



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

**DINÁMICA DE INFECCIÓN DEL VIRUS DEL
SÍNDROME DE LA MANCHA BLANCA (WSSV),
EN HEMOCITOS DE CAMARÓN BLANCO
(*Litopenaeus vannamei*)**

T E S I S

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación en Acuicultura)

P r e s e n t a

Ariadne Hernández Pérez

Guaymas, Sonora. Noviembre de 2012.

ACTA DE LIBERACION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 9 horas del día 22 del Mes de Noviembre del 2012, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

“Dinámica de infección del Virus del Síndrome de la Mancha Blanca (WSSV), en hemocitos de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*)”

Presentada por la alumna:

Ariadne Hernández Pérez

Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACION DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACION EN ACUICULTURA.

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISION REVISORA


DR. JORGE HERNÁNDEZ LÓPEZ
DIRECTOR DE TESIS


DR. JORGE CHÁVEZ VILLABA
CO-TUTOR


DRA. TERESA GOLLAS GALVÁN
CO-TUTOR


DRA. ELISA SERVIERE ZARAGOZA,
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Comité Tutorial:

Director de Tesis: Dr. Jorge Hernández López CIBNOR, S.C.

Co-tutor: Dr. Jorge E. Chávez Villalba CIBNOR, S.C.

Co-tutor: Dra. Teresa Gollas Galván CIAD, A.C.

Comisión Revisora de Tesis:

Dr. Jorge Hernández López

Dr. Jorge E. Chávez Villalba

Dra. Teresa Gollas Galván

Miembros del Jurado de Exámen:

Dr. Jorge Hernández López

Dr. Jorge E. Chávez Villalba

Dra. Teresa Gollas Galván

Suplente: Dr. Alfredo Arreola Lizárraga CIBNOR, S.C.

RESUMEN

En la acuicultura, uno de los virus de camarón más agresivos y que se ha diseminado por todo el mundo es el Virus del Síndrome de la Mancha Blanca (WSSV, por sus siglas en inglés “White Spot Syndrome Virus”). El principal problema provocado por este virus es la alta mortalidad que el camarón blanco *Litopenaeus vannamei* Boone 1931, puede alcanzar (90-100% de la población en un periodo de 3 a 10 días después de la aparición de los signos clínicos de la infección). El WSSV puede infectar hemocitos, que son las células efectoras de la respuesta inmune en los crustáceos, y en base a sus características morfológicas se clasifican como hialinos, semi-granulares y granulares. Estudios en *Peneaeus merguiniensis* demostraron que WSSV infecta únicamente a hemocitos semi-granulares y granulares, siendo los semi-granulares más susceptibles. A pesar de lo anterior, poco se sabe sobre la dinámica de infección a nivel celular, lo que hace necesario el estudio del virus, en específico de su mecanismo de infección a las células hemocíticas. Se determinó el tiempo de infección del WSSV, en los hemocitos del camarón y se analizó el mecanismo de infección por medio de técnicas moleculares y citometría de flujo. Los resultados muestran que la infección *in vitro* de los hemocitos mantenidos en solución isotónica para camarón se infectaron en 0.5 h con el virus. Adicionalmente, en este estudio se logró infectar experimentalmente hemocitos de dos especies de crustáceos no reportadas aún como susceptibles a WSSV: el camarón café (*Farfantepenaeus californiensis*) y la langosta espinuda (*Panulirus interruptus*), detectándolos positivos al virus 1 hora post-inoculación. En la infección con el virus de organismos vivos realizada y la posterior separación de las poblaciones de hemocitos por gradiente discontinuo de Percoll™, se logró determinar que los granulares son más susceptibles a la infección. Utilizando la técnica de citometría de flujo se observó un aumento de complejidad en las células en animales infectados en comparación con las células de animales sanos.

Palabras clave: WSSV, citometría de flujo, tiempo de infección.

ABSTRACT

In aquaculture, one of the more lethal pathogenic viruses for shrimp that has spread through the world, is the White Spot Syndrome Virus (WSSV). The main consequence of this devastating virus is the high mortality rate caused over populations of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* (90-100% in 3 to 10 days after the onset of clinical signs of infection). The WSSV can infect shrimp hemocytes, which are effector cells of the immune response in crustaceans, and are classified according to its morphology as hyaline, semi-granular and granular. Studies in *Penaeus merguensis* have shown that WSSV is able to infect semi-granular and granular hemocytes, being the first more susceptible to infection. Notwithstanding the foregoing, little is known about the dynamics of infection at cellular level, which makes it necessary to study the virus, in specific to the mechanisms of infection of hemocytes. The objective of this study was to determine the time of the WSSV infection in shrimp hemocytes, and to analyze the mechanism of infection by molecular biology techniques and flow cytometry. The results showed that in the *in vitro* infection of haemocytes maintained in isotonic solution for shrimp, were infected by the virus in 0.5 h. Similarly, hemocytes from two crustacean species not reported as susceptible to WSSV: brown shrimp (*Farfantepenaeus californiensis*) and lobster (*Panulirus interruptus*), were detected as positive to the virus 1 h after the inoculation. In the infection with the virus of living organisms carried out and the subsequent separation by discontinuous gradient of Percoll™ of hemocytes populations, it was determined that the granular cells are most susceptible to infection. Using the technique of flow cytometry is managed to observe an increase in complexity in cells of infected animals as compared with non-infected animals.

Key Words: WSSV, flow cytometry, time of infection.

A mis padres Soco y Juan

A mis hermanos Amanda, Andrés y Juan Luis

A mi gatito Charlie

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT, por la beca otorgada para la realización de mis estudios de Maestría.

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, CIBNOR S.C., y a su Programa de Estudios de Posgrado por el apoyo brindado.

A mi Director de Tesis el Dr. Jorge Hernández López así como a los integrantes del Comité Tutorial Dr. Jorge E. Chávez Villaba y Dra. Teresa Gollas Galván por darme la oportunidad y confianza de llevar a cabo este trabajo.

Al equipo de trabajo del Laboratorio de Referencia, Análisis y Diagnóstico en Sanidad Acuícola (LARADSA) del CIBNOR, Unidad Sonora, Campus Hermosillo, en especial a los Técnicos: M. en C. Fernando Mendoza Cano y Biól. Daniel Coronado Molina por su apoyo durante la realización de los experimentos; así como al financiamiento de los proyectos: 994-1, 977-1, 900-136, 956-1 y 963-1.

A la Dra. Verónica Mata del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, CIAD. A.C. y a la Dra. Adriana Garibay del Departamento de Ciencias Químico-Biológicas de la Universidad de Sonora UNISON, por la facilitación de los equipos de citometría de flujo.

A las Acuícolas A.M.P. S.P.R. de R.L. y Cruz de Piedra, por la donación de los organismos para llevar a cabo los experimentos.

A mis Profesores Dr. Arturo Sánchez Paz y M. en C. Sara Burrola por el apoyo y consejos.

A todos mis amigos y compañeros de Posgrado Biól. Karina Rosales, M. en C. Esteban Pérez, M. en C. Michelle Ruiz, M. en C. Javier Tello, M. en C. Anna González, M. en C. Marta Puebla, M. en C. Sarahí Vega, Biól. Edgar Arzola, M. en C. Pedro Hinostro por acompañarme durante mi estancia en Guaymas y Hermosillo, especialmente al Dr. Carlos Rábago Quiroz, por la gran ayuda e infinita paciencia.

ÍNDICE

Página

Acta de Revisión de Tesis

Dedicatoria

Agradecimientos

ÍNDICE

RESUMEN-ABSTRACT

ÍNDICE DE FIGURAS

INTRODUCCIÓN

1

ANTECEDENTES

4

1. Características del virus

4

2. Transmisión y especies susceptibles

5

3. Signos clínicos

5

4. Lesiones macroscópicas

6

5. Lesiones microscópicas

6

6. Sistema inmunológico del camarón

6

7. Hemocitos

7

7.1 Hemocitos hialinos

8

7.2 Hemocitos semi-granulares

8

7.3 Hemocitos granulares

9

7.4 WSSV en hemocitos

9

8. Citometría de flujo

11

JUSTIFICACIÓN

12

OBJETIVOS	13
Objetivo general	13
Objetivos específicos	13
HIPÓTESIS	14
MATERIALES Y MÉTODOS	15
1. Manejo y aclimatación de los organismos vivos	15
2. Obtención del inóculo viral	15
3. Infección <i>in vitro</i> de hemocitos de camarón blanco con WSSV	17
4. Infección de poblaciones separadas de hemocitos de organismos vivos de camarón blanco	19
5. Análisis mediante la técnica de citometría de flujo	21
RESULTADOS	22
1. Obtención del inóculo viral	22
2. Infección <i>in vitro</i> de hemocitos de camarón blanco con WSSV	23
3. Infección de poblaciones separadas de hemocitos de organismos vivos de camarón blanco	34
4. Análisis mediante la técnica de citometría de flujo	40
DISCUSIÓN	42
CONCLUSIONES	47
RECOMENDACIONES	48
BIBLIOGRAFÍA	49
ANEXOS	60

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Purificación de partículas del Virus del Síndrome de la Mancha Blanca (WSSV) utilizando un microfiltro de 100 kDa.	16
2	Distribución de las muestras en infección <i>in vitro</i> de hemocitos.	18
3	Bandas superficial, media y profunda de hemolinfa separada con gradiente discontinuo de Percoll TM .	20
4	Curva de disociación de los productos formados durante la amplificación de los filtrados del inóculo viral.	22
5	Cuantificación del inóculo viral obtenido con 600 copias/ μ L.	23
6	Cuenta promedio de hemocitos totales en las diferentes horas post-infección.	24
7	Curva de disociación de los productos formados durante la amplificación de las muestras de ARN de los tiempos 0.5, 1, 2, 4 y 6 hpi.	25
8	(A) Curva de disociación de los productos formados durante la amplificación de las muestras del tiempo 0.5 hpi. (B) Cuantificación de la carga viral mediante la detección de fluorescencia de las muestras del tiempo 0.5 hpi.	26
9	(A) Curva de disociación de los productos formados durante la amplificación de las muestras del tiempo 1 hpi. (B) Cuantificación de la carga viral mediante la detección de fluorescencia de las muestras del tiempo 1 hpi.	27
10	(A) Curva de disociación de los productos formados durante la amplificación de las muestras del tiempo 2 hpi. (B) Cuantificación de la carga viral mediante la detección de fluorescencia de las muestras	28

	del tiempo 2 hpi.	
11	(A) Curva de disociación de los productos formados durante la amplificación de las muestras del tiempo 4 hpi. (B) Cuantificación de la carga viral mediante la detección de fluorescencia de las muestras del tiempo 4 hpi.	29
12	(A) Curva de disociación de los productos formados durante la amplificación de las muestras del tiempo 6 hpi. (B) Cuantificación de la carga viral mediante la detección de fluorescencia de las muestras del tiempo 6 hpi.	30
13	Promedio del número de copias virales/ μ L para los diferentes tiempos de infección.	31
14	Número de copias virales/ μ L en la infección <i>in vitro</i> de hemocitos de <i>F. californiensis</i> y <i>P. interruptus</i> .	32
15	(A) Curva de disociación de los productos formados durante la amplificación de las muestras de <i>F. californiensis</i> y <i>P. interruptus</i> . (B) Cuantificación de la carga viral mediante la detección de fluorescencia de las muestras de <i>F. californiensis</i> y <i>P. interruptus</i> .	33
16	Cuenta promedio de hemocitos separados por poblaciones de camarones infectados al tiempo 0 hpi.	34
17	Cuenta promedio de hemocitos separados por poblaciones de camarones infectados al tiempo 1 hpi.	35
18	Cuenta promedio de hemocitos separados por poblaciones de camarones infectados al tiempo 24 hpi.	35
19	Curva de disociación de los productos formados durante la amplificación de las muestras de ARN de hemocitos del tiempo 24 hpi.	36

20	Curva de disociación de los productos formados durante la amplificación de las muestras de hemocitos separados de los tiempos 0 (A) y 1 hpi (B).	37
21	(A) Curva de disociación de los productos formados durante la amplificación de las muestras de hemocitos semi-granulares (SG) de las 24 hpi. (B) Cuantificación de la carga viral mediante la detección de fluorescencia de las muestras de hemocitos semi-granulares de las 24 hpi.	38
22	(A) Curva de disociación de los productos formados durante la amplificación de las muestras de hemocitos granulares (G) de las 24 hpi. (B) Cuantificación de la carga viral mediante la detección de fluorescencia de las muestras de hemocitos granulares de las 24 hpi.	39
23	Promedio del número de copias virales/ μ L para las diferentes poblaciones de hemocitos del tiempo 24 hpi.	40
24	Citograma (A), muestra la distribución de hemocitos de un camarón negativo a WSSV; citograma (B), muestra la distribución de hemocitos de un camarón infectado con WSSV.	41
25	Citograma que muestra el control de viabilidad de hemocitos obtenidos con formaldehído al 4%.	41

INTRODUCCIÓN

Los virus marinos son las “entidades biológicas” más abundantes en el océano. Estudios recientes han demostrado que juegan un papel muy importante dentro de los ciclos biogeoquímicos de la tierra y además se consideran determinantes en la evolución de sus hospederos al ser reservorios de material genético (Suttle, 2007).

Un virus es un parásito intracelular obligado sub-microscópico que se replica aprovechándose de la maquinaria propia de su hospedero (Cann, 1997). En la última década se ha dado mucha importancia a su estudio, haciéndose cada vez más claro el patrón de transporte viral a las células para que se lleve a cabo esta replicación, ya que esta etapa es clave para que el ciclo de infección tenga o no éxito. Sin embargo, en algunos virus, aún se desconoce mucho de sus mecanismos de infección.

Las infecciones virales en el cultivo del camarón han ocasionado pérdidas económicas muy importantes (Lightner, 1996). Uno de los virus patógenos más letales para el camarón de cultivo y que se ha diseminado por todo el mundo con gran rapidez, es el Virus del Síndrome de la Mancha Blanca (WSSV, por sus siglas en inglés “White Spot Syndrome Virus”). Un ejemplo de esto son los brotes de infección en los ciclos 2009-2010 y 2010-2011 en el Estado de Sonora con consecuencias devastadoras por la importancia de esta actividad en la región, generándose pérdidas cercanas al 60 % de la producción en cada ciclo (COESAES, 2010).

Este virus fue detectado por primera vez en 1992 en Taiwán, y se extendió rápidamente por varios países Asiáticos. En América, el primer caso diagnosticado fue en el Sur de Texas en 1995; actualmente está presente en México, Nicaragua, Ecuador, Honduras, Costa Rica, Panamá, Perú, Colombia, Brasil y Argentina (Bonami *et al.*, 1992; Lightner *et al.*, 1998; Galaviz-Silvia *et al.*, 2004; Cavalli *et al.*, 2008; Martorelli *et al.*, 2010). El principal problema que provoca este virus es la alta mortalidad que ocurre en poblaciones del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, Boone 1931; algunos autores reportan que ésta puede alcanzar el 100% de 3 a 10 días después de la aparición de los signos clínicos de la infección (Lightner, 1996; Flegel, 1997; Escobedo-Bonilla *et al.*, 2008).

Se

sabe que el WSSV no sólo afecta al camarón, sino que ha sido aislado en cerca de 95 especies de artrópodos, actuando en algunos casos como vectores y en otros como hospederos (Wang *et al.*, 1998; Sánchez-Paz, 2010). La infección por WSSV se caracteriza por afectar el tejido conectivo, el tejido epitelial y el tejido hematopoyético, que están distribuidos ampliamente en el camarón, es por esto que los organismos mueren a consecuencia de una falla sistémica generalizada.

Si bien no se ha definido específicamente el órgano blanco del virus, se ha propuesto que el WSSV infecta a los hemocitos, las células efectoras de la respuesta inmune en los crustáceos (Wang *et al.*, 2002). Estas células participan activamente en la defensa del organismo en procesos como: reconocimiento de patógenos, fagocitosis, melanización, citotoxicidad y comunicación celular (Söderhall y Cerenius, 1992). Sin embargo, poco se sabe sobre las modificaciones que la enfermedad provoca en el sistema circulatorio y la dinámica de la infección a nivel celular, es por esto que el estudio del mecanismo de infección del WSSV a las células hemocíticas, es de suma importancia, y actualmente se cuenta con tecnología adecuada para hacerlo. Ejemplo de esto es la citometría de flujo, una técnica multiparamétrica muy sensible que aún no ha sido completamente aprovechada en el diagnóstico y estudio de enfermedades en la rama de la acuicultura. Esta técnica, permite analizar las características de las células y los cambios que sufren individualmente al pasar por un haz de luz y además correlaciona los cambios detectados con una sub-población celular en específico (Sun *et al.*, 2010). Asimismo, las técnicas de biología molecular permiten una alta especificidad y rapidez en el diagnóstico de las enfermedades virales, contribuyendo al estudio de los procesos infecciosos.

La inusitada rapidez de propagación del virus en México y en el resto del mundo, hace impostergable la investigación sobre todo en los eslabones de la cadena antes señalados, pues los estragos económicos causados recientemente en zonas productoras de camarón blanco como el Noroeste de nuestro país, es sólo un ejemplo de lo que puede suceder si el virus se expande en una escala superior.

Entendiendo como se lleva a cabo el proceso de infección de este virus a los hemocitos, podrían plantearse nuevas estrategias o tratamientos para prevenir o mitigar los

efectos de este patógeno. Considerando lo anterior, el presente estudio se desarrolló con el objetivo de contribuir a la comprensión de la dinámica de infección del Virus del Síndrome de la Mancha Blanca (WSSV), en hemocitos de camarón blanco *L. vannamei*.

ANTECEDENTES

1. Características del virus

El genoma del Virus del Síndrome de la Mancha Blanca está compuesto por una sola molécula circular de ácido desoxiribonucleico (ADN) de doble hebra. Además dado que el virus posee una envoltura se ubica taxonómicamente dentro de la familia, Nimaviridae (del Latín “nima” que significa flagelo, haciendo referencia a una de las características morfológicas más evidentes del virus: un filamento en una de sus extremidades sobre el cual aún se desconoce su función, y que no siempre se encuentra presente); además, pertenece al género Whispovirus. El virus, es de forma ovoide a cilíndrica con una membrana trilaminar (Marks *et al.*, 2004), su nucleocápside mide 180-420 x 54-85 nanómetros (nm) (Durand *et al.*, 1997), y a lo largo de la superficie se encuentran 15 hélices verticales, separadas 7 nm entre sí y cada una está compuesta por 13 a 15 capsómeros de 8 nm de diámetro (Huang *et al.*, 2001).

Hasta la fecha han sido publicadas tres secuencias genómicas completas aisladas de Tailandia, China y Taiwán, con un genoma entre las diferentes cepas de 292 967, 305 107, y 307 287 kilobases (kb), respectivamente (Van Hulten *et al.*, 2001a; Yang *et al.*, 2001, Sánchez-Paz, 2010).

En el genoma del virus se han identificado algunos genes estructurales y no estructurales. Los genes estructurales codifican las proteínas que forman el virión o cápside, mientras que los no estructurales codifican proteínas y enzimas involucradas en el metabolismo de nucleótidos y la replicación viral. Las proteínas estructurales (VP, "viral protein" por sus siglas en inglés), son cruciales en la adhesión celular, en la transducción de señales, y en la evasión rápida del hospedero cuando son desplegadas sus defensas antivirales (Li *et al.*, 2007). También son las primeras moléculas que interactúan con las células del hospedero (Tsai *et al.*, 2004), y pueden ser blancos importantes de su mecanismo de defensa celular. Las VP se designan por su masa molecular en kilo-Dalton (kDa): VP19, VP28, VP15, VP24 y VP26. Las dos primeras están asociadas con la envoltura viral y las tres últimas son proteínas de la nucleocápside (Van Hulten *et al.*, 2000;

Van Hulten *et al.*, 2001b; Van Hulten *et al.*, 2002). Hasta el momento, se han identificado 58 proteínas estructurales, que le dan sus características de patogenicidad (Li *et al.*, 2007).

Como generalmente ocurre en los virus, el WSSV se replica en el núcleo de las células infectadas. Durand *et al.* (1997) reportaron que forma membranas de *novo* en el nucleoplasma cuando la infección comienza, cuando el virión se une a la superficie de una célula blanco por medio de las VP's, como ya se mencionó anteriormente.

2. Transmisión y especies susceptibles

Su transmisión puede ser horizontal; esto es, por contacto directo entre animales enfermos, por ingestión de tejido infectado con el virus o de organismos conteniendo viriones infectivos (Yan *et al.*, 2004; Durand y Lighthner, 2002); además se puede contagiar verticalmente entre hembras y su progenie (Chang *et al.*, 1996). Es importante mencionar que algunos autores han demostrado que la forma más efectiva de que el virus infecte al organismo es por ingestión de los viriones (Lots y Soto, 2002).

Como se mencionó anteriormente, se han reportado 95 especies de artrópodos susceptibles o portadores del virus, que han sido encontrados en cultivos comerciales y en el medio silvestre, o que han sido infectados experimentalmente, entre las que se encuentran algunas especies de gran importancia dentro de los cultivos por su estrecha relación con el camarón tanto por formar parte de su dieta como por que cohabitan en el medio, por ejemplo, algunos copépodos (Terán-Díaz, 2012), rotíferos (Yan *et al.*, 2004), poliquetos (Vijayan *et al.*, 2005), aves (Vanpatten *et al.*, 2004) y crustáceos (Flegel, 1997; Wang *et al.*, 1999b; Sánchez-Paz, 2010) que forman parte del plancton o de importancia comercial.

3. Signos clínicos

Los signos clínicos que generalmente se observan en los organismos infectados con el virus durante la fase aguda de la enfermedad incluyen falta de apetito, letargia, nado errático cercano de la superficie y eventualmente los camarones se van al fondo y mueren (Flegel, 1997). Generalmente las primeras mortalidades, suceden 1 a 3 días posteriores a la aparición de signos clínicos (Lighthner, 1996).

4. Lesiones macroscópicas

Los organismos infectados con WSSV presentan fácil desprendimiento del exoesqueleto, y en la fase crónica expansión de cromatóforos en la epidermis lo que provoca un cambio de coloración de translúcido a rosado o café y manchas blancas en el cefalotórax (de ahí el nombre de la enfermedad) de entre 0.2 a 0.5 milímetros (mm) de diámetro siendo más notorias en la parte interna del epitelio cuticular de *Penaeus monodon* y *Penaeus stylirostris*. En *L. vannamei* estas manchas suelen no presentarse (Wang *et al.*, 2002), pero es importante señalar que otros patógenos, en específico bacterias, o condiciones ambientales adversas para los organismos (alta alcalinidad en el agua y estrés) pueden provocar la aparición de manchas blancas similares, por lo que este signo no se considera patognomónico de la enfermedad, haciendo que el diagnóstico diferencial requiera técnicas más específicas.

5. Lesiones microscópicas

A nivel histopatológico, en los camarones infectados con WSSV, se observan células degeneradas, con cuerpos de inclusión intranuclear eosinófilos a basófilos en núcleos hipertrofiados de células ectodermales y mesodermales de los apéndices, branquias, estómago, intestino anterior y posterior, tejido conectivo, glándula antenal, órgano linfoide, tejido hematopoyético, hemolinfa y corazón (Wongteerasupaya *et al.*, 1995; Ligthner *et al.*, 1998; Sahul-Hameed *et al.*, 2000; Syed-Musthaq *et al.*, 2006), lo que provoca un aumento en la complejidad de las células. También se ha reportado necrosis general en el órgano linfoide caracterizada por la presencia de células con picnosis y cariorrexis nuclear (Pantoja y Ligthner, 2003; Rodríguez *et al.*, 2005).

6. Sistema inmune del camarón

El sistema inmune del camarón está constituido por varios elementos que lo hacen exitoso (Gollas-Galván *et al.*, 1997; Gollas-Galván *et al.* 1999; Hernández-López *et al.*, 2000; Gollas-Galván *et al.*, 2003). Entre ellos encontramos barreras físicas como el exoesqueleto; en la hemolinfa mecanismos moleculares de defensa como el sistema profenol-oxidasa (Johansson y Söderhäll, 1989; Gollas-Galván *et al.*, 1999), peneidinas (Muñoz *et al.*, 2002),

inhibidores de proteasas, proteínas de reconocimiento de lipoproteínas y β -glucanos, α -2-macroglobulina (Rodríguez *et al.*, 2003; Gollas-Galván *et al.*, 2003), aglutininas y los hemocitos. Debido a la falta de especificidad y, sobre todo, a la ausencia de una memoria inmunológica, esta respuesta es considerada como inmunidad innata e involucra componentes celulares y plasmáticos que juegan papeles esenciales en el establecimiento de una respuesta inmune (Hernández-López, 2001).

El órgano linfoide también participa en esta respuesta; en él se forman estructuras esféricas multicelulares llamadas esferoides (Bonami *et al.*, 1992; Anggraeni y Owens, 2000), que se han asociado a la respuesta a infecciones virales, incluido el WSSV (Vidal *et al.*, 2001).

7. Hemocitos

Los hemocitos son las células plasmáticas de los crustáceos, son análogas a los glóbulos blancos de los vertebrados (Roch, 1999). Se producen en el tejido hematopoyético que se encuentra en la parte dorsal y dorso-lateral de las paredes del estómago rodeado por tejido conectivo y se observa como una cadena de ganglios, dentro de los cuales se ha reportado la presencia de lo que se cree son las células precursoras de hemocitos.

Existen cinco diferentes estadios celulares previos a la liberación de los hemocitos, sin embargo, estas células no comparten muchas características con los hemocitos hasta que son liberadas a la circulación por lo que incluso se ha sugerido que cuenten con su propia clasificación, por ejemplo, en las precursoras no se ha detectado presencia de proteínas relativas al sistema de profenol-oxidasa en comparación con su alta concentración en los hemocitos granulares circulantes. Se ha demostrado que la función de los hemocitos dentro de la respuesta inmune es fagocitar y encapsular agentes extraños al organismo que se encuentren en el sistema vascular del camarón o hemocele (Lee *et al.*, 2001, Rodríguez *et al.*, 2005), aunque también son los responsables de la respuesta humoral pues tienen gránulos cuyo contenido enzimático es exocitado cuando hay un estímulo por la presencia de agentes extraños (Johansson y Söderhäll, 1989; Söderhäll y Cerenius, 1992; Martin *et al.*, 1998). Como ya se mencionó anteriormente, la respuesta celular en el camarón está dirigida por los hemocitos, sin embargo, existen pocos estudios sobre los hemocitos de

camarón en relación con su separación y/o clasificación y no son aplicables para análisis de rutina. Además, el origen y el desarrollo ontogénico no han sido totalmente elucidados, dificultando la clasificación de los hemocitos de crustáceos (Ratcliffe *et al.*, 1985; Hose *et al.*, 1990; Clare y Lumb, 1994; Hernández-López, 2001); no obstante, se clasifican morfológicamente por la presencia de gránulos con contenido enzimático como hialinos, semi-granulares y granulares (Rodríguez *et al.*, 2002; Söderhäll y Cerenius, 1992; Johansson *et al.*, 2000). El número de hemocitos totales y por poblaciones es muy variable en cada organismo, este depende de condiciones de estrés, infecciones, ciclo de muda, etc., por lo que no existe un intervalo establecido y el número de estas células en los organismos no es un buen indicativo del estado fisiológico (Johansson *et al.*, 2000).

7.1. Hemocitos hialinos

Los hemocitos hialinos son células de forma ovoide de 5 micrómetros (μm) de diámetro, tienen un núcleo de forma ovoide y su citoplasma forma una capa alrededor de éste que se expande ligeramente hacia los polos, además presentan ribosomas libres, retículo endoplásmico liso y rugoso y no presentan aparato de Golgi (Martin y Graves, 1985). Se ha reportado que pueden contener gránulos estriados (Bachère *et al.*, 1995). Los hemocitos hialinos parecen ser los más abundantes durante la muda (Johansson *et al.*, 2000). También han sido considerados como células precursoras de los otros tipos de hemocitos (Van de Braak *et al.*, 2002), además son los encargados de llevar a cabo la coagulación, ya que contienen transglutaminasa, la enzima responsable de la polimerización de la proteína del plasma, aunque también se ha observado actividad fagocítica (Johansson *et al.*, 2000).

7.2. Hemocitos semi-granulares

Los hemocitos semi-granulares son células de forma ovoide con un diámetro de 6-18 μm . Son fáciles de identificar con ayuda del microscopio óptico por que se pueden observar en ellos pequeños gránulos oscuros en el citoplasma. El citoplasma de este tipo de hemocitos también contiene ribosomas, retículo endoplásmico liso y rugoso y aparato de Golgi y son los más abundantes en condiciones normales, constituyendo alrededor del 50% de la población total de hemocitos (Martin y Graves, 1985). Tienen función de encapsulación y en menor medida de fagocitosis (Johansson *et al.*, 2000).

7.3. Hemocitos granulares

Los hemocitos granulares tienen forma ovoide a esférica, y miden 16 μm de diámetro. En su núcleo se distinguen gránulos grandes que lo obscurecen. La presencia de gránulos tan grandes hace que el citoplasma se vea de un área muy reducida. Tienen ribosomas y retículo endoplásmico rugoso aunque en menor cantidad que los hemocitos semi-granulares (Martin y Graves, 1985). Tienen propiedades de citotoxicidad y lisis celular, y además cuentan con el sistema profenol-oxidasa en sus gránulos.

7.4. WSSV en hemocitos

El mecanismo exacto de entrada del WSSV a la célula hospedera no ha sido completamente elucidado. La infección se inicia cuando un virión se une a la superficie de una célula blanco (Jiravanichpaisal *et al.*, 2006a). Una o varias moléculas superficiales en las células de tejidos blanco susceptibles al virus podrían funcionar como receptores virales; inicialmente hay un evento de reconocimiento molecular y posteriormente se dan interacciones moleculares. Un ejemplo son los dominios tipo integrina, los cuales están presentes en las membranas de los hemocitos y células hematopoyéticas en muchos crustáceos (Holmblad *et al.*, 1997; Jiravanichpaisal *et al.*, 2006a), que actúan como receptores de los virus envueltos como el WSSV. Algunas proteínas de la envoltura viral tienen motivos RGD (arginina-glicina-ácido aspártico) que pueden mediar la adhesión del virus a la integrina celular. Los tripéptidos RGD tienen funciones de reconocimiento celular e infectividad en una gran variedad de patógenos (Huang *et al.*, 1995; Li *et al.*, 2007). En el genoma del WSSV al menos seis proteínas estructurales presentan motivos RGD, éstas son las VP31, VP36A, VP36B, VP110, VP136, VP281 y la VP664 (Yang *et al.*, 2001; Huang *et al.*, 2002; Plow *et al.*, 2000). Esta posibilidad ha sido sugerida para más tipos de crustáceos (Jiravanichpaisal *et al.*, 2006a).

Es muy posible que la infección viral requiera más de una interacción molecular. Una posibilidad es que existan otros receptores para diferentes proteínas estructurales virales. Sritunyaluksana *et al.* (2006) identificaron y caracterizaron una proteína homóloga a Rab en crustáceos. Las proteínas Rab regulan y controlan la formación y movimiento de

vesículas endocíticas al interior de las células y en la subsecuente fusión a los endosomas (Sritunyalucksana *et al.*, 2006).

El sistema circulatorio en los crustáceos es abierto, eso quiere decir que la hemolinfa baña todos los tejidos del organismo, lo que convierte a los hemocitos en rápidas y muy efectivas células transportadoras del virus.

Se ha detectado que cuando los organismos cursan esta enfermedad, existe un incremento en el porcentaje de hemocitos hialinos (Kim *et al.*, 1999; Lee y Söderhäll, 2002), sin embargo esto aún no se comprueba ya que existe la posibilidad de que sean los hemocitos granulares los que disminuyan y la cuenta de hialinos parezca aumentada. Wang *et al.* (2002) encontraron que los hemocitos hialinos muestran resistencia a la infección por el virus. Sonnenhözner *et al.* (2002), observaron una proliferación y migración de hemocitos de todos los tipos, en los tejidos reportados como órganos objetivo en animales resistentes al ser desafiados en condiciones de alta temperatura o hipertermia.

Se ha observado la aparición de células apoptóticas en los animales infectados, (Flegel y Pasharawipas, 1998; Khanobdee *et al.*, 2002). Éstas se manifiestan en muchos tejidos incluyendo a los hemocitos (Rojtinnakorn *et al.*, 2002), por lo tanto, se cree que los organismos que presenten un mayor número de células apoptóticas, podrían ser resistentes al virus (Granja *et al.*, 2003). Aunque recientemente se reportó que el WSSV induce la expresión de una proteína anti-apoptosis (Leu *et al.*, 2012), evadiendo así esta importante defensa de los organismos contra virus.

En otros crustáceos como *Pacifastacus leniusculus*, se ha reportado que el WSSV inhibe el sistema profenol-oxidasa (responsable de la melanización en crustáceos), ya que a diferencia de lo que sucede en una respuesta inmune normal en los animales infectados, no se encontró melanización, así que tal vez inhiba la síntesis de alguna enzima y este proceso no pueda llevarse a cabo (Jiravanichpaisal *et al.*, 2006a).

Estudios en *Peneaeus merguineus* demostraron que WSSV infecta únicamente a hemocitos semi-granulares y granulares, y que los semi-granulares son más susceptibles al

observarse en ellos una infección más rápida y una prevalencia del 22% a diferencia del 5% en granulares (Wang *et al.*, 2002).

8. Citometría de flujo

Con lo descrito anteriormente, se puede sugerir que existen una serie de cambios físicos y químicos en el interior de las células al ser infectadas con el WSSV, por lo que evaluar cada una de ellos, puede ayudar a conocer mejor la complejidad y tamaño de los hemocitos y a clasificarlos cuando son analizados individualmente, además de poder correlacionar la función de cada célula (Robinson, 2004).

Una técnica que puede ayudar a realizar estos estudios es la citometría de flujo. Ésta trabaja con tres sistemas: el de flúidos, el óptico y el electrónico, todos ligados entre sí. El sistema de fluidos tiene como objetivo la creación interna de un flujo laminar, éste obliga a la separación de las células en suspensión y a que pasen ordenadas y una por una. Posteriormente en el sistema óptico, se encuentran las células con el rayo láser; a esta etapa se le conoce como “punto de choque o de interrogación”, y consiste en la medición de las células por los dos detectores del equipo: forward (o frente) y side (o lado), además de los detectores de fluorescencia que tienen como función evaluar la capacidad que tiene una célula para absorber la luz y liberarla. Finalmente, en el sistema electrónico, las señales del sistema óptico se convierten en energía eléctrica y las características de las células son reflejadas en un citograma (Robinson, 2004).

Existen pocos trabajos actualmente en donde se utilice esta técnica en el estudio de la respuesta inmunológica de los crustáceos. Uno de ellos es el descrito por Sun *et al.* (2010), en donde identificó las tres subpoblaciones de hemocitos: semi-granulares, granulares y hialinos, basado en los parámetros de tamaño relativo (FSC) y complejidad celular (SSC). Otro trabajo es el de Sahul-Hameed *et al.* (2006) en el que utilizó la técnica para observar apoptosis en hemocitos de *Penaeus monodon* y *Penaeus indicus* infectados con WSSV.

JUSTIFICACIÓN

El virus que causa el Síndrome de la Mancha Blanca (WSS) es el agente etiológico de origen viral más letal que afecta al camarón blanco *L. vannamei*, cuyo cultivo es una de las actividades que genera mayores ingresos económicos de producción acuícolas en todo el mundo. Si bien, cada día se conocen más detalles sobre la morfología y estructura del virus, los estudios sobre la dinámica de infección son escasos, mucho más escaso es el mecanismo por el cual los hemocitos pudieran ser infectados y la velocidad con que esto sucede. Por lo anterior, en este trabajo, se pretende, mediante el uso de técnicas moleculares y citometría de flujo, determinar si el Virus de la Mancha Blanca es capaz de infectar a los hemocitos del camarón, el tiempo en que ocurre el proceso infeccioso y si existe una relación entre el grado de infección y el tipo de hemocito infectado.

La rapidez de propagación del virus en México y el resto del mundo, hace impostergable la urgencia de su investigación, sobre todos en los eslabones de la cadena antes señalados, pues los estragos económicos causados recientemente en zonas productoras de camarón blanco como el Noroeste de nuestro país, son sólo un ejemplo de lo que puede suceder si el virus se expande en una escala superior.

OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar, por medio de técnicas moleculares y citometría de flujo la capacidad infectiva del Virus del Síndrome de la Mancha Blanca WSSV, en hemocitos del camarón blanco *L. vannamei* así como su velocidad de replicación y tropismo celular específico.

Objetivos particulares

1. Determinar si los hemocitos del camarón son las células blanco del WSSV.
2. Determinar el tiempo de infección de WSSV en hemocitos mediante análisis de ácido ribonucleico mensajero (ARNm).
3. Determinar el tipo de hemocitos que infecta el WSSV.
4. Demostrar la infección por WSSV en hemocitos usando la técnica de citometría de flujo.

HIPÓTESIS

EL Virus del Síndrome de la Mancha Blanca WSSV, infecta hemocitos granulares de los camarones en tiempos tan cortos como 30 min.

MATERIALES Y MÉTODOS

Todos los materiales de plástico usados fueron adquiridos comercialmente libres de pirógenos o con calidad para cultivo de tejidos. El material de vidrio se utilizó nuevo y además se incubó a 260°C durante 5 horas para descartar la posibilidad de que este material se encontrará contaminado con pirógenos. Todas las soluciones se prepararon con agua y reactivos libres de pirógenos.

1. Manejo y aclimatación de los organismos vivos

Para la realización de este estudio se obtuvieron 30 camarones de una granja en el Estado de Sonora. El peso aproximado de los organismos fue de 22 gramos (g) y se diagnosticaron como libres de patógenos por medio de la técnica qPCR en tiempo real. Los organismos se transportaron a las instalaciones del Laboratorio de Referencia, Análisis y Diagnóstico en Sanidad Acuícola, del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste CIBNOR, S.C., Campus Hermosillo para la realización de los experimentos. De igual manera se transportó agua de mar filtrada con arena, ozonificada y esterilizada mediante rayos ultravioleta (UV). En el laboratorio, los camarones se distribuyeron en cinco acuarios de plástico con capacidad de 60 litros (L) cada uno, se colocaron seis organismos en cada tina. El agua de mar en las tinas se mantuvo con una salinidad de 35%, una temperatura de 28°C, filtro de arena y aireación constante. Se realizaron recambios de agua cada semana del 30% del volumen total y se les proporcionó alimento balanceado *ad libitum* dos veces al día. Los organismos se mantuvieron bajo estas condiciones por diez días previos a la infección experimental, para aclimatarlos y eliminar el estrés.

2. Obtención del inóculo viral

Para la preparación del inóculo viral se utilizó la metodología descrita por Gracia-Valenzuela *et al.* (2009) (Fig. 1). De un camarón infectado con WSSV se disectaron las branquias, pleópodos y músculo del cefalotórax (1 g de tejido total) y se dividió en cuatro microtubos de 1.7 mL, colocando 0.25 g de tejido en cada tubo a los que se les agregó 1 mL de solución salina fisiológica (SSF) 0.9% PiSA[®] y se homogeneizó con ayuda de un pistilo.

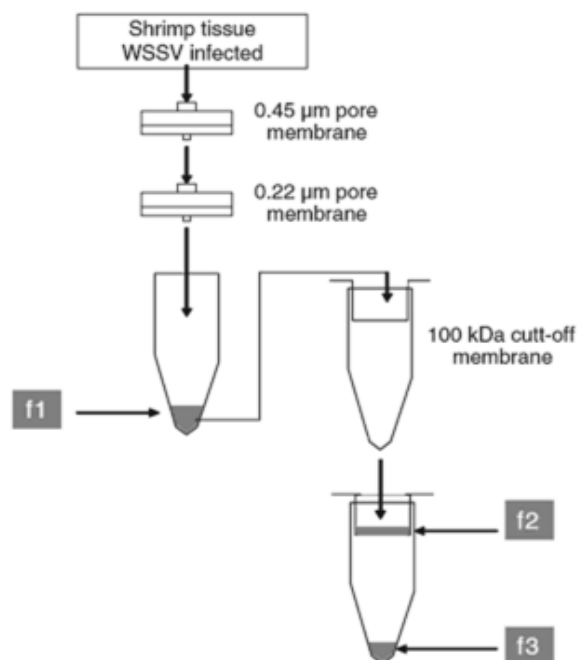


Figura 1. Purificación de partículas del Virus del Síndrome de la Mancha Blanca (WSSV) utilizando un microfiltro de 100 kDa. Tomado de Gracia-Valenzuela *et al.*, 2009.

Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 3,000 x *g* durante 20 minutos (min) a 4°C. El sobrenadante obtenido se centrifugó nuevamente a 8,000 x *g* durante 30 min a 4°C. Finalmente, el nuevo sobrenadante se pasó a través de un filtro de membrana de 0.45 µm, y subsecuentemente por uno de 0.22 µm (f1). El filtrado final se colocó en dos microfiltros con poro de 100 kDa y fueron centrifugados a 1,000 x *g* durante 30 min a 4°C. El material retenido en el microfiltro se recuperó en un tubo (f2) al igual que el material filtrado por el poro (f3) y ambos fueron debidamente etiquetados y conservados a -80°C hasta su uso. Antes de almacenar el inóculo viral, se tomaron 100 µL de cada filtrado para la extracción de ADN (Anexo 1). Posteriormente se cuantificó la concentración del ADN con un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) para ajustarlos a 50 nanogramos (ng) /µL. A continuación, se determinó el número de copias virales mediante la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) utilizando un kit comercial IQ™ REAL® WSSV quantitative system de acuerdo a las instrucciones del proveedor

(Anexo 2). La qPCR se llevó a cabo en un termociclador Rotor-Gene-1000 Corbett. Para confirmar la infección se aplicó una inyección intramuscular de 100 μ l (entre el tercer y cuarto segmento abdominal) del inóculo viral a dos camarones. Cuando los organismos comenzaron a presentar los signos de la enfermedad después de 48 horas post-infección (hpi), se les extrajo hemolinfa del seno hemolinfático ventral (entre el último par de pereopodos y el primer par de pleópodos) con una jeringa de 1 mL con anticoagulante para camarón SIC-EDTA (450 mM NaCl; 10 mM KCl; 10 mM HEPES; 10 mM EDTA según Vargas-Albores *et al.* 1993). Posteriormente se confirmó la presencia de WSSV por medio de qPCR en tiempo real con el par de primers *VP28F* (5'-CTG-CTG-TGA-TTG-CTG-TAT-TT-3') y *VP28R* (5'-CAG-TGC-CAG-AGT-AGG-TGA-C-3') (Anexo 3) utilizando el ADN extraído de las muestras.

3. Infección *in vitro* de hemocitos de camarón blanco con WSSV

Se extrajo hemolinfa individualmente del seno hemolinfático ventral de 11 camarones con SIC-EDTA en proporción 1:2. Las muestras se centrifugaron durante cinco min a 1,000 x g, se eliminó el sobrenadante y los hemocitos fueron resuspendidos en 500 μ L de solución isotónica para camarón, SIC (450 mM NaCl; 10 mM KCl; 10 mM HEPES; pH 7.3 Vargas-Albores *et al.*, 1993). Las muestras se homogeneizaron suavemente, y de cada camarón fueron colocadas cinco réplicas de 100 μ L de células resuspendidas en cinco diferentes pozos en una microplaca estéril de 96 pozos, con calidad para cultivo de tejidos (Fig. 2) (Anexo 4) y se le agregaron 50 μ L del inóculo viral a cada pozo. Adicionalmente se corrieron controles de hemocitos y de inóculo viral. La placa se incubó a 29°C y se mantuvo con movimiento suave durante 0.5, 1, 2, 4 y 6 h; una vez transcurrido cada tiempo, se tomaron 10 μ L en tubos de 0.2 mL de cada pozo para realizar una primera cuenta celular en un contador de células clínico Invitrogen[®]. Se calculó el porcentaje de viabilidad utilizando el contador clínico, el cual usa el principio de exclusión de Azul de Tripan (Corder, 1999) (Anexo 5). Posteriormente las muestras se fijaron con 500 μ L de Trizol[®] con fundamento en la técnica descrita por Chomczynsky y Sacchi (1987) asegurándose cada vez de remover todo el contenido para realizar una extracción de ácido ribonucleico total (ARN) (Anexo 6).

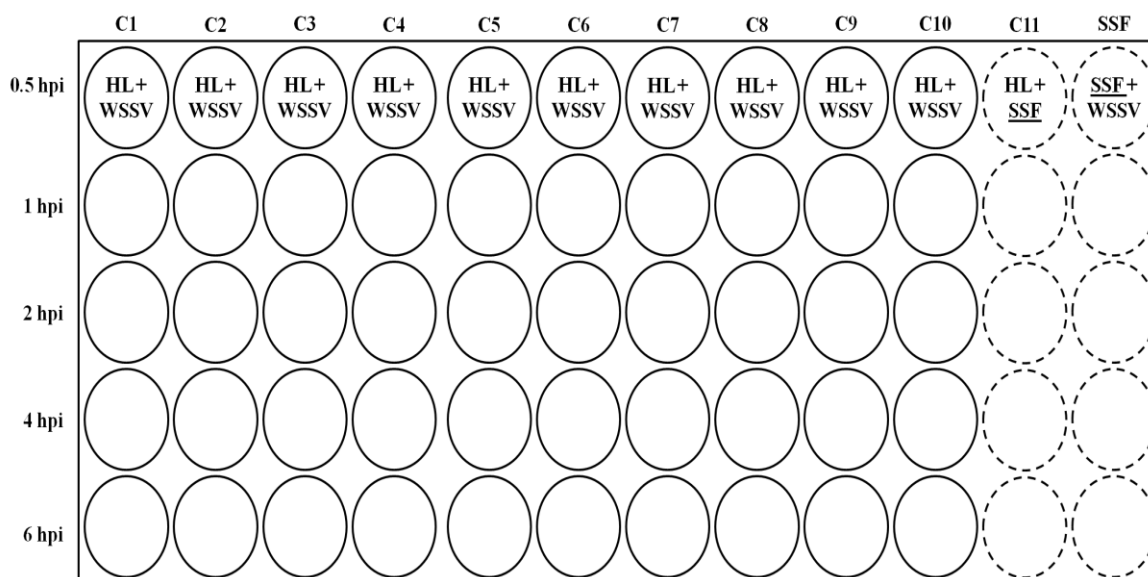


Figura 2. Distribución de las muestras en infección *in vitro* de hemocitos. HL= hemolinfa; C=camarón; SSF=solución salina fisiológica.

Para determinar la concentración de ARN se midió la absorbancia a 260 nm utilizando un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) y se determinó el índice de pureza utilizando el siguiente criterio: $A_{260}/280 \geq 1.8$ (Puerta y Ureña, 2005). Una vez obtenida la concentración de ARN, se ajustaron las cantidades a una concentración lo más cercana a 100 ng/ μ L para realizar la confirmación de la infección por reacción en cadena de la polimerasa de retrotranscripción RT-PCR (Anexo 7) utilizando el par de primers iEF (5'-GAC-TCT-ACA-AAT-CTC-TTT-GCC-A-3') e iER (5'-CTA-CCT-TTG-CAC-CAA-TTG-CTA-G-3'). Previamente, para asegurarse que las muestras de ARN no estuvieran contaminadas con ADN, se realizó un qPCR de todas las muestras siguiendo el protocolo del Anexo 3.

Adicionalmente, se realizó una infección *in vitro* de hemocitos sanos de camarón café (*Farfantepenaeus californiensis*, Holmes 1900) y langosta espinuda (*Panulirus interruptus*, Randall 1840) siguiendo la metodología descrita anteriormente, pero a un sólo tiempo 1 hpi y sin cuenta celular previa, con su respectivo control negativo. Se ajustó el ARN y se realizó un RT-PCR para confirmar la infección.

4. Infección de poblaciones separadas de hemocitos de organismos vivos de camarón blanco

Para definir si el WSSV infecta diferencialmente a las tres poblaciones de hemocitos, los diferentes tipos celulares se separaron utilizando un gradiente discontinuo de Percoll™. Para ello, se infectaron experimentalmente ejemplares de camarón blanco *L. vannamei* con el inóculo viral antes descrito y se mantuvieron en diferentes tiempos, confirmando la infección con RT-PCR y qPCR.

Diez camarones de una tina fueron inoculados (intramuscularmente entre el tercer y cuarto segmento abdominal) con 100 µL de inóculo viral en una tina y dos camarones de otra una tina fueron inoculados con 100 µL de SSF como controles negativos. Las condiciones de mantenimiento fueron iguales a las utilizadas durante su aclimatación. Posteriormente se tomaron al tiempo 0, 1, y 24 hpi 500 µL de hemolinfa con SIC-EDTA previamente enfriado en proporción 1:2 en pools de 2 camarones, teniendo como volumen final 2 mL, En cada toma se homogeneizó la muestra y se colocó en la superficie de un tubo de ensayo de 10 mL que contenía un gradiente discontinuo de Percoll™ frío, 2.5 mL al 40% en la superficie y 2.5 mL al 55% en el fondo (diluidos en SIC doble concentrada 900 mM) y se centrifugaron a 2500 x g por 10 min a 4°C.

Del centrifugado anterior se recuperaron en 200 µL de SIC enfriado tres bandas que se observaban a simple vista: banda superficial, banda media y banda profunda como se muestra en la figura 3. Posteriormente se tomaron 10 µL de cada banda para seguir el protocolo del contador de células clínico (Anexo 5) y asegurar la presencia de células.

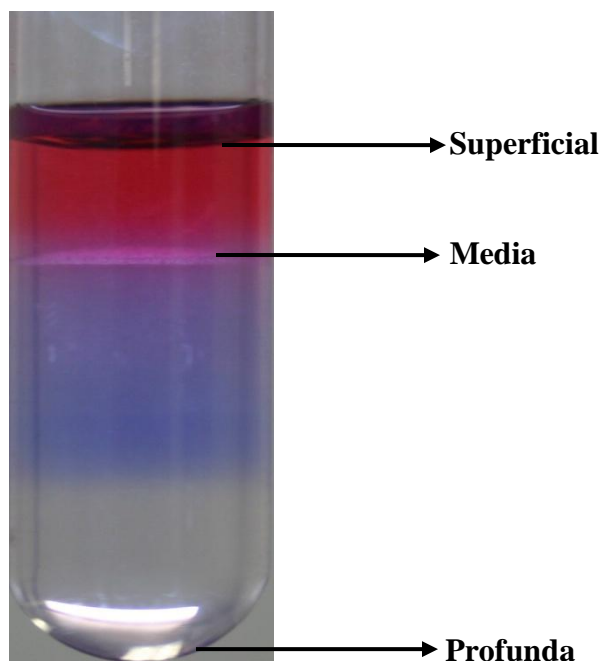


Figura 3. Bandas superficial, media y profunda de hemolinfa separada con gradiente discontinuo de Percoll[™].

Los hemocitos recuperados se fijaron con Trizol[®] a las 0 y 1 hpi para la extracción de ARN y las muestras de las 24 hpi se colocaron directamente en solución de lisis (NaCl 100 mM, Tris 50 mM, EDTA 100 mM y SDS 1%) para su extracción de ADN (Anexo 1). Las concentraciones de ácidos nucleicos se ajustaron a valores cercanos a 100 ng/ μ L, y se buscó al virus por medio de RT-PCR, para demostrar la infección de los tiempos 0 y 1 hpi utilizando el par de primers iEF (5'-GAC-TCT-ACA-AAT-CTC-TTT-GCC-A-3') e iER (5'-CTA-CCT-TTG-CAC-CAA-TTG-CTA-G-3') y con una qPCR para demostrar la infección de las 24 hpi con el par de primers VP28F (5'-CTG-CTG-TGA-TTG-CTG-TAT-TT-3') y VP28R (5'-CAG-TGC-CAG-AGT-AGG-TGA-C-3') utilizando como templado el cDNA obtenido de las muestras de RNA.

5. Análisis mediante la técnica de citometría de flujo

La técnica se realizó según lo descrito por Sun *et al.* (2010). Inicialmente se infectaron 10 camarones con 100 μ L de inóculo viral y uno con 100 μ L de SSF, a las 24 h se extrajeron 100 μ L de hemolinfa con una jeringa de 1 mL de ambos grupos con 100 μ L de anticoagulante SIC-EDTA previamente enfriado. Las muestras se transportaron en frío (4°C) al laboratorio de Inmunología, del Departamento de Nutrición del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Hermosillo, Sonora. Posteriormente, se le añadieron 10 μ L/mL de yoduro de propidio (PI) a cada muestra, y se incubaron durante 10 min a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo se hicieron las mediciones de los parámetros FSS “forward and side light scatter” y la fluorescencia generada por el yoduro de propidio (con filtro en 488/10 y 575nm, respectivamente) y se adquirieron la cantidad de 50,000 células por muestra por duplicado en un citómetro de flujo FACSCanto II™ (BD Biosciences, San José CA). Los datos se expresaron en un histograma doble con fluorescencia o citograma. Como control de viabilidad se utilizó una muestra de un camarón sano tomada con formaldehído al 4%. Las células con fluorescencia roja representaron las muertas.

RESULTADOS

1. Obtención del inóculo viral

En la curva de disociación de los productos formados durante la amplificación por qPCR de los diferentes filtrados del inóculo viral, se observa que el patrón de disociación es similar al control positivo de WSSV para f1 y f2, siendo mayor en f2, mientras que la muestra f3 no mostró amplificación (Fig. 4). Estos resultados demuestran que esta metodología permite la concentración y retención total del virus en el microfiltro de 100 kDa.

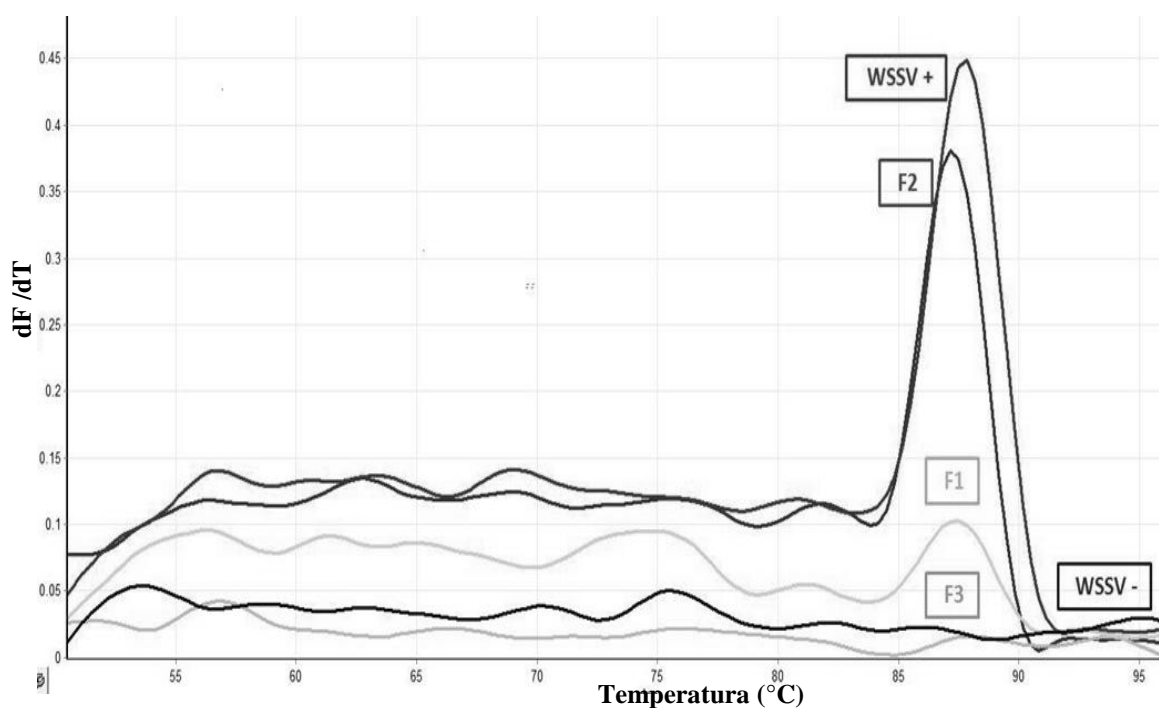


Figura 4. Curva de disociación de los productos formados durante la amplificación de los filtrados del inóculo viral.

La curva estándar generada con una muestra de virus cuantificado, indica una carga de 600 copias/ μ L en el inóculo viral utilizado para todos los experimentos. Para las infecciones *in vitro* se ajustaron las concentraciones de partículas virales de tal manera que

las muestras de hemocitos se infectaron con 30,000 copias virales, y a los organismos vivos con 60,000 copias virales (Fig. 5).

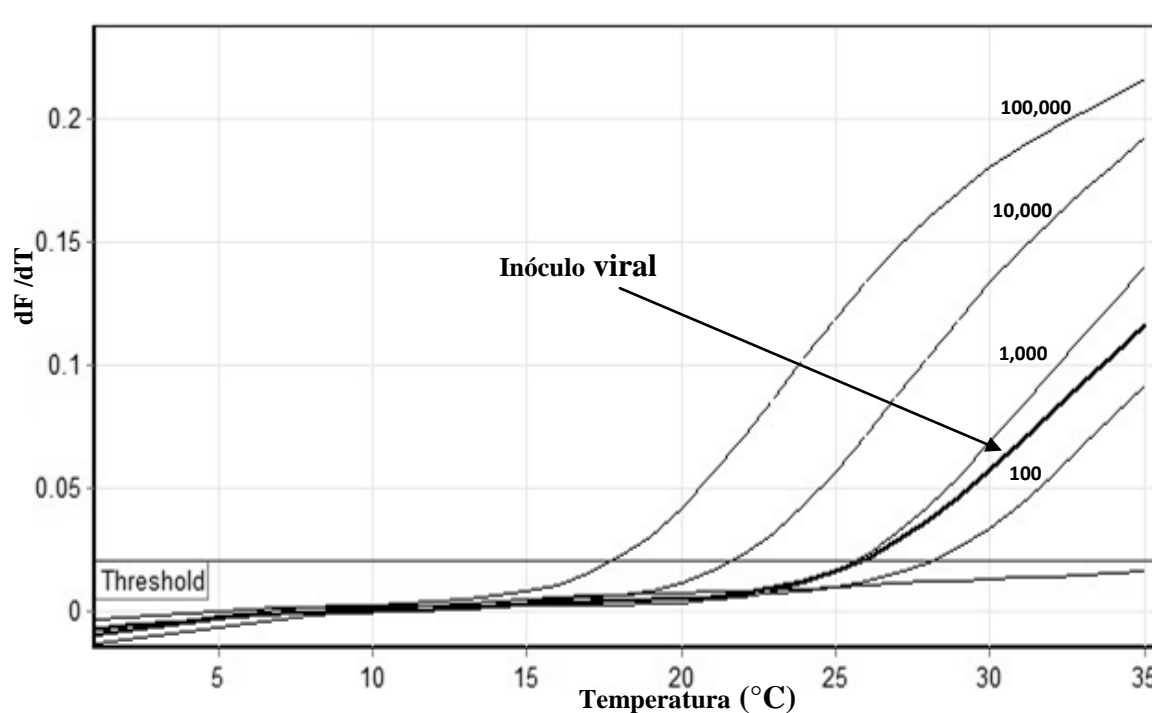


Figura 5. Cuantificación del inóculo viral obtenido con 600 copias/ μ L. Se usó una curva estándar generada con muestra de virus cuantificada.

2. Infección *in vitro* de hemocitos de camarón blanco con WSSV

La cuenta promedio de hemocitos totales una vez transcurrido cada tiempo de infección se muestra en la figura 6. Se observa que las concentraciones de hemocitos disminuyeron desde las 4 hpi. Las cuentas celulares fueron de 14.5×10^6 a la 0.5 h.p.i, 14.0×10^6 a la 1 hpi, 4.29×10^6 a las 2 hpi, 4.74×10^6 a las 4 hpi, y de 3.50×10^6 a las 5 hpi

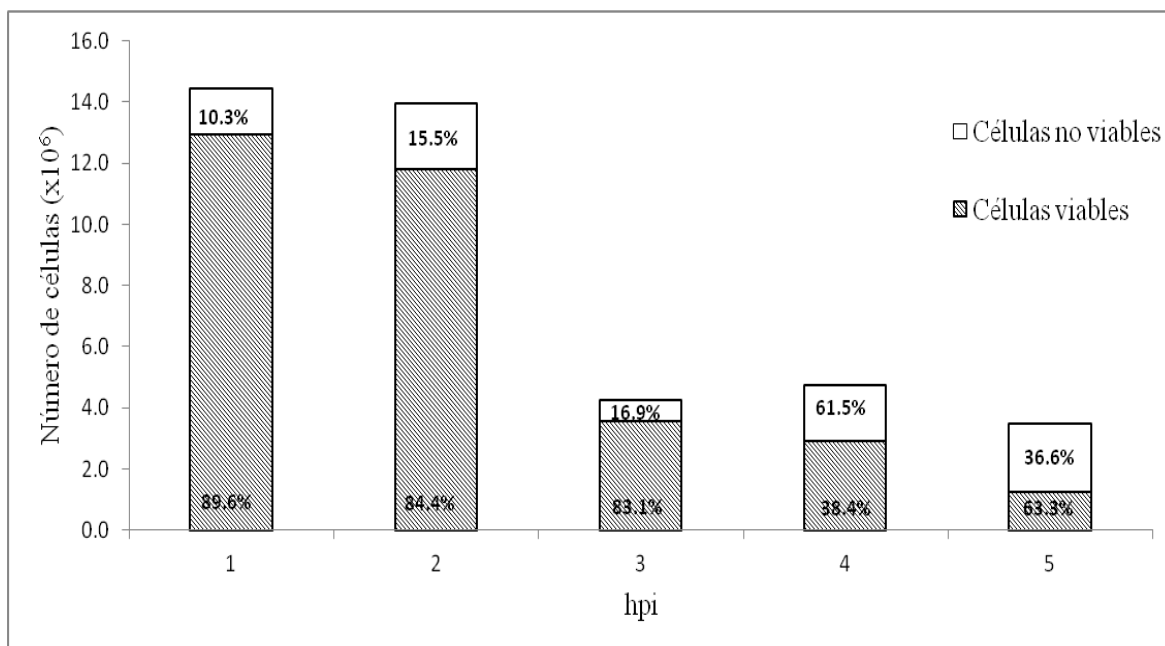


Figura 6. Cuenta promedio de hemocitos totales en las diferentes horas post-infección.

La cantidad de ARN total extraído y ajustado a concentraciones similares fue de 92.69 ng/ μ L a la 0.5 hpi, 91.48 ng/ μ L a la 1 hpi, 94.62 ng/ μ L a las 2 hpi, 99.26 ng/ μ L a las 4 hpi y 88.62 ng/ μ L a las 6 hpi, con un índice A260/280 de 1.8 para todas las muestras con una desviación estándar de 5.2, 6.5, 5.3, 4.1 y 4.4 respectivamente. La cantidad de ARN total extraído y ajustado fue en promedio de 93.34 ng/ μ L con una desviación estándar de 6.17.

La curva de disociación realizada a partir de las muestras de ARN ajustado de la infección *in vitro*, no mostró amplificación de productos formados durante la qPCR, a excepción del control positivo, por lo que se confirma que no existía contaminación con ADN (Fig. 7).

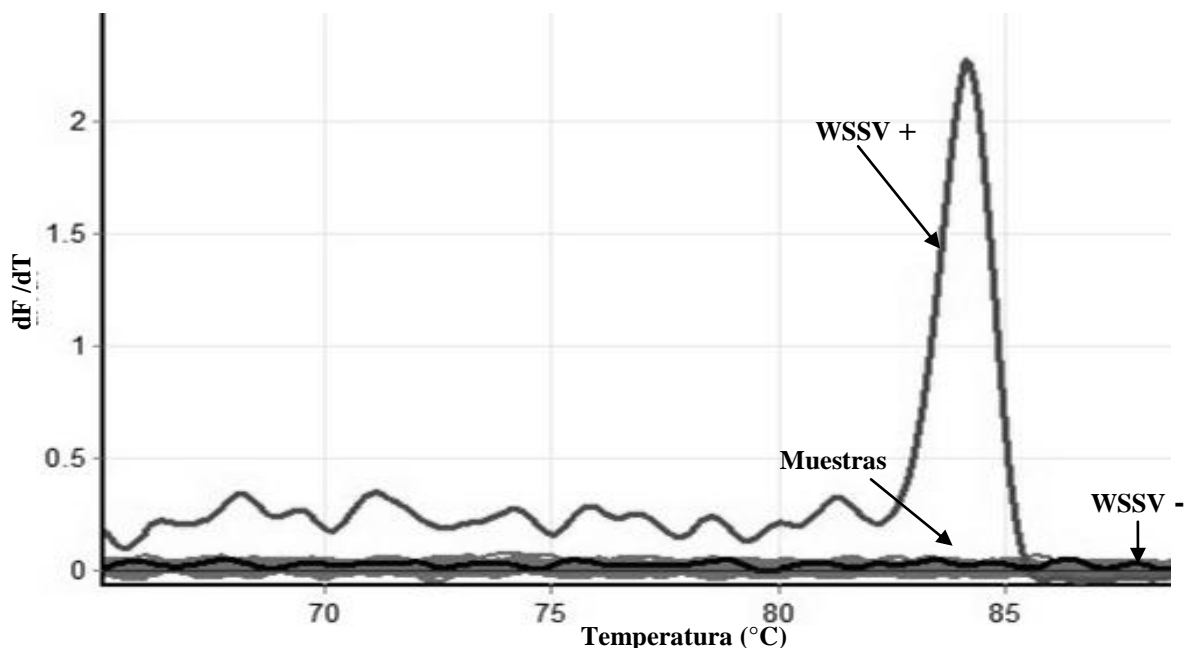


Figura 7. Curva de disociación de los productos formados durante la amplificación de las muestras de ARN de los tiempos 0.5, 1, 2, 4 y 6 hpi.

En las curvas de disociación se observan los resultados de RT-PCR de las muestras tomadas una vez cumplidas las diferentes hpi; en ellas se aprecian amplificaciones de productos de WSSV, demostrado por comparación con el control positivo. Se puede observar presencia de WSSV en todas las muestras de todos los tiempos, así como en el control de inóculo viral de las 0.5 y 1 hpi; por el contrario, no hay amplificación en el control del inóculo viral de las 2, 4 y 6 hpi, como tampoco la hay en las muestras correspondientes al control de hemocitos y al control negativo.

También se aprecian los resultados de todas las muestras por tiempos comparadas con una curva estándar de 600 (1), 60 (2) y 6 (3) copias/ μ L; cuando se calculó la concentración de las muestras, se encontraron valores de 6 a 60 copias para las 0.5, 2 y 6 hpi y valores de 6 a 600 para las 1 y 4 hpi; a excepción de los controles de hemocitos y del negativo en donde no se obtuvieron cuantificaciones (Fig. 8, 9, 10, 11 y 12).

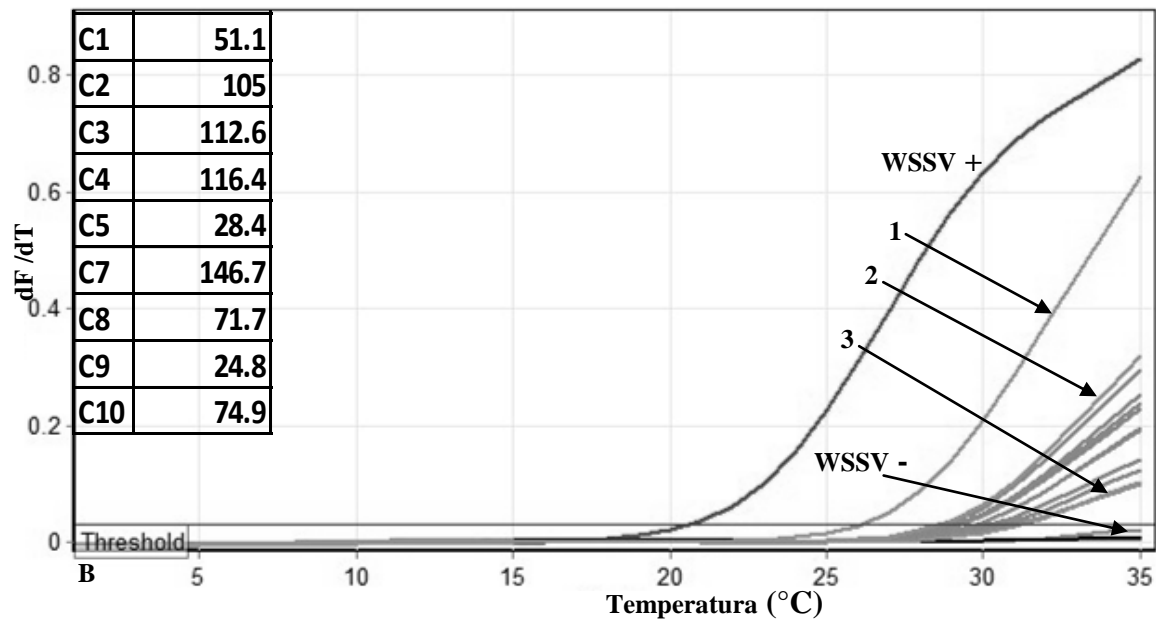
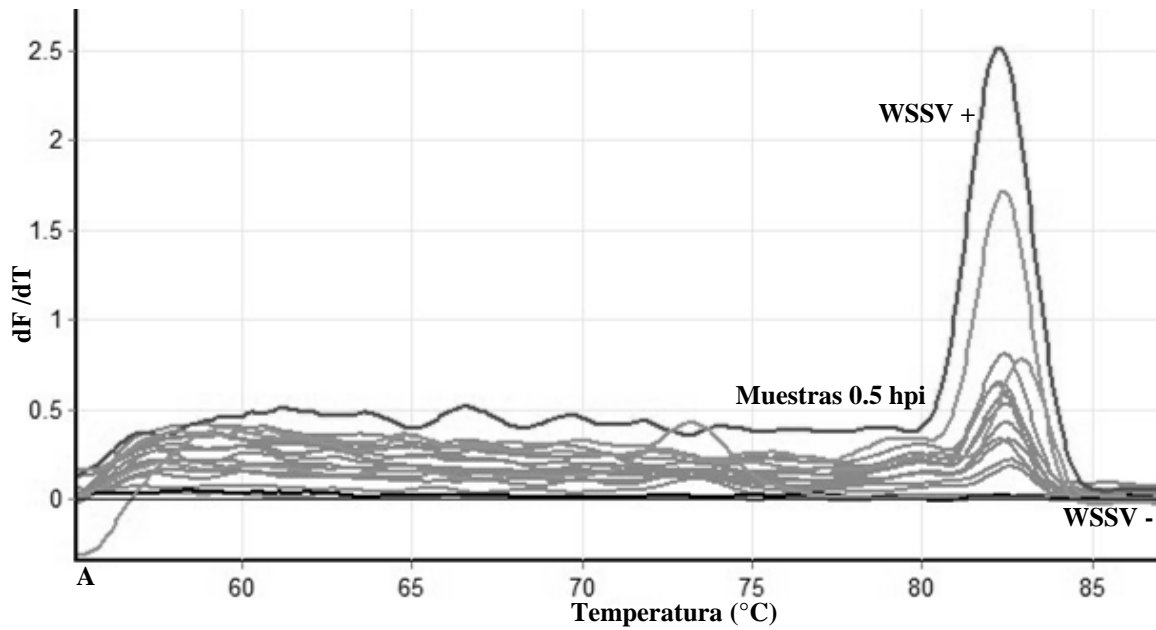


Figura 8. (A) Curva de disociación de los productos formados durante la amplificación de las muestras del tiempo 0.5 hpi. (B) Cuantificación de la carga viral mediante la detección de fluorescencia de las muestras del tiempo 0.5 hpi. (1): 600 copias/ μ L, (2): 60 copias/ μ L y (3): 6 copias/ μ L de WSSV.

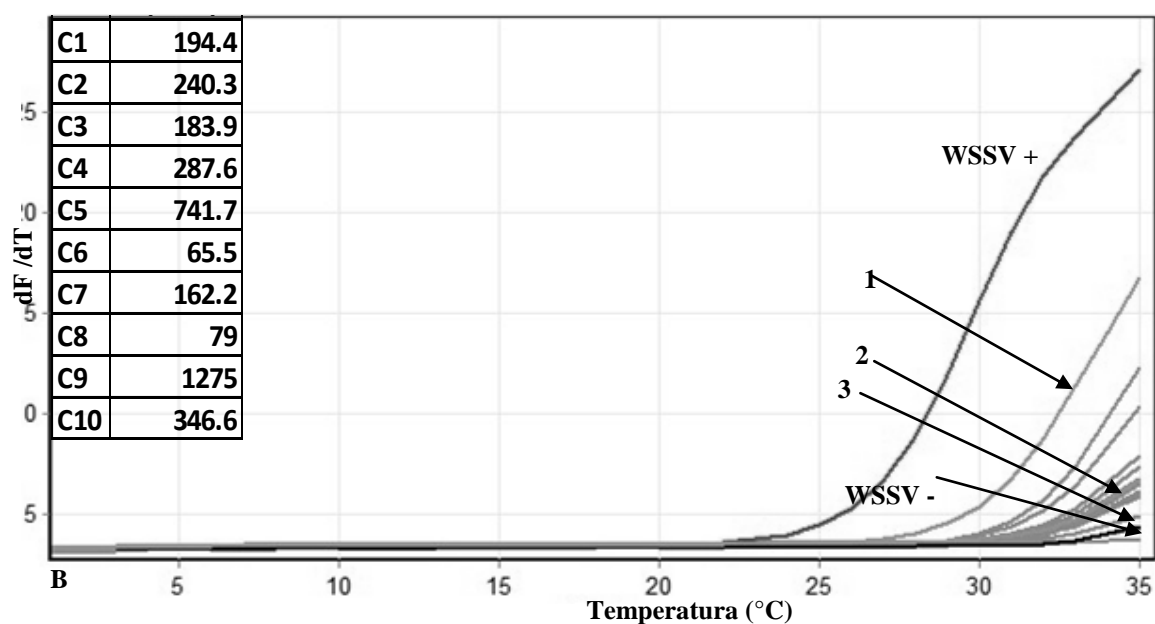
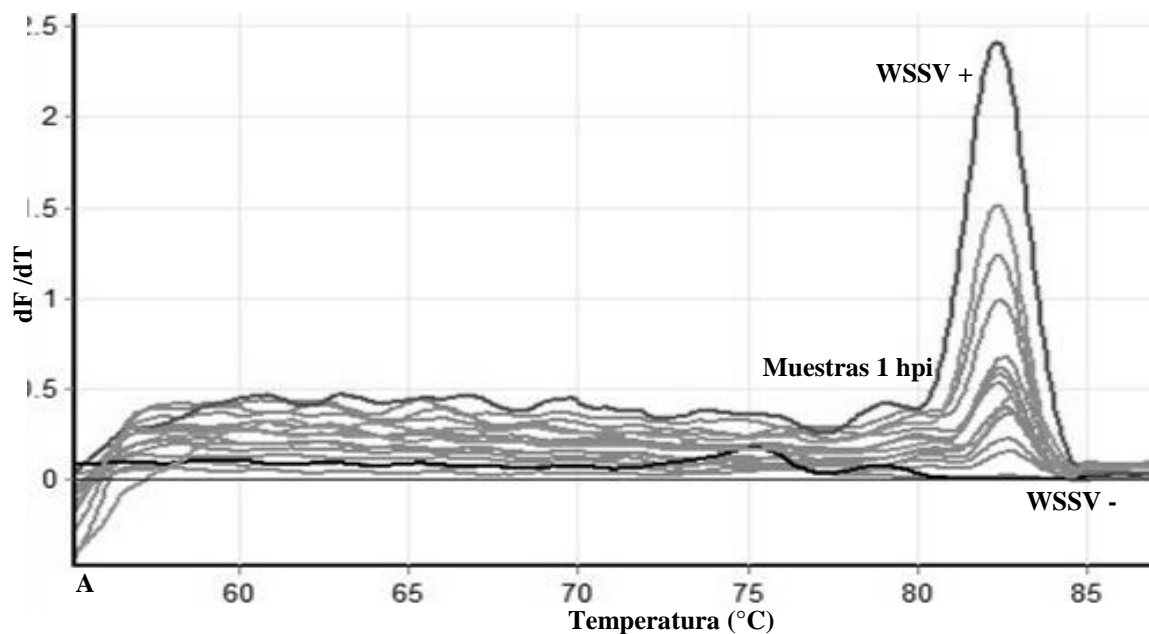


Figura 9. (A) Curva de disociación de los productos formados durante la amplificación de las muestras del tiempo 1 hpi. (B) Cuantificación de la carga viral mediante la detección de fluorescencia de las muestras del tiempo 1 hpi. (1): 600 copias/ μ L, (2): 60 copias/ μ L y (3): 6 copias/ μ L de WSSV.

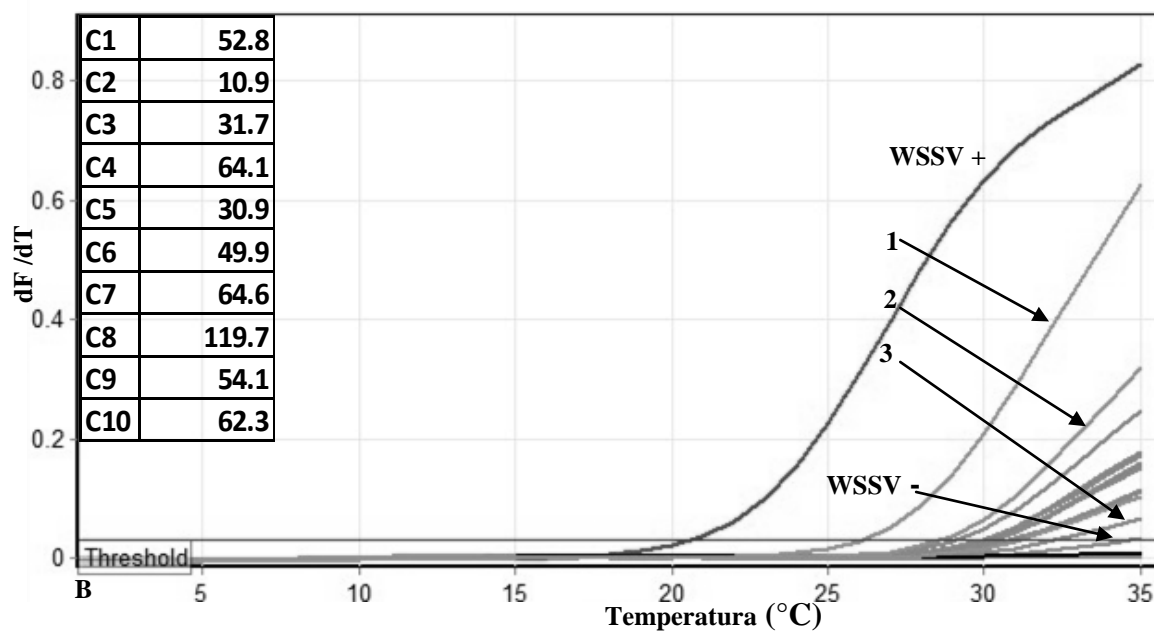
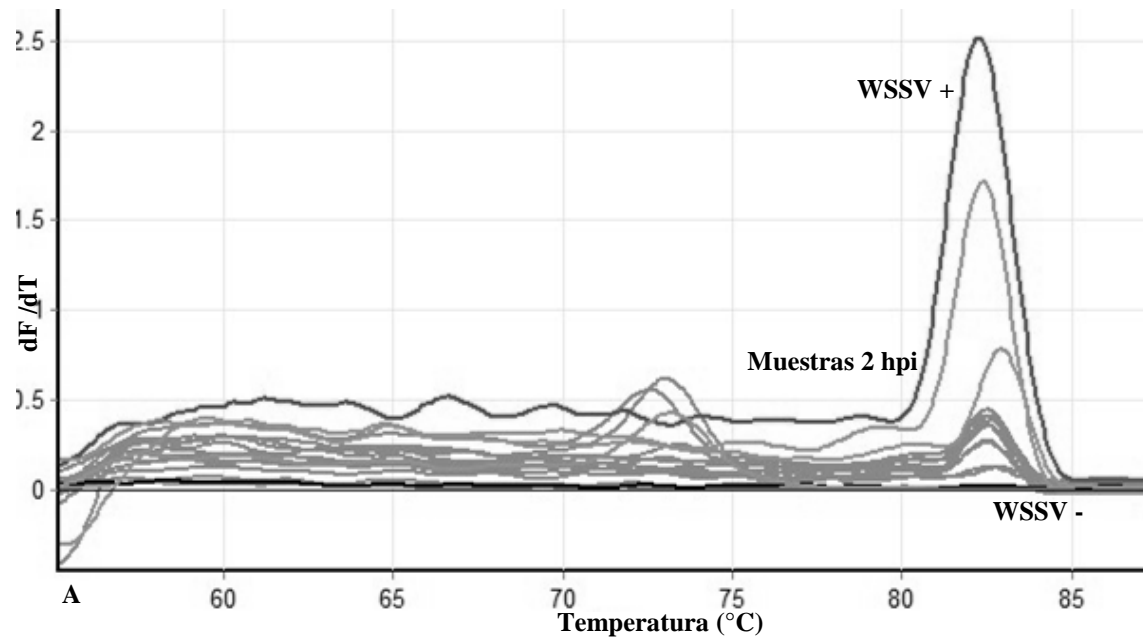


Figura 10. (A) Curva de disociación de los productos formados durante la amplificación de las muestras del tiempo 2 hpi. (B) Cuantificación de la carga viral mediante la detección de fluorescencia de las muestras del tiempo 2 hpi. (1): 600 copias/ μ L, (2): 60 copias/ μ L y (3): 6 copias/ μ L de WSSV.

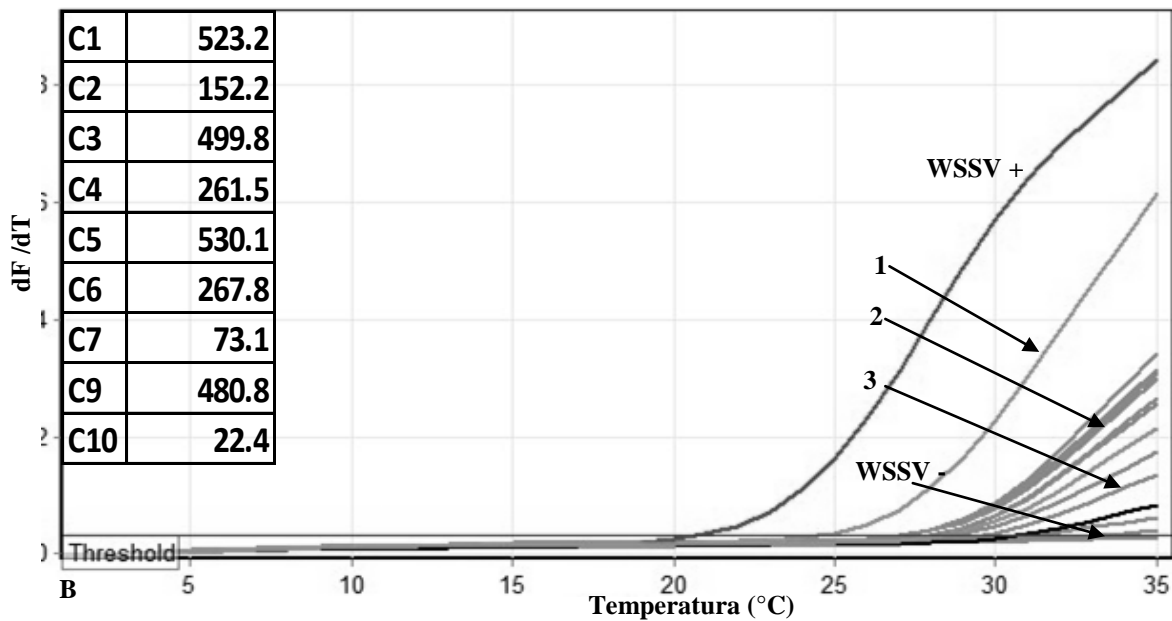
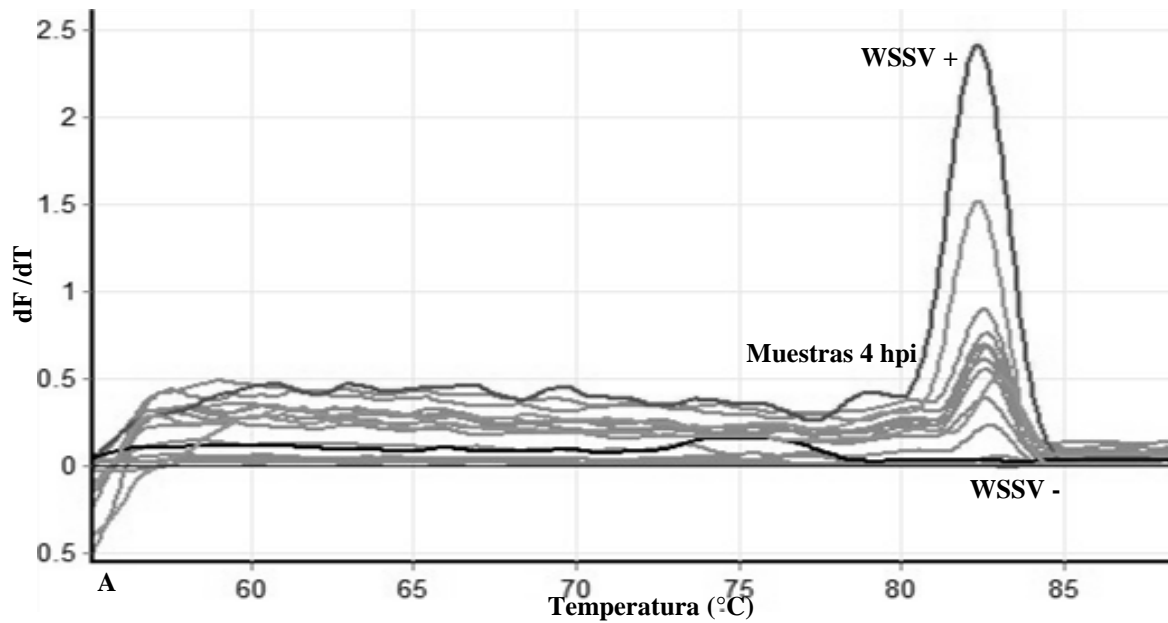


Figura 11. (A) Curva de disociación de los productos formados durante la amplificación de las muestras del tiempo 4 hpi. (B) Cuantificación de la carga viral mediante la detección de fluorescencia de las muestras del tiempo 4 hpi. (1): 600 copias/ μ L, (2): 60 copias/ μ L y (3): 6 copias/ μ L de WSSV.

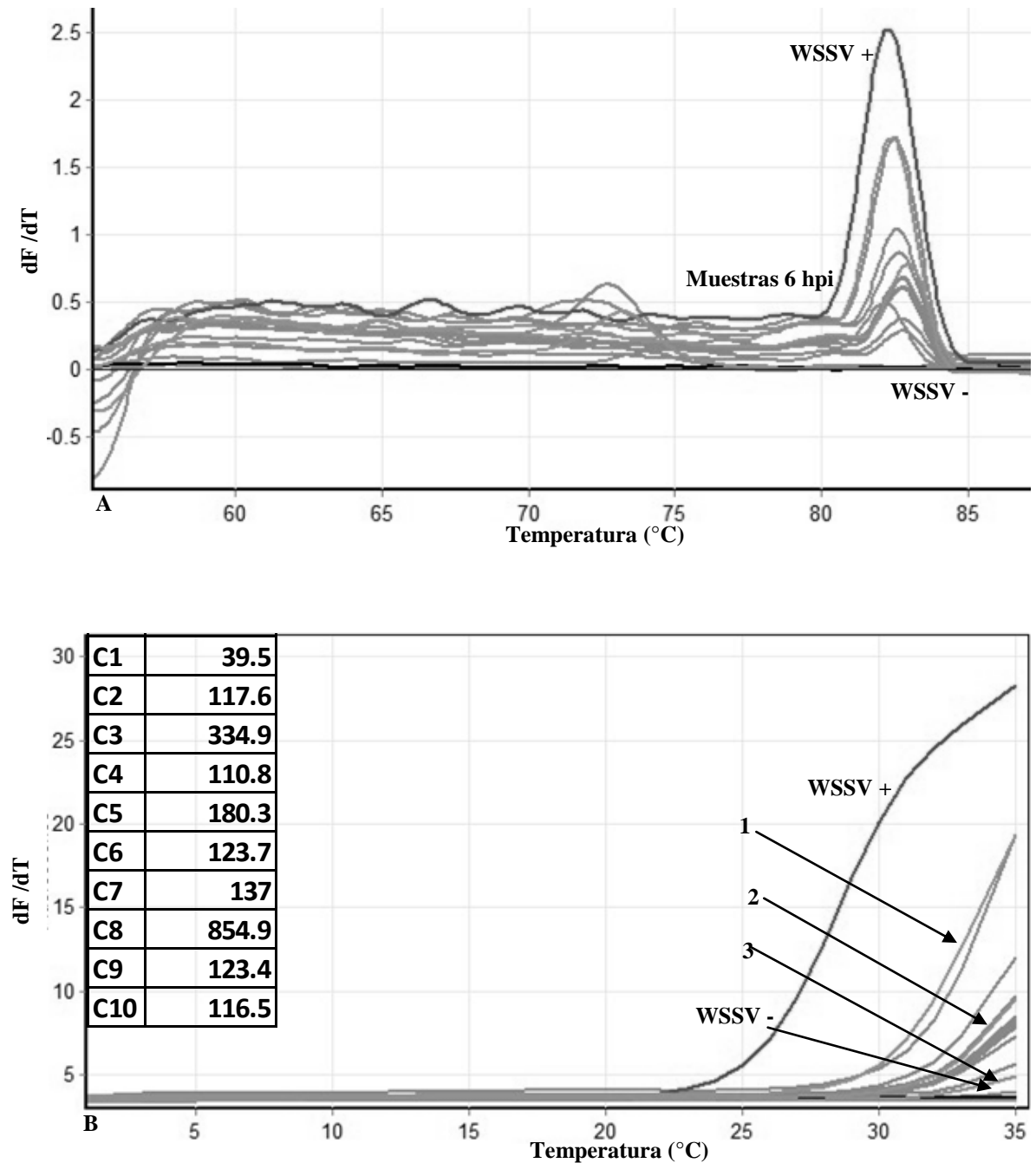


Figura 12. (A) Curva de disociación de los productos formados durante la amplificación de las muestras del tiempo 6 hpi. (B) Cuantificación de la carga viral mediante la detección de fluorescencia de las muestras del tiempo 6 hpi. (1): 600 copias/ μ L, (2): 60 copias/ μ L y (3): 6 copias/ μ L de WSSV.

La carga viral promedio en los diferentes tiempos cuantificada en número de copias virales por μL de ARN fueron de: 81 a las 0.5 hpi, 358 a las 1 hpi, 54 a las 2 hpi, 312 a las 4 hpi y 214 a las 6 hpi (Fig. 13).

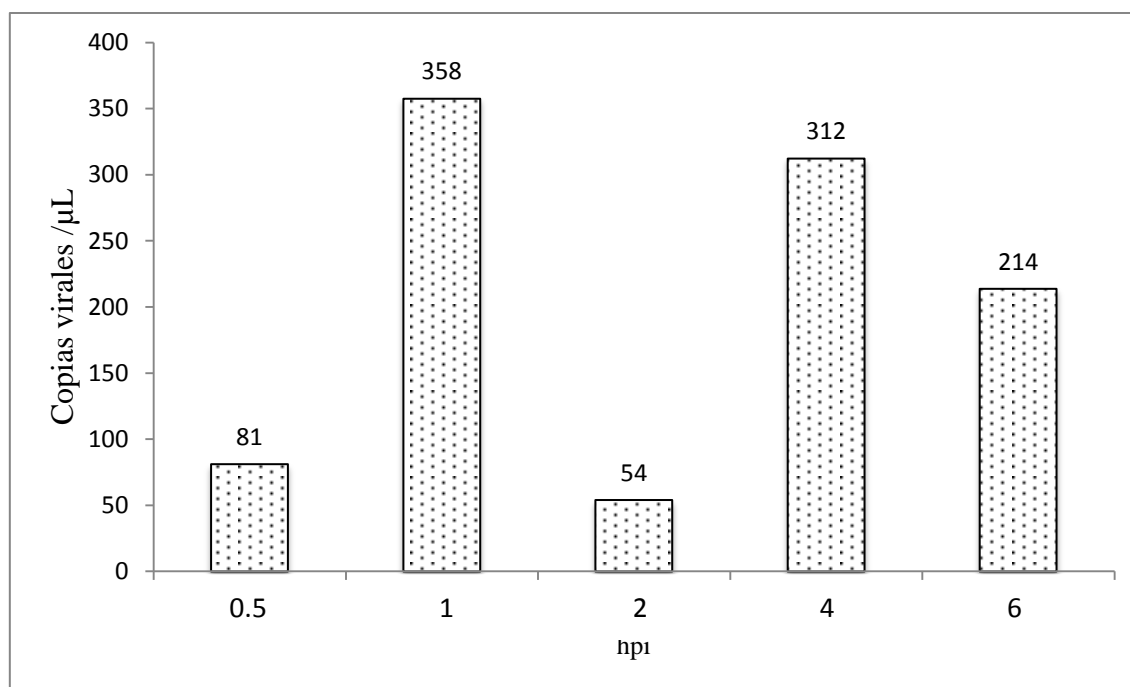


Figura 13. Promedio del número de copias virales/ μL de ARN para los diferentes tiempos de infección.

El punto de detección de fluorescencia o CT promedio de los diferentes tiempos fue de 29.9 a las 0.5 hpi, 29.9 a las 1 hpi, 28.3 a las 2 hpi, 30.4 a las 4 hpi y 28.4 a las 6 hpi. En comparación con el CT del control positivo utilizado que fue de 28.9.

Utilizando esta metodología se analizaron adicionalmente, muestras de camarón café (*F. californiensis*) y langosta espinuda (*P. interruptus*). Las curvas de disociación de RT-PCR resultantes indicaron amplificaciones de productos del gen IE de WSSV demostrado por comparación con el control positivo, sin detectarse amplificación en las células controles ni en el control negativo. En la comparación con la curva estándar de 600 (1), 60 (2) y 6 (3) copias/ μL se encontraron valores de concentración 21.6 para langosta y 102 copias para camarón café; a excepción de los controles de hemocitos y del negativo en donde no se obtuvieron cuantificaciones (Figs. 14 y 15).

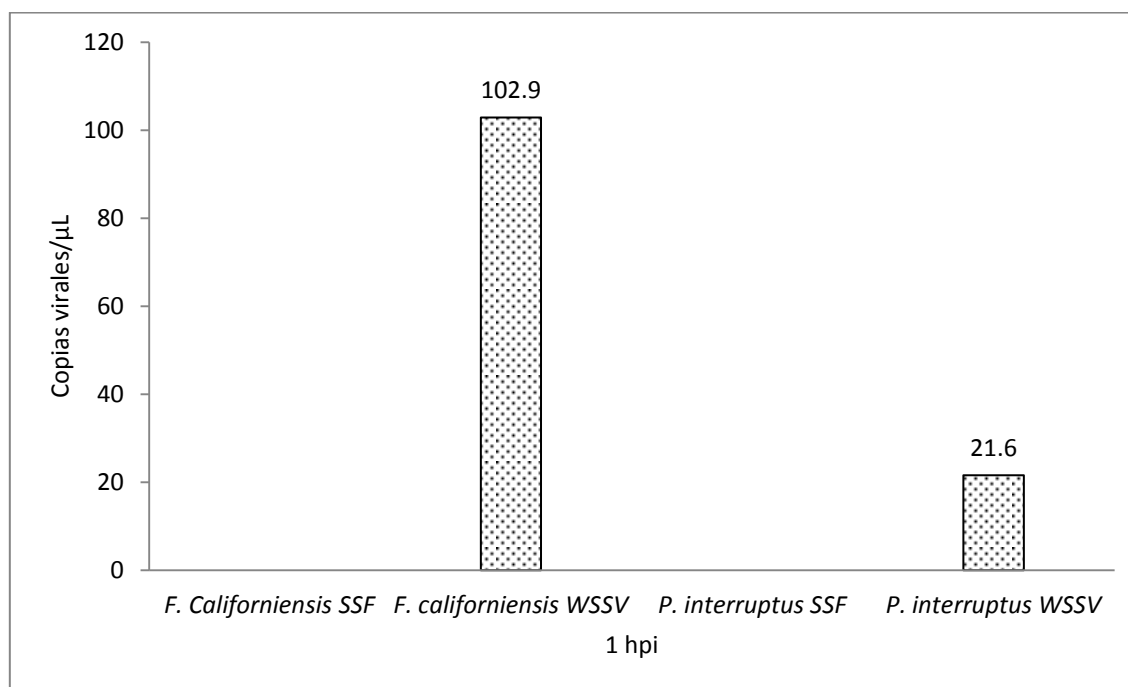


Figura 14. Número de copias virales en la infección *in vitro* de hemocitos de camarón café *F. californiensis* y langosta espinuda *P. interruptus*. SSF=solución salina fisiológica.

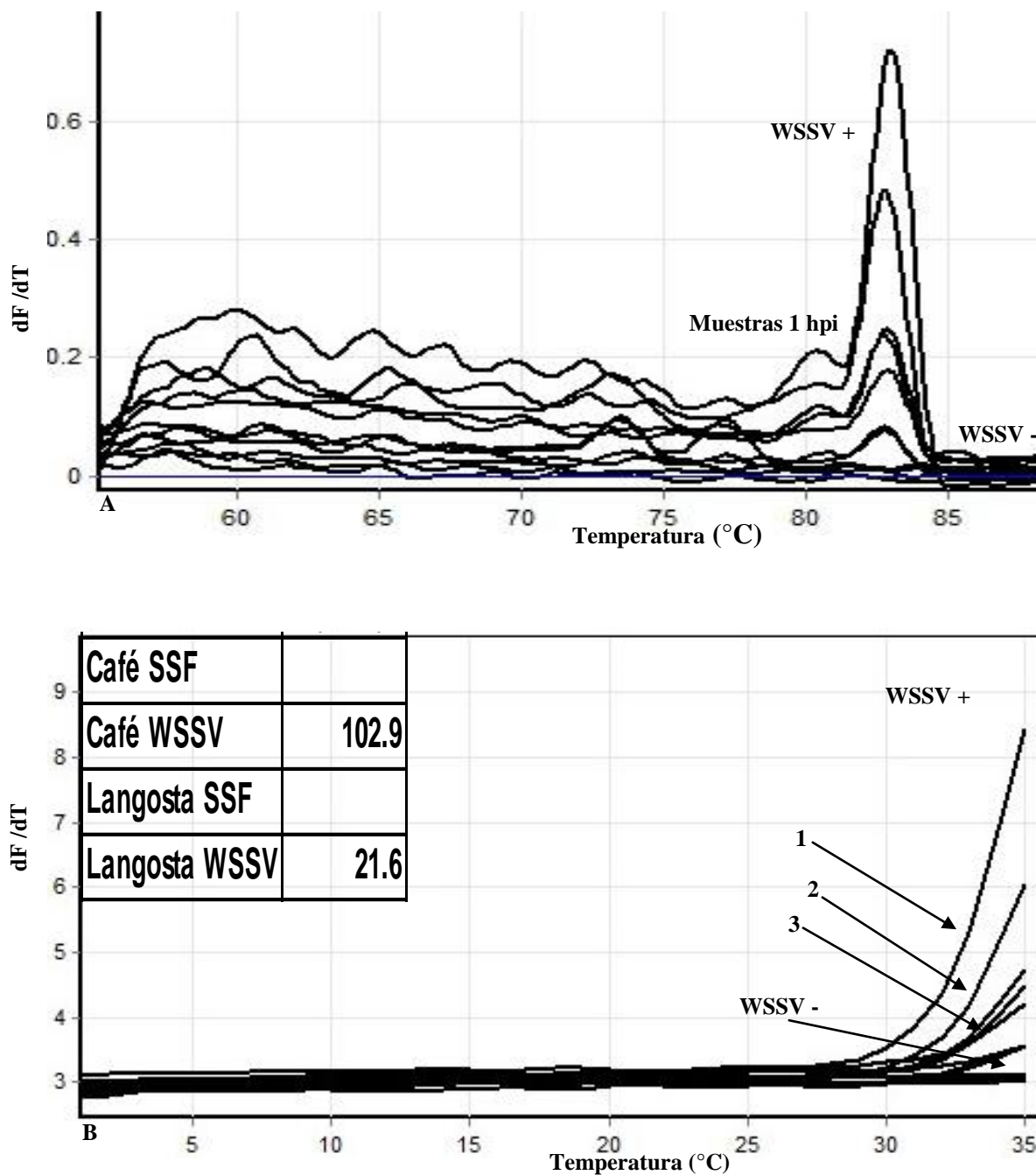


Figura 15. (A) Curva de disociación de los productos formados durante la amplificación de las muestras de *F. californiensis* y *P. interruptus* con carga viral. (B) Cuantificación de la carga viral mediante la detección de fluorescencia de las muestras de *F. californiensis* y *P. interruptus*. 1: 6 copias/ μ L, 2: 60 copias/ μ L y 3: 6 copias/ μ L de WSSV.

3. Infección de poblaciones separadas de hemocitos de organismos vivos de camarón blanco.

La cuenta promedio de hemocitos de camarones infectados e incubados a diferentes tiempos y separados por gradiente de Percoll™ se muestra en las figuras 16, 17 y 18. En general se obtuvieron hemocitos viables en todos los tiempos. Las cuentas celulares totales fueron de 1.3×10^5 hialinos, 6.2×10^5 semi-granulares y 6.7×10^5 granulares a las 0 hpi; 2.22×10^5 hialinos, 8.80×10^5 semi-granulares, 7.50×10^5 granulares a las 1 hpi; y finalmente de 8.54×10^5 hialinos, 6.70×10^5 semi-granulares y 12.9×10^5 granulares.

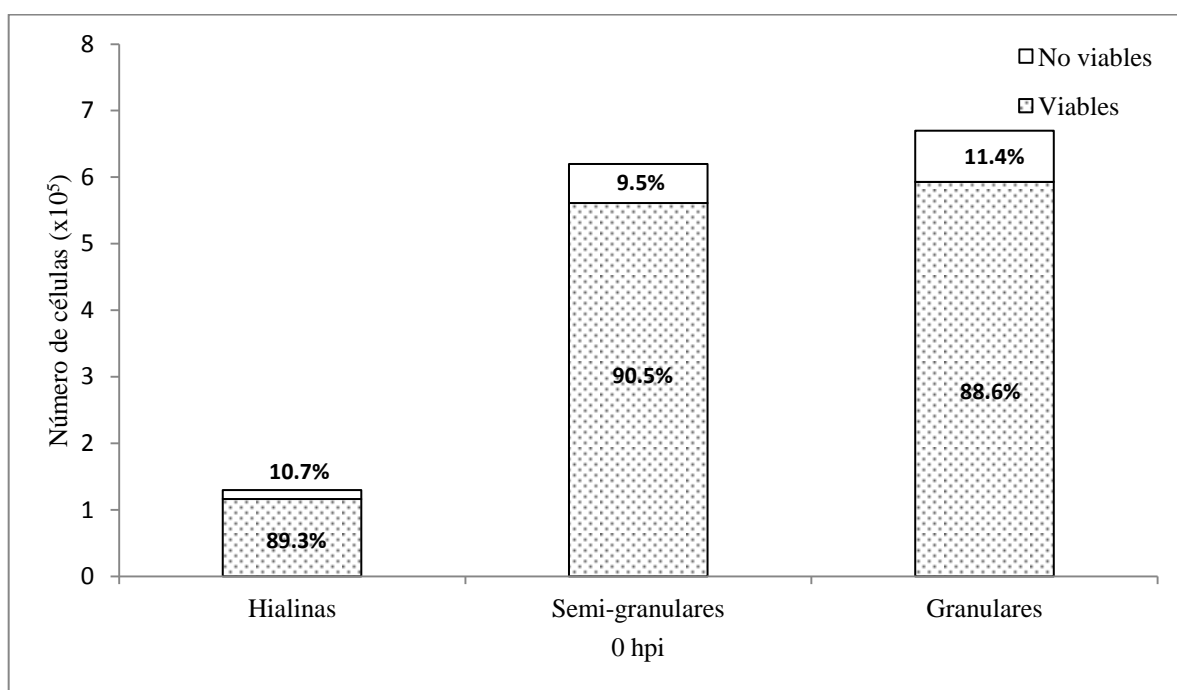


Figura 16. Cuenta promedio de hemocitos separados por poblaciones de camarones infectados al tiempo 0 hpi.

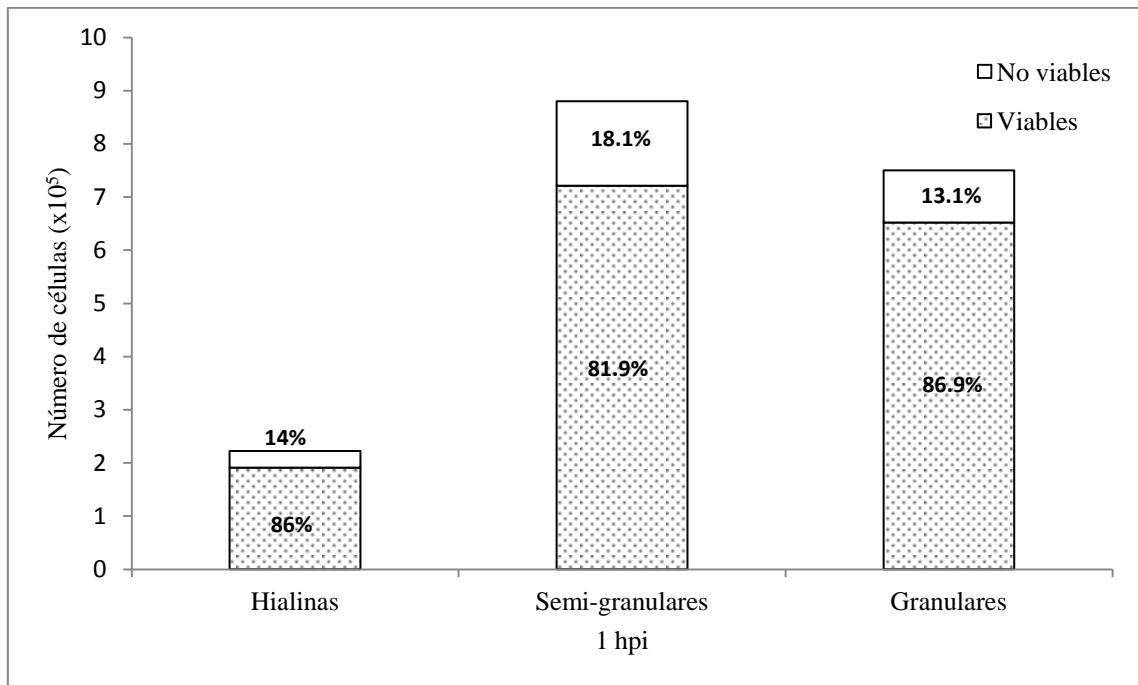


Figura 17. Cuenta promedio de hemocitos separados por poblaciones de camarones infectados al tiempo 1 hpi.

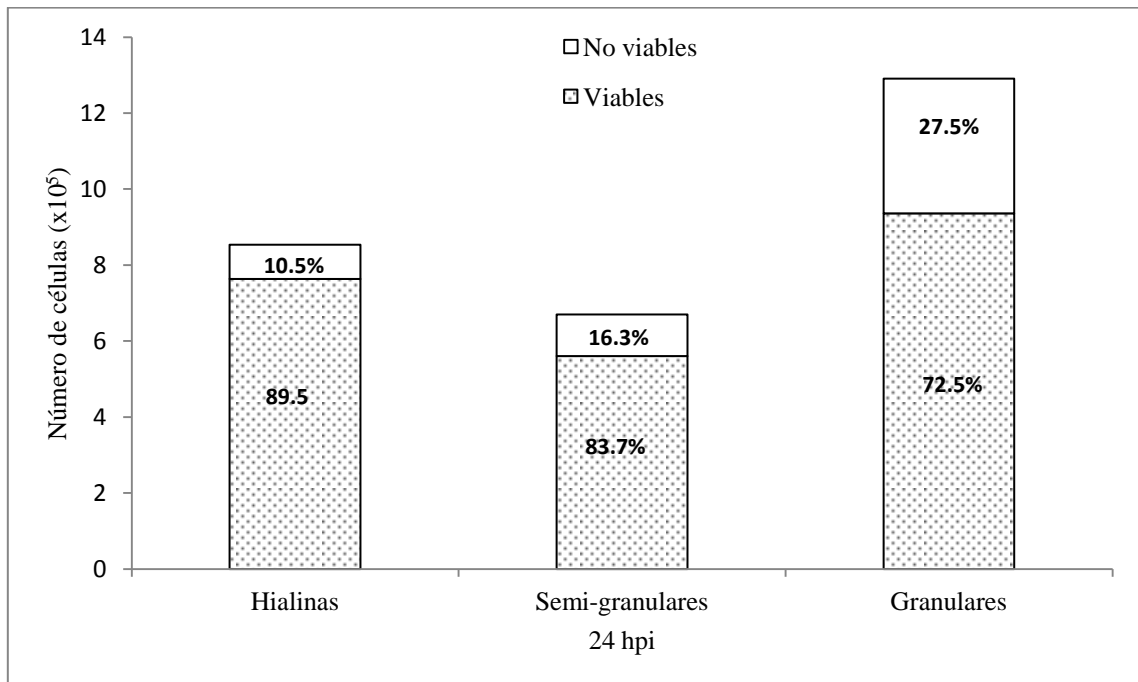


Figura 18. Cuenta promedio de hemocitos separados por poblaciones de camarones infectados al tiempo 24 hpi.

La cantidad promedio de ARN total extraído y ajustado fue: 0 hpi con 101.24 ng/ μ L, 1 hpi con 99.78 ng/ μ L y de ADN de 24 hpi con 100.01 ng/ μ L con un índice A260/280 de 1.8 para todas las muestras con una desviación estándar de 0.78.

La curva de disociación de las muestras de ARN ajustadas y sometidas a qPCR de las 24 hpi, no mostró ninguna amplificación de productos formados, a excepción del control positivo, por lo que se confirma que no existía contaminación con ADN (Fig 19).

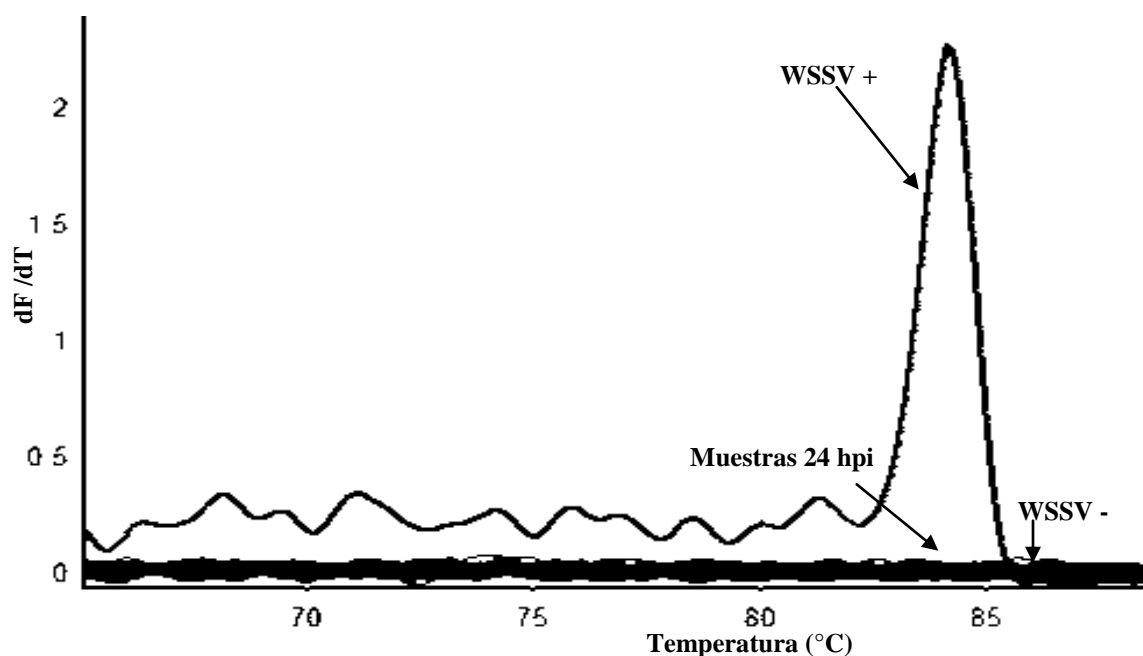


Figura 19. Curva de disociación de los productos formados durante la amplificación de las muestras de ARN de hemocitos del tiempo 24 hpi.

Las curvas de disociación muestran los resultados de RT-PCR y qPCR de las muestras tomadas una vez cumplidas las diferentes horas post-inoculación; en ellas se aprecian amplificaciones de productos de WSSV, demostrado por comparación con el control positivo. Se puede observar que no hay detección de amplificación en ninguna de las muestras de los hemocitos separados de los tiempos 0 y 1 h por RT-PCR (Fig. 20), únicamente la hay en el control positivo.

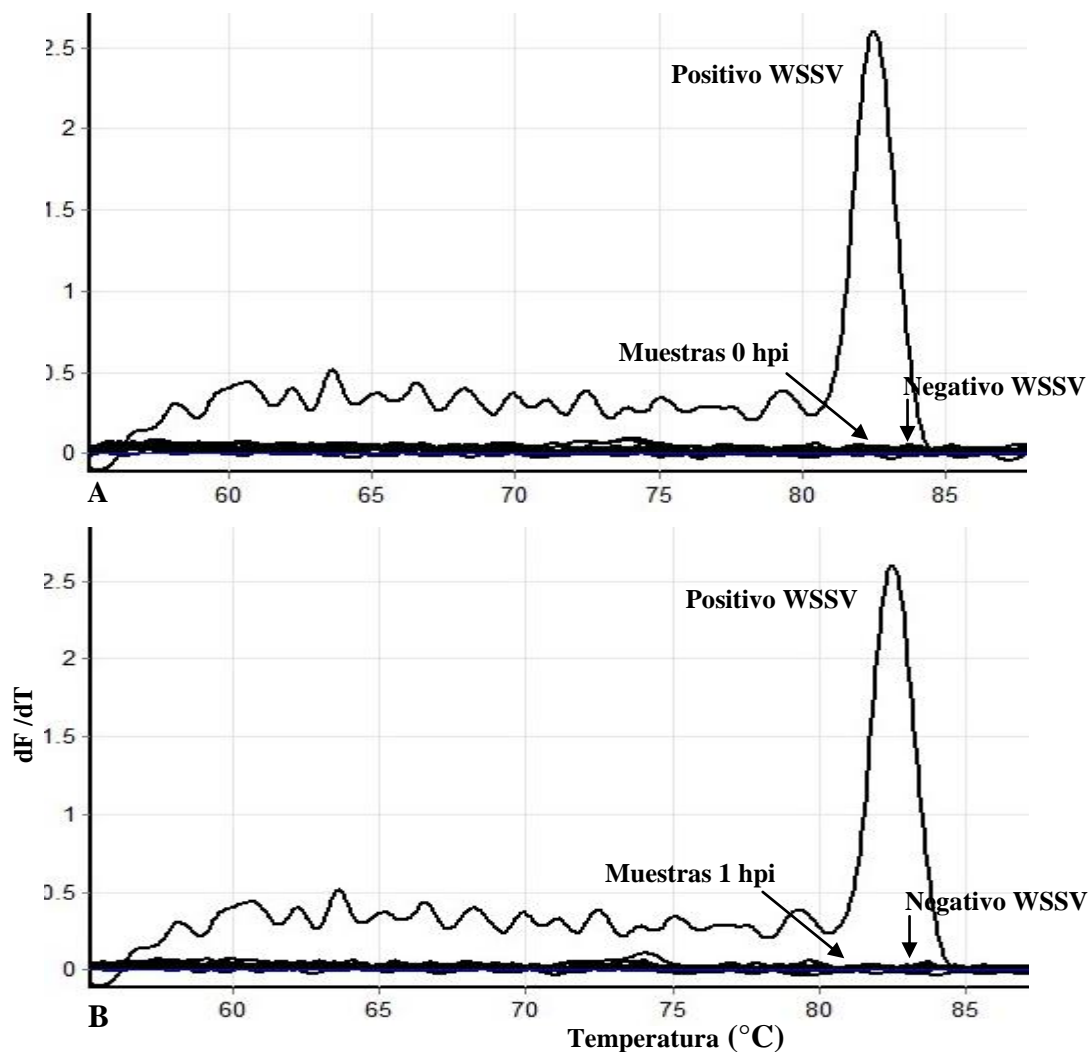


Figura 20. Curva de disociación de los productos formados durante la amplificación de las muestras de hemocitos separados del tiempo 0 (A) y 1 (B) hpi.

En el tiempo 24 hpi, se detecta la amplificación en las muestras de hemocitos semi-granulares y granulares por medio de qPCR. Las muestras de hemocitos hialinos, las del organismo inoculado con SSF y del control negativo no mostraron amplificación. También se aprecian los resultados de todas las muestras por poblaciones comparadas con una curva estándar de 600 (1), 60 (2) y 6 (3) copias/ μ L. Al calcular la carga viral de las muestras se encontraron valores de 0 copias para los hialinos, 6937.8 copias para los semi-granulares y 2233.9 copias para los granulares (Figs. 21 y 22); a excepción de los controles negativos en donde el valor de copias virales fue de cero (Fig. 23).

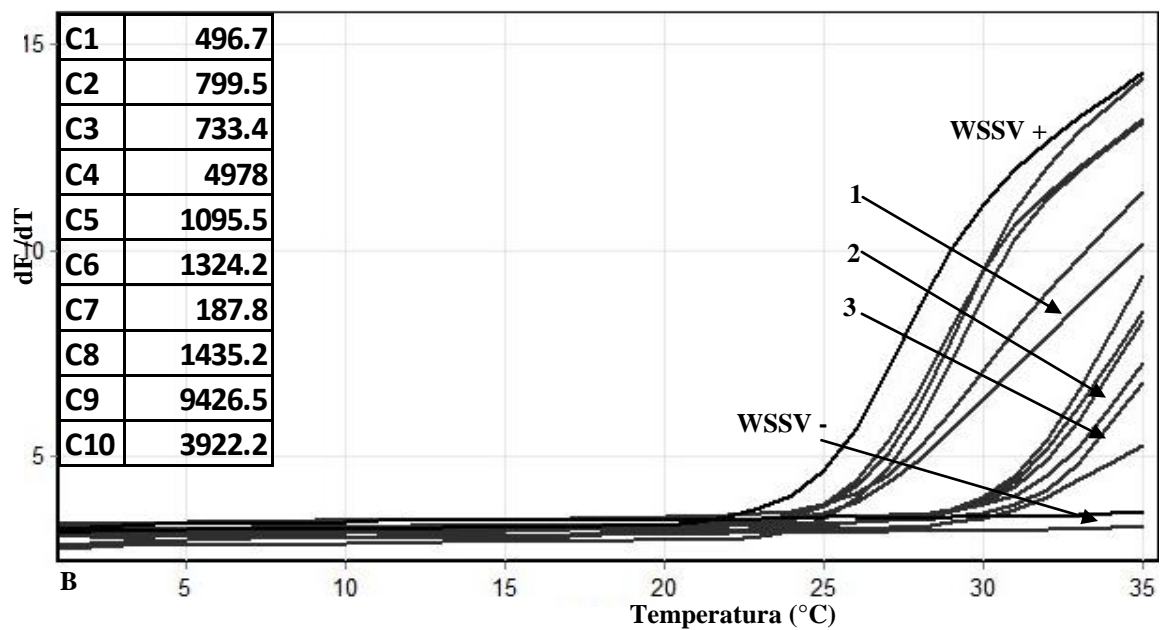
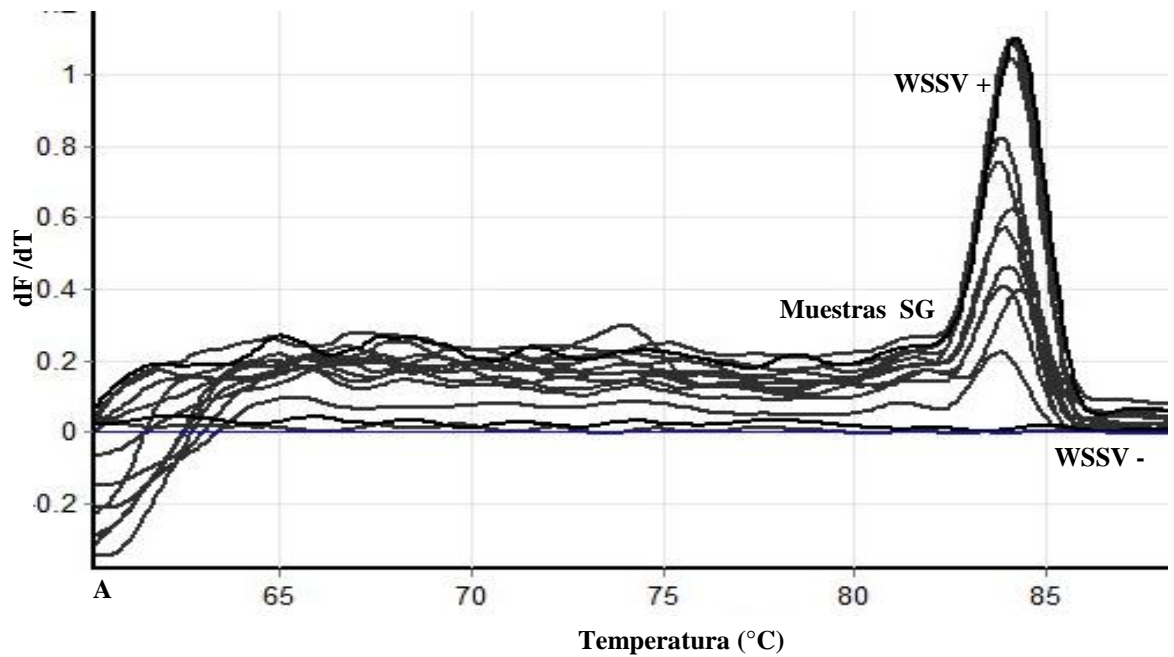


Figura 21. (A) Curva de disociación de los productos formados durante la amplificación de las muestras de hemocitos semi-granulares (SG) de las 24 hpi. (B) Cuantificación de la carga viral mediante la detección de fluorescencia de las muestras de hemocitos semi-granulares de las 24 hpi. 1: 600 copias/ μ L, 2: 60 copias/ μ L y 3: 6 copias/ μ L de WSSV.

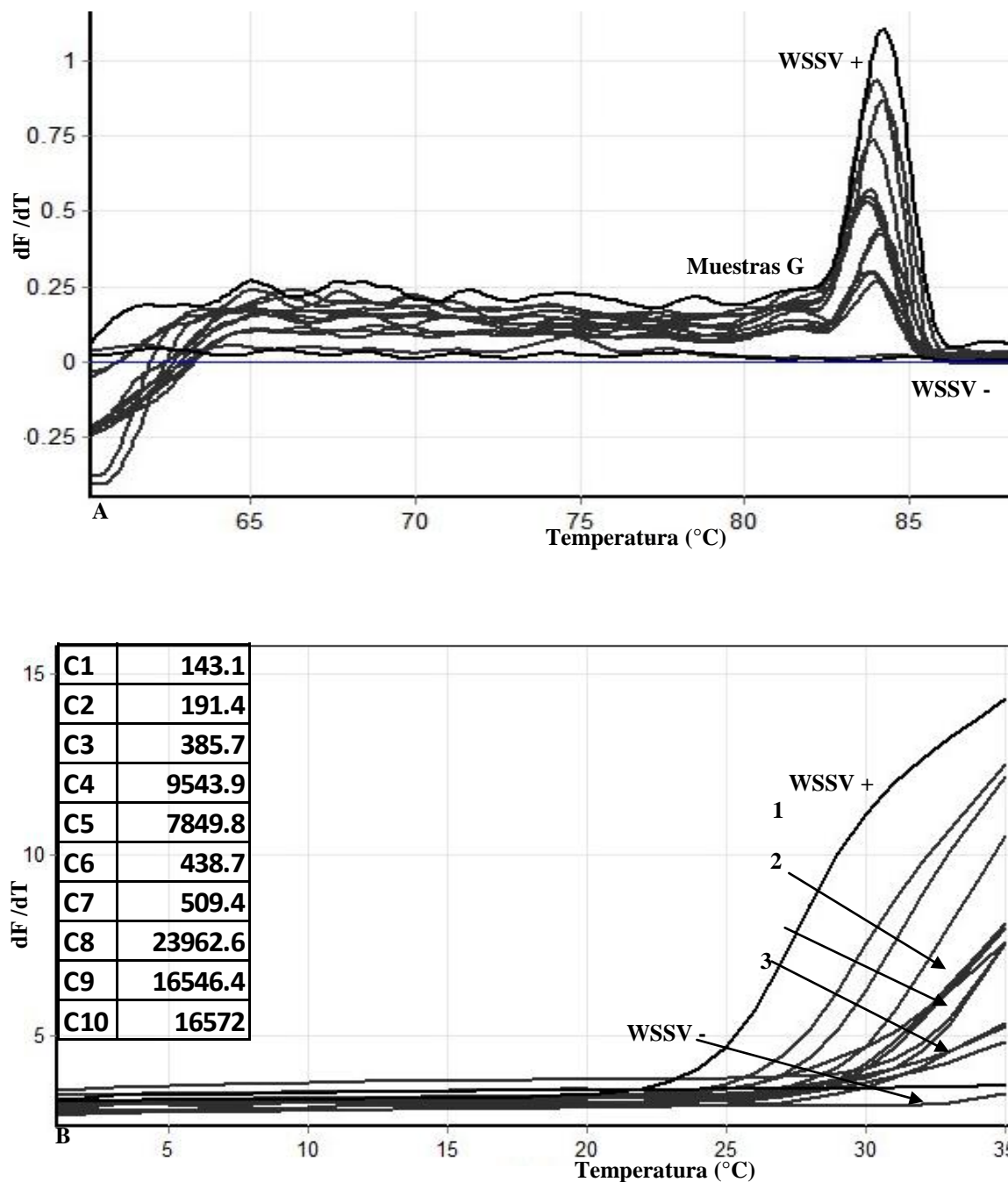


Figura 22. (A) Curva de disociación de los productos formados durante la amplificación de las muestras de hemocitos granulares (G) de las 24 hpi. (B) Cuantificación de la carga viral mediante la detección de fluorescencia de las muestras de hemocitos granulares de las 24 hpi. 1: 600 copias/ μ L, 2: 60 copias/ μ L y 3: 6 copias/ μ L de WSSV.

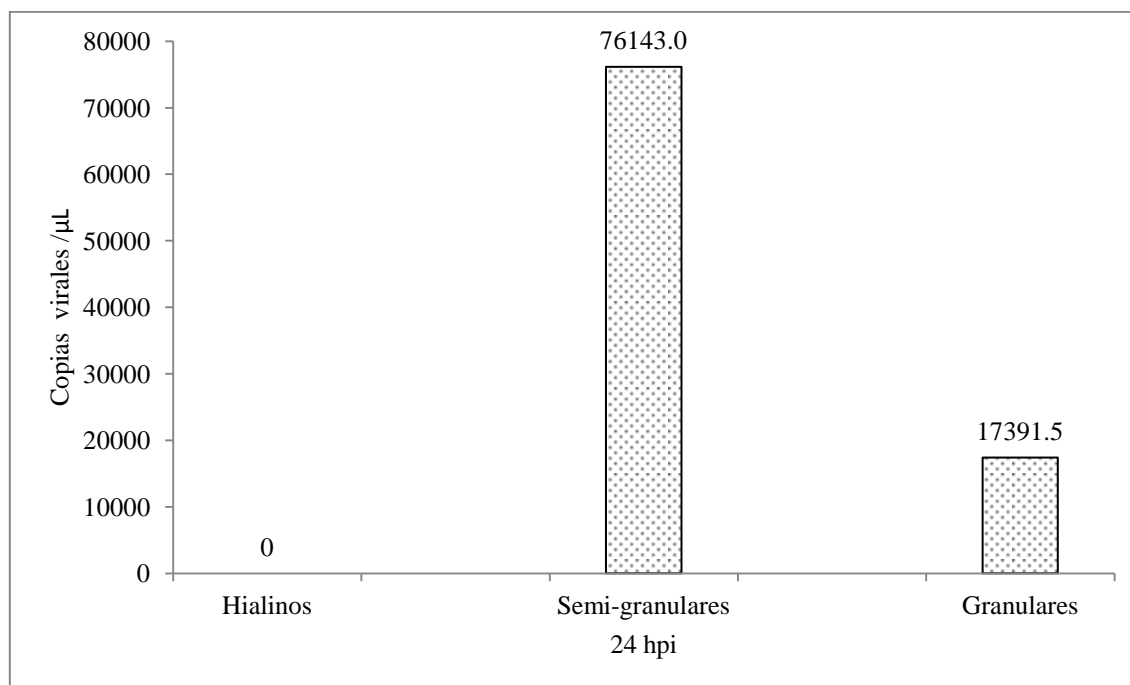


Figura 23. Promedio del número de copias virales/ μL para las diferentes poblaciones de hemocitos del tiempo 24 hpi.

4. Análisis mediante la técnica de citometría de flujo

Los dos citogramas obtenidos de un organismo inoculado con SSF como control negativo, en comparación con un organismo inoculado con 60,000 copias virales de WSSV a las 24 hpi se muestran en la figura 24, apreciándose el desplazamiento de las células en cuanto a complejidad (SSC-A); resultados similares se obtuvieron en la totalidad de organismos infectados y analizados.

En la figura 25 se presenta el citograma obtenido del control de viabilidad a partir de hemolinfa de un organismo sano obtenida con formaldehído al 4% en donde se aprecian la mayoría de las células muertas.

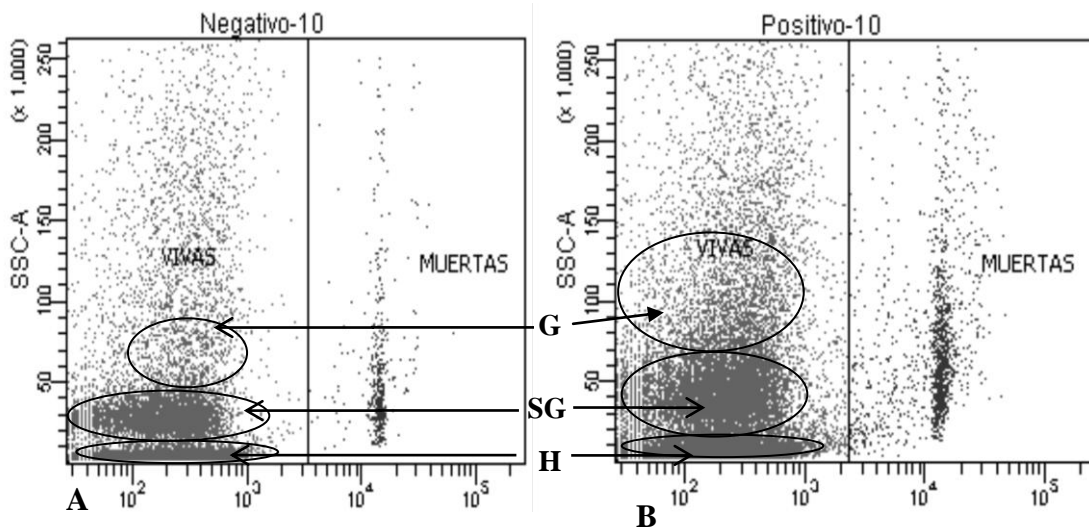


Figura 24. Citograma (A), muestra la distribución de hemocitos de un camarón negativo a WSSV; Citograma (B), muestra la distribución de hemocitos de un camarón infectado con WSSV. G=Granulares; SG= Semi-granulares; H=Hialinos.

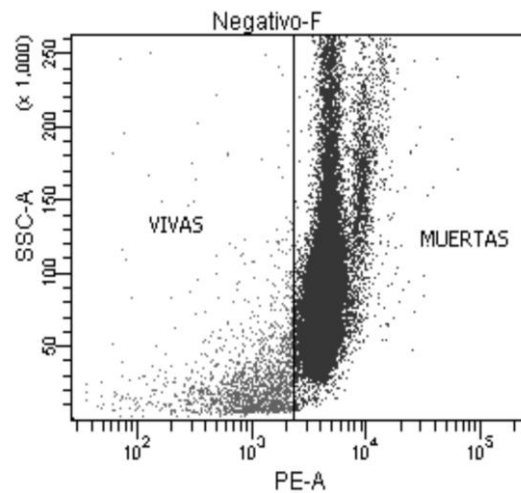


Figura 25. Citograma que muestra el control de viabilidad de hemocitos obtenidos con formaldehído al 4%.

DISCUSIÓN

Los invertebrados marinos se encuentran en constante relación dentro de su medio natural con una gran diversidad de microorganismos; estos incluyen numerosos tipos de virus que pueden constituir una seria amenaza a su sobrevivencia. No obstante, el evidente éxito que ha tenido este grupo zoológico a lo largo de más de 500 millones de años de historia evolutiva, confirma la presencia de un sistema inmunológico eficiente y capaz de protegerlos contra la invasión de los agentes causantes de enfermedades (Barracco *et al.*, 2008).

El hepatopáncreas y los hemocitos son los principales tejidos involucrados en la respuesta inmunológica de los crustáceos (Gross *et al.*, 2001; Jiravanichpaisal *et al.*, 2006a). Los hemocitos en especial tiene una participación importante en la defensa ante patógenos como los virus (Jiravanichpaisal *et al.*, 2006a).

Se ha reportado que WSSV infecta principalmente células de tejidos de origen ectodérmico y mesodérmico (Wongteerasupaya *et al.*, 1995), mientras que los tejidos de origen endodérmico son refractarios a su infección (Wang *et al.*, 1999). Sin embargo, camarones infectados con WSSV por vía oral mostraron que una vez que el virus ha cruzado la membrana basal del tracto digestivo, los viriones se hacen presentes en las diferentes etapas de la morfogénesis, en el núcleo de hemocitos circulantes, lo que sugiere que la replicación viral debe estar ocurriendo en este tipo de células. Por lo tanto, los hemocitos son utilizados en beneficio de la infección como un rápido dispersor de viriones hacia todos los tejidos (Di Leonardo *et al.*, 2005).

En este trabajo se analizó la capacidad del WSSV para infectar hemocitos de camarón blanco, y la cronología de la infección experimental *in vivo* e *in vitro*. Los resultados de este estudio mostraron que los hemocitos de camarón blanco se infectan con el virus del WSS aislado, tanto en condiciones *in vivo* como *in vitro*. Estos resultados proporcionan evidencia del tropismo que muestra el virus por estas células, aunado a lo encontrado por Jiravanichpaisal *et al.* (2006b), quienes demostraron una infección con el virus en tejido hematopoyético del cangrejo *Pacifastacus leniusculus* y a los resultados de

Wang *et al.* (2002) quienes lo hicieron en hemocitos de *P. merguensis*, confirmando que los hemocitos de *L. vannamei* son las células blanco del WSSV.

En la infección experimental *in vivo* que se realizó en este estudio, se encontró que en las poblaciones aisladas de hemocitos, el tiempo de infección con WSSV fue de 24 h. Este dato no concuerda con el diagnóstico por cambios morfológicos o expresión de genes tempranos de WSSV que se ha reportado después de dos horas (Li *et al.*, 2007), cuatro horas (Tsai *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2004; Liu y Yang, 2005; Han *et al.*, 2007) y seis horas (Chen *et al.*, 2002; Wongprasert *et al.*, 2003; Lan *et al.*, 2006); sin embargo, en este caso el tiempo más corto de muestreo se llevó a cabo después de una hora post-infección.

En los últimos años, se han hecho numerosos intentos por cultivar los hemocitos de camarón y otras especies de crustáceos con la finalidad de poder ser usados como modelos experimentales para estudiar principalmente infecciones causadas por virus y bacterias (Jiravanichpaisal *et al.*, 2006; Li y Shields, 2007; Andrade, 2011). En este trabajo se realizó una infección experimental *in vitro* con WSSV aislado, utilizando hemocitos sin ningún medio de cultivo; lo anterior se logró manteniéndolos en solución isotónica de camarón (Vargas Albores *et al.*, 1993). Ésta es una suspensión que proporciona condiciones adecuadas para el mantenimiento de las células por periodos cortos de tiempo. De esta manera es posible exponer a los hemocitos a un purificado de WSSV muy efectivo, que además se puede preparar de forma relativamente sencilla y con la suficiente cantidad de viriones íntegros para infectar organismos tal como lo reporta Gracia *et al.* (2009) y, en el caso de este estudio hemocitos. Los resultados obtenidos en este ensayo mostraron una infección favorable, al medirse la replicación del virus en los hemocitos por la detección de mensajes del WSSV mediante la técnica de RT-PCR desde los primeros 30 minutos post-infección y aumentando de manera drástica en una hora post-infección, pudiendo ser este el tiempo más significativo y el que puede generar más información sobre la rapidez con que el virus infecta a las células. Lo anterior confirma la hipótesis que se planteó para este estudio y, a diferencia del resultado de la infección *in vivo*, concuerda son los tiempos de infección reportados después de dos horas (Li *et al.*, 2007), cuatro horas (Tsai *et al.*, 2000;

Li *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2004; Liu y Yang, 2005; Han *et al.*, 2007) y seis horas (Chen *et al.*, 2002; Wongprasert *et al.*, 2003; Lan *et al.*, 2006). Estos resultados son innovadores ya que no existen reportes de infecciones realizadas sin utilizar medios especiales para esta línea celular. La infección lograda en los ensayos demuestra que no hay necesidad de utilizar medios de cultivo complejos para reproducir la infección por WSSV en hemocitos fuera del camarón para el estudio de las etapas tempranas de este proceso.

Otro dato importante de señalar es que, durante las dos primeras hpi en esta prueba, se obtuvieron porcentajes de viabilidad celular altos, y no fue sino hasta las cuatro horas después de inocular que estos porcentajes comenzaron a disminuir drásticamente. Esto puede ser atribuido a tres factores; primero, a que la solución en que las células se encontraban suspendidas comenzara a ser insuficiente; segundo a la apoptosis de las células inducida como mecanismo de defensa del organismo al detectar el virus (Flegel y Pasharawipas, 1998; Khanobdee *et al.*, 2002; Rojtinnakorn *et al.*, 2002), y tercero a la propia infección provocando lisis celular como parte de la falla generalizada por las que los organismos con WSSV mueren.

El conocimiento de la gama de huéspedes de WSSV es una tarea importante porque podría ayudar a prevenir o restringir su propagación, así como a evaluar su impacto a las poblaciones silvestres. Una característica de WSSV es el amplio rango de hospederos potenciales que tiene. Hasta la fecha, más de 95 especies de artrópodos se han reportado como huéspedes o portadores de WSSV por infección natural o experimental (Flegel, 1997; Wang *et al.*, 1999b; Vanpatten *et al.*, 2004; Yan *et al.*, 2004; Vijayan *et al.*, 2005; Sánchez-Paz, 2010; Terán-Díaz, 2012). Conociendo lo anterior, se realizó un ensayo con dos hospederos diferentes a camarón blanco, para comprobar la infección con WSSV *in vitro*. Se utilizaron hemocitos de dos especies aún no reportadas como susceptibles a WSSV camarón café (*Farfantepenaeus californiensis*) y langosta espinuda (*Panulirus interruptus*). Los resultados mostraron que también los hemocitos de *F. californiensis* y *P. interruptus* se infectan con el inóculo de WSSV. Esto confirma la diversidad de hospederos susceptibles al virus, agregando a ese numeroso grupo, dos especies de crustáceos más, pero también valida la metodología desarrollada en este trabajo sobre la infección experimental *in vitro*

de hemocitos de crustáceos. Otro aspecto es que este medio de soporte temporal pudiera llegar a emplearse como una prueba de susceptibilidad de poblaciones diferentes de camarones buscando familias que puedan resistir los embates del virus en programas de selección genética.

También se ha reportado que WSSV infecta tipos específicos de células en el tejido hematopoyético, de las cuales las células semi-granulares parecen ser más propensas a ser infectadas. De los diferentes tipos de hemocitos encontrados en los camarones, las células semi-granulares (SGC), que comprenden la mayor sub-población, son más vulnerables a ser infectados por WSSV que las células granulares (Sánchez-Paz, 2010). Por su parte, Wang *et al.* (2002) encontraron que los hemocitos hialinos muestran resistencia a la infección por el virus.

Cuando analizamos poblaciones separadas de hemocitos no se encontró evidencia del virus en las células hialinas al cuantificar su carga viral, mientras que las semi-granulