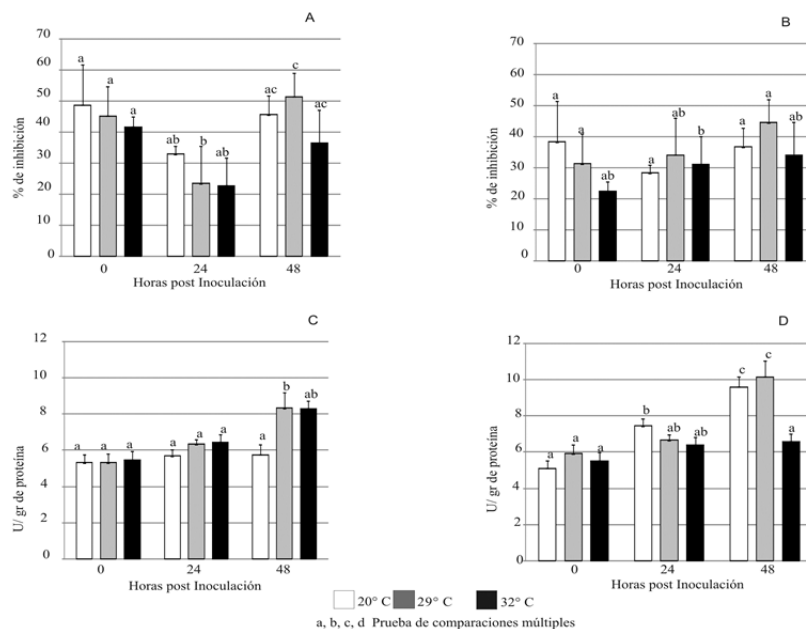


Fig. 4. Actividad de proteínas antimicrobianas en (A) organismos control e (B) infectados. Actividad de proteínas tipo tripsina en (C) organismos control e (D) infectados.

En lo referente a la expresión de los genes *Hsp10*, *Hsp60* y *Hsp90* en camarones control, se observó una sobre-expresión a las 48 hpi en los organismos mantenidos a 32 °C para *Hsp90* y en los mantenidos a 20 °C para el gen *Hsp60*. En los camarones infectados experimentalmente con WSSV mantenidos a una temperatura de 32 °C, se encontró una diferencia significativa sólo en la expresión de *Hsp90* a las 48 hpi, mostrando una sobre-expresión de casi 100 veces mayor que los valores del gen constitutivo (Tabla 3).

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

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

IV. DISCUSIÓN

Es sabido que los estresantes ambientales afectan el sistema inmune del camarón de manera dependiente a la dosis. De esta forma, los animales requieren tiempo para adaptarse a las condiciones ambientales, tiempo durante el cual la susceptibilidad del animal a las enfermedades es a menudo agudo [26]. Uno de estos estresantes es la temperatura, habiendo reportes de que temperaturas altas (32 °C) favorecen al camarón en el ataque de la enfermedad [27, 28, 29] y a temperaturas bajas (18 °C) los organismos no presentan signos y la mortalidad ocurre después de 36 h [30]. En el presente estudio evaluamos tres distintas temperaturas esperando que las reacciones de los camarones mantenidos a 29 °C presentaran una respuesta menor que a 20 y 32 °C, tratando con esto de conocer el efecto de la temperatura sobre la respuesta inmune en organismos infectados con el virus de la mancha blanca.

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

Al analizar uno a uno los parámetros de la actividad de la respuesta inmune de *L. vannamei*, los resultados obtenidos muestran diferentes efectos sobre este sistema. Jiravanichpaisal [30] reportó que la temperatura juega un papel importante como un detonante en el proceso de infección del virus de la mancha blanca, el cual aparentemente no se replica a bajas temperaturas. Sin embargo, cuando los organismos eran cambiados de una temperatura baja (4 ± 2 °C) a una más alta (22 ± 2 °C), estos murieron rápidamente debido al aumento de la replicación del virus. El mismo autor describe que en los cangrejos de río, *Pacifastacus leniusculus*, infectado con WSSV, los hemocitos no degranularon y la reacción de melanización era inhibida. También menciona que la actividad de fenoloxidasas en el

sobrenadante del lisado de hemocitos infectados y no infectados del cangrejo de río semantuvo similar, así como la expresión de *Pro-PO* detectado por RT-PCR. Sin embargo, Roux, Pain, Klimpel y Dhar [31] encontraron que hay una reducción en la actividad de la enzima PO en los animales infectados con este virus.

En el presente trabajo, los resultados mostraron un aumento de PO en los camarones control mantenidos a 32 °C a las 48 hpi. Por otra parte, no se encontró una diferencia significativa en la actividad de la enzima en los camarones infectados con WSSV a 29 o 32°C pero los valores de PO aumentaron a 20 °C a las 24 hpi, lo que sugiere que el sistema de PO fue activado por infección por el virus como parte de los mecanismos de respuesta del camarón.

Por otra parte, se encontró sobre-expresado el gen *Pro-PO* en los camarones control mantenidos a 20 °C. De acuerdo con estos resultados, podemos sugerir que la baja temperatura tiene una influencia en la expresión de esta enzima, aunque se esperaba una mayor expresión en los camarones infectados. Varios autores han informado de un aumento en las posibilidades de supervivencia de los camarones con WSSV cuando son sometidos a una hipertermia de alrededor de 32 °C [17, 27, 28, 30]. Los resultados de este estudio muestran una tendencia similar y están de acuerdo con los reportados por Moser, Galván, Mendoza, Encinas, Coronado *et al.* [29], que llegaron a la conclusión de que los organismos están infectados, pero la infección no se manifiesta debido a que las bajas temperaturas no permiten la replicación del virus. Apoyándonos en lo anterior, podemos sugerir que se necesita más investigación para comprender mejor la actividad y la expresión de *Pro-PO* y su papel en el sistema inmune de camarones en tratamientos térmicos de baja temperatura. Una investigación más profunda podría conducir a formas de controlar los efectos del WSSV en estos organismos.

Se han realizado estudios para evaluar el efecto de la hipertermia sobre los niveles de supervivencia en organismos infectados con WSSV, para los que se han utilizado temperaturas que van desde 32 °C a 45 °C. Esto cambia drásticamente la historia natural de la enfermedad ya que afecta la infectividad del virus y reduce su prevalencia [17, 18, 27]. Por otro lado, hay evidencia de que las temperaturas de entre 22 y 30 °C permiten altos niveles de replicación de WSSV en camarones infectados a esas temperaturas [31]. Guang, Yu y Li [32] encontraron que *Marsupenaeus japonicus* mantenido a 15 °C presentó infecciones más leves pero con un conteo total de hemocitos superior (THC), y Moser, Galván, Mendoza, Encinas, Coronado *et al.* [29], demostraron que el mantenimiento de los organismos a 18 °C y posterior trasladado a 29 °C hace que se manifieste una signología, concluyendo que la enfermedad está presente en la baja temperatura, pero que esta no permite la replicación del virus.

La respuesta inmune de los invertebrados está dada por los hemocitos, lo que los hace muy importantes en la evaluación de la respuesta a la presencia de agentes patógenos, tanto virus como bacterias. Fagutao [5] menciona que los genes de respuesta inmune probablemente se activan inmediatamente después de una estimulación inmune de un día, lo que puede resultar en la liberación de enzimas, similar a la encontrada en la expresión génica. Hemos encontrado que en tres de las enzimas analizadas (SOD, α -2 macroglobulina y proteínas tipo tripsina), se presentó un aumento de la producción en los organismos mantenidos a 20 °C y 29 °C, lo que coincide con lo descrito por Guan, Yu y Li [32] relacionado con el aumento en el recuento total de hemocitos, que nos llevaría a pensar que con un aumento de hemocitos se incrementaría la cantidad de enzimas presentes en la hemolinfa.

Los altos valores de SOD en los camarones infectados después de 48 h contrastan con Chang, Su, Chen y Liao [33], que reportan que cuando los camarones eran infectados con WSSV se presentaba una reducción significativa en la actividad de SOD entre los días 1 y 4, presentando los organismos un consecuente choque del sistema inmune, lo que producía una alta mortalidad. En cuanto a los resultados de α -2-macroglobulina, se encontraron pocas variaciones entre los diferentes tratamientos de los organismos inoculados. En el ensayo de temperatura más baja, podemos ver un aumento significativo de la actividad a las 24 hpi en los organismos infectados y que perdura en el muestreo de

las 48 hpi. Esto contrasta con los hallazgos de Ma, Wang, Zhang, Li y Xiang [8] quienes mencionan una disminución de expresión de $\alpha 2$ -macroglobulina a las 37 hpi en hemocitos de organismos inoculados con WSSV. Este contraste de resultados se podría atribuir a que ellos midieron expresión de tres genes de $\alpha 2$ -macroglobulinas por separado, y posiblemente lo que nosotros analizamos es la liberación de enzimas producto de la suma de esas expresiones.

En cuanto a los resultados de la lisozima, Jeswin, Anju, Thomas, Paulton y Vijayan [34] reportaron que el gen de la lisozima se expresa doce horas después de la infección por WSSV en *Penaeus monodon*, con una disminución a las 48 hpi para alcanzar niveles similares a los encontrados a las 12 h pero mayores que las de los camarones control. En los resultados obtenidos en este trabajo con *L. vannamei*, no se encontraron cambios entre los tratamientos entre los valores en las mediciones a distintos tiempos y temperaturas con una excepción a las 48 hpi en el grupo de los infectados (29 °C) y control (32°C). Mai y Wang [35] en un estudio con *Litopenaeus stylirostris*, encontraron que los genes de lisozima se sobre expresan a partir de 4 hpi, alcanzando su máxima expresión a 8 hpi antes de disminuir. Si la expresión de lisozima inicia en etapas muy tempranas de la infección, entonces los niveles pueden ser reducidos ya desde las 24 hpi, lo que nos lleva a esperar a no encontrar diferencias más allá de ese tiempo. Las diferencias que encontramos en los organismos control a las 48 hpi para el tratamiento a 32 °C puede ser resultado de una posible infección bacteriana secundaria debido a la inmunodepresión provocada por el estrés causado a los organismos por la temperatura, y no relacionado con la infección viral como tal.

Las proteínas antimicrobianas mostraron una disminución a las 24 hpi con posterior recuperación en los camarones control a 29 °C ($p > 0,05$), sin ningún cambio en los animales infectados, independientemente de la temperatura del tratamiento analizado. En un ensayo desarrollado por Huang, Liu, Xiang y Wang [36] podemos observar una respuesta contraria, ya que ellos encontraron ese comportamiento en los organismos infectados con *V. harveyi*, presentando una disminución en la actividad de estas proteínas a las 3 hpi con recuperación a las 24 hpi, siendo los organismos control los que no presentaron ningún cambio. La expresión de las proteínas antimicrobianas no ha sido bien explicada en infecciones de tipo viral. En *P. monodon* las proteínas antimicrobianas se expresan desde pocas horas después de la infección con WSSV pero hay una disminución para las 48 hpi [34, 37]. Esos resultados contrastan con los del presente estudio ya que no observamos un patrón que indicara que la infección viral influenciara la expresión de las proteínas antimicrobianas.

Las proteínas tipo tripsina presentaron un incremento a las 48 hpi para los animales control e infectados, el aumento en los infectados se presentó en niveles más altos que en el control. Resultados similares se reportan por Shi, Li, Wang, Zhao y Wang [38], que mencionan un aumento de este tipo de proteínas en el hepatopáncreas del langostino *Procambarus clarkii* infectado con WSSV, pero no reportan su relación con la reacción frente a diferentes patógenos.

Jeswin, Anju, Thomas, Paulton y Vijayan [34] observaron que los animales que sobrevivieron más de 3.5 días a una infección con WSSV mostraron niveles más altos en la expresión de lisozima y algunas otras proteínas antimicrobianas del sistema inmune, que los animales que murieron antes de los 2.5 días. Por lo tanto, es claro que un diseño experimental que involucre una mayor frecuencia en los muestreos y un mayor tiempo de duración puede explicar de una mejor manera la relación existente entre la expresión o respuesta inmunológica y una infección viral.

En cuanto a la expresión de los genes *Hsp*, se han realizado estudios que muestran que la proteína HSP90 está directamente implicada en la resistencia de los organismos, ya que puede proteger a las células contra la apoptosis inducida por choque térmico [39, 40, 42]. En este trabajo, encontramos que *Hsp90* fue sobre-expresado en casi 100 veces. Por ejemplo, en los tejidos de *Penaeus monodon* la expresión de este gen se incrementó significativamente después de 30 minutos de tratamiento a 37 °C [42]. Li, Luan, Zhang, Zhang, Wang *et al.* [43] encontraron que los niveles de expresión de *Hsp90* en

camarones juveniles durante la primera hora en el choque térmico (35 °C) fueron significativamente mayores (8.3 veces) cuando se compara con los valores previos al tratamiento, y se mantuvo alta, alcanzando 12.3 veces a 6 hpi. En este estudio, la más alta expresión de este gen está presente en el camarón mantenido a altas temperaturas (32 °C), incluso en el grupo que no estaba infectado, lo que sugiere que el aumento de la expresión fue causada por la temperatura.

Los genes *Hsp* juegan un papel importante en el marco de la respuesta inmune del huésped [44]. Danwattananusorn, Fagutao, Shitara, Kondo, Aoki *et al.* [12] reportaron que en *M. japonicus*, después de la inyección de WSSV, sólo se aumenta la expresión de *Hsp90*. Nuestros resultados mostraron que los aumentos de expresión de *Hsp90* ocurrieron en los animales inoculados que se mantuvieron a 32 °C. Estos resultados se oponen a las conclusiones de Zhang, Jiang, Zhang, Ma, Ma *et al.* [45], quienes reportaron que los niveles de expresión de SP- *Hsp90* alcanzaron el nivel más alto en 6 hpi y luego disminuyó a las 12 hpi, por lo tanto, la proteína parece funcionar como una chaperona esencial que interviene en la respuesta inmune para hidrolizar ATP y proteger el cuerpo contra el daño bacteriano. Tal vez, estas diferencias podrían ser debido al hecho de que en este estudio hay virus implicados. En cuanto a *Hsp60*, los resultados fueron casi nulos, ya que no se presentó expresión en 29 °C o 32 °C; sólo hubo cambios a 20 °C en organismos control. Estos resultados llevan a la conclusión de que WSSV ocupa los recursos de acogida y no permite que estas proteínas se manifiesten, o que WSSV puede apagar la actividad chaperona de las HSP, o que mantienen una expresión muy reducida hasta que el organismo perece [46].

Kim, Kim y Kim [47] propusieron que las chaperonas HSP de bajo peso molecular (como la HSP10) contienen una estructura de ventana a la que la proteína desnaturalizada puede ser atraída debido al estrés, y esto puede prevenirla de la adición y desplegamiento. También se cree que durante una infección viral, WSSV puede ocupar recursos del hospedero inhibiendo la expresión de los genes *Hsp*. En nuestro caso no hubo expresión de *Hsp10* en hipertermia (32 °C), por lo que podemos concluir que esto puede ser debido a que los organismos están respondiendo al estrés por alta temperatura, pero la producción de HSP es inhibida por la presencia del virus WSSV, de acuerdo a las conclusiones de Huang, Kang, Chen, Hsu, Lo *et al.* [49].

Para las otras temperaturas utilizadas en este estudio que no están relacionados con la hipertermia, podríamos decir que las bajas expresiones encontradas en organismos control e infectados pueden ser debido al estrés causado por la presencia del virus o una bacteria cuyo desarrollo ha sido estimulado por el estrés causado por el manejo diario. En este punto, se puede concluir que especialmente el gen *Hsp90* es estimulado por las altas temperaturas, pero su acción puede ser inhibida por la presencia del virus WSSV. Además, es necesario realizar más estudios sobre los procesos de inhibición de las HSP de bajo peso molecular.

La mayoría de los resultados obtenidos en este estudio contrastan con lo reportado en la literatura. Esto se puede explicar con los efectos que las temperaturas tienen sobre la reacción de los organismos al estrés provocado por éstas, y estos efectos pueden ser iguales o mayores que los provocados por un proceso infectivo por WSSV. Como es sabido, la temperatura tiene un efecto importante sobre procesos biológicos, así como sobre las respuestas inmunes y sobre la función de las actividades enzimáticas en todos los organismos; por lo que, la diferencia entre la reacción de un organismo a una infección en una temperatura óptima de desarrollo y otra que no lo es, será de suma importancia para su resistencia ante una infección. Esto es de gran ayuda no en la erradicación de un agente patógeno en el estanque donde viven los camarones, sino en la sobrevivencia del animal ante ese agente patógeno.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al personal del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, especialmente a Trinidad Encinas, Fernando Mendoza, Diego Galván, Isela Vázquez y Daniel Coronado por su invaluable ayuda antes y durante el desarrollo de este trabajo.

REFERENCIAS

- [1] Reynaud, Y. (2008). Identification de marqueurs génétiques de la virulence chez *Vibrio nigripulchritudo*, un pathogène de crevettes pénéides en Nouvelle-Calédonie. Thèse de Doctorat de l'Université Paris 6 – Pierre et Marie Curie. Pp. 230.
- [2] Rodríguez-Valencia, J.A., Crespo, D. y López-Camacho, M. (2010). La camaricultura y la sustentabilidad del Golfo de California. p. 13. Available from: <http://www.wwf.org.mx>. Spanish.
- [3] Ramos-Paredes, J., Grijalva-Chon, J.M., De la Rosa-Vélez, J. y Enríquez-Paredes, L.M. (2010). “New genetic recombination in hypervariable regions of the white spot syndrome virus isolated from *Litopenaeus vannamei* (Boone) in northwest Mexico. *Aquaculture Research*, 43, 339–348.
- [4] Sánchez-Martínez, J.G., Aguirre-Guzmán, G. y Mejía-Ruiz, H. (2007). White Spot Syndrome Virus in cultured shrimp: A review. *Aquaculture Research*, 38, 1339-1354.
- [5] Fagutao, F.F., Yasuike, M., Caipang, M.C., Kondo, H., Hirono, I., Takahashi, Y. y Aoki, T. (2008). Gene expression profile of hemocytes of Kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicas* following peptidoglycan stimulation. *Marine Biotechnology*, 10, 731-40.
- [6] Iwanaga, S. y Lee, L.B. (2005). Recent advances in the innate immunity of invertebrate animals. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 38, 128-150.
- [7] Ji, P.F., Yao, C.L. y Wang, A.Y. (2009). Immune response and gene expression in shrimp (*Litopenaeus vannamei*) hemocytes and hepatopancreas against some pathogen-associated molecular patterns. *Fish and Shellfish Immunology*, 27, 563–570.
- [8] Ma, H., Wang, B., Zhang, J., Li, F. y Xiang, J. (2010) Multiple forms of alpha-2 macroglobulin in shrimp *Fenneropenaeus chinensis* and their transcriptional response to WSSV or *Vibrio* pathogen infection. *Developmental and Comparative Immunology*, 34, 677–684.
- [9] Gómez-Anduro, G.A., Barillas-Mury, C.A., Peregrino-Uriarte, A.B., Gupta, L., Gollas-Galván, T. y Hernández-López, J. (2006). The cytosolic manganese superoxide dismutase from the shrimp *Litopenaeus vannamei*: Molecular cloning and expression. *Developmental and Comparative Immunology*, 30, 893-900.
- [10] Srivastava, P. (2002). Roles of heat-shock proteins in innate and adaptive immunity. *Nature Reviews Immunology*, 2, 185-194.
- [11] Xu, Q., Qin, Y. (2012). Molecular cloning of heat shock protein 60 (PtHSP60) from *Portunus tuberculatus* and its expression response to salinity stress. *Cell Stress Chaperones*, 17, 589-601.
- [12] Danwattanasorn, T., Fagutao, F.F., Shitara, A., Kondo, H., Aoki, T., Nozaki, R. y Hirono, I. (2011). Molecular characterization and expression analysis of heat shock proteins 40, 70 and 90 from kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus*. *Fisheries Science*, 77, 929–937.
- [13] Dong, B. y Xiang, J.H. (2007). Discovery of genes involved in defense/immunity functions in a haemocytes cDNA library from *Fenneropenaeus chinensis* by ESTs annotation. *Aquaculture*, 272, 208–215.
- [14] Roberts, R.J., Agius, C., Saliba, C., Bossier, P. y Sung, Y.Y. (2010). Heat shock proteins (chaperones) in fish and shellfish and their potential role in relation to fish health: a review. *Journal of Fish Diseases*, 33, 789-801.
- [15] Storey, K.B. y Storey, J.M. (2011). Heat shock proteins and hypometabolism: adaptive strategy for proteome preservation. *Research and Reports in Biology*, 2, 57– 68.
- [16] Wyban, J., Walsh, W.A. y Godin, D.M. (1995). Temperature effects on growth, feeding rate and feed conversion of the Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*). *Aquaculture*, 138, 267-279.
- [17] Rahman, M.M., Escobedo-Bonilla, C.M., Corteel, M., Dantas-Lima, J.J., Wille, M., Alday-Sanz, V., Pensart, M.B., Sorgeloos, P. y Nauwynck, H.J. (2006). Effect of high water temperature (33 °C) on the clinical and virological outcome of experimental infections with white spot syndrome virus (WSSV) in specific pathogen-free (SPF) *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 261, 842–849.

- [18] Vidal, O.M., Granja, C.B., Aranguren, F., Brock, J.A. y Salazar, M. (2001). A profound effect of hyperthermia on survival of *Litopenaeus vannamei* juveniles infected with White Spot Syndrome Virus. *Journal of the World Aquaculture Society*, 32, 364–372.
- [19] Rahman, M.M., Corteel, M., Wille, M., Alday-Sanz, V., Pensaert, M.B., Sorgeloos, P. y Nauwynck, H.J. (2007). The effect of raising water temperature to 33 °C in *Penaeus vannamei* juveniles at different stages of infection with white spot syndrome virus (WSSV). *Aquaculture*, 272, 240–245.
- [20] Escobedo-Bonilla, C.M., Audoorn, L., Wille, M., Alday-Sanz, V., Sorgeloos, P., Pensaert, P.M. y Nauwynck, H.J. (2006). Standardized white spot syndrome virus (WSSV) inoculation procedures for intramuscular or oral routes. *Disease of Aquatic Organisms*, 68, 181-188.
- [21] Vargas-Albores, F., Guzmán, M.A., y Ochoa, J.L. (1993). An anticoagulant solution for haemolymph collection and prophenol oxidase studies of penaeid shrimp (*Penaeus californiensis*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 106A, 299-303.
- [22] Hernández-López, J. (2001). Diseño de técnicas para la cuantificación de moléculas plasmáticas de camarón. Tesis para obtener el Título de Doctorado en Ciencias. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C. México. Pp. 105.
- [23] Pfaffl, M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29, e45.
- [24] Livak, K.J. y Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*, 25, 402–408.
- [25] Le Moullac, G. y Haffner, P. (2000) Environmental factors affecting immune responses in Crustacea. *Aquaculture*, 191, 121-131.
- [26] Granja, C.B., Aranguren, L.F., Vidal, O.M., Aragón, L. y Salazar, M. (2003). Does hyperthermia increase apoptosis in white spot syndrome virus (WSSV)-infected *Litopenaeus vannamei*?. *Diseases of Aquatic Organisms*, 54, 73–78.
- [27] Granja, C.B., Vidal, O.M., Parra, L.G. y Salazar, M. (2006). Hyperthermia reduces viral load of white spot syndrome virus in *Penaeus vannamei*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 68, 175–180.
- [28] Wongmaneeprateep, S., Baoprasertkul, P., Prompamorn, P., Thongkao, K., Limsuwan, C. y Chuchird, N. (2010). Effects of water temperature on the White Spot Syndrome Virus infection in postlarvae *Litopenaeus vannamei*. *Walailak Journal of Science and Technology*, 7, 127–134.
- [29] Moser, J.R., Galván-Álvarez, D.A., Mendoza, F., Encinas-García, T., Coronado-Molina, D.E., Portillo-Clark, G., Marques, M.R.F., Magallón-Barajas, F.J. y Hernández-López, J. (2012). Water temperature influences viral load and detection of White Spot Syndrome Virus (WSSV) in *Litopenaeus vannamei* and wild crustaceans. *Aquaculture*, 326-329, 9–14.
- [30] Jiravanichpaisal, P. (2005). White spot syndrome virus interaction with freshwater crayfish. *Acta Universitatis Uppsaliensis. Digital comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Science and Technology*. 47. 56 p.
- [31] Roux, M.M., Pain, A., Klimpel, K.R. y Dhar, A.K. (2002) The Lipopolysaccharide and β -1, 3-Glucan Binding Protein Gene is upregulated in White Spot Virus-infected shrimp (*Penaeus stylirostris*). *Journal of Virology*, 76, 7140-7149.
- [32] Guan, Y., Yu, Z. y Li, C. (2003). The Effects of temperature on White Spot Syndrome infection in *Marsupenaeus japonicus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 83, 257-260.
- [33] Chang, C.F., Su, M.S., Chen, H.Y. y Liao, I.C. (2003). Dietary beta-1,3-glucan effectively improves immunity and survival of *Penaeus monodon* challenged with white spot syndrome virus. *Fish and Shellfish Immunology*, 15, 297-310.
- [34] Jeswin, J., Anju, A., Thomas, P.C., Paulton, M.P. y Vijayan, K.K. (2013). Survivability of *Penaeus monodon* during white spot syndrome virus infection and its correlation with immune related genes. *Aquaculture*, 380–383, 84–90.
- [35] Mai, W.J. y Wang, W.N. (2010). Protection of blue shrimp (*Litopenaeus stylirostris*) against the White Spot Syndrome Virus (WSSV) when injected with shrimp lysozyme. *Fish and Shellfish Immunology*, 28, 727-733.
- [36] Huang, H.H., Liu, X.L., Xiang, J.H. y Wang, P. (2013). Immune response of *Litopenaeus vannamei* after infection with *Vibrio harveyi*. *Aquaculture*, 406-407, 115-120.

- [37] Woramongkolchai, N., Supungul, P. y Tassanakajon, A. (2011). The possible role of penaeidin5 from the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, in protection against viral infection. *Developmental and Comparative Immunology*, 35, 530-536.
- [38] Shi, X.Z., Li, X.C., Wang, S., Zhao, X.F. y Wang, J.X. (2010). Transcriptome analysis of hemocytes and hepatopancreas in red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*, challenged with white spot syndrome virus. *Invertebrate Survival Journal*, 7, 119-131.
- [39] Malago, J.J., Koninkx, J.F. y vanDijk, J.F. (2002). The heat shock response and cytoprotection of the intestinal epithelium. *Cell Stress Chaperones*, 7, 191-199.
- [40] Spees, J.L., Chang, S.A., Snyder, M.J. y Chang, E.S. (2002). Thermal acclimation and stress in the American lobster, *Homarus americanus*: equivalent temperature shifts elicit unique gene expression patterns for molecular chaperones and polyubiquitin. *Cell Stress Chaperones*, 7, 97-106.
- [41] Yavelsky, V., Vais, O., Piura, B., Wolfson, M., Rabinovich, A. y Fraifeld, V. (2004). The role of Hsp90 in cell response to hyperthermia. *Journal of Thermal Biology*, 29, 509-514.
- [42] Jiang, S., Qiu, L., Zhou, F., Huang, J., Guo, Y. y Yang, K. (2007). Molecular cloning and expression analysis of a heat shock protein (Hsp90) gene from black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Molecular Biology Reports*, 36, 127-134.
- [43] Li, F., Luan, W., Zhang, C., Zhang, J., Wang, B., Xie, Y., Li, S. y Xiang, J. (2009). Cloning of cytoplasmic heat shock protein 90 (FcHSP90) from *Fenneropenaeus chinensis* and its expression response to heat shock and hypoxia. *Cell Stress Chaperones*, 14, 161-172.
- [44] Rungrassamee, W., Leelatanawita, R., Jiravanichpaisal, P., Klinbunga, S. y Karoonuthaisiri, N. (2010). Expression and distribution of three heat shock protein genes under heat shock stress and under exposure to *Vibrio harveyi* in *Penaeus monodon*. *Developmental Comparative Immunology*, 34, 1082-1089.
- [45] Zhang, F., Jiang, K., Zhang, D., Ma, C., Ma, H. y Ma, L. (2012). Molecular cloning, characterization and expression analysis of heat shock protein 90 (HSP90) from the mud crab *Scylla paramamosain*. *African Journal of Biotechnology*, 11, 6296-6304.
- [46] Huang, W.J., Leu, J.H., Tsau, M.T., Chen, J.C. y Chen, L.L. (2011). Differential expression of LvHSP60 in shrimp in response to environmental stress. *Fish and Shellfish Immunology*, 30, 576-582.
- [47] Kim, K.K., Kim, R. y Kim, S.H. (1998). Crystal structure of a small heat-shock protein. *Nature*, 394, 595-599.
- [48] Huang, P.Y., Kang, S.T., Chen, W.Y., Hsu, T.C., Lo, C.F., Liu, K.F. y Chen, L.L. (2008). Identification of the small heat shock protein, HSP21, of shrimp *Penaeus monodon* and the gene expression of HSP21 is inactivated after white spot syndrome virus (WSSV) infection. *Fish and Shellfish Immunology*, 25, 250-257.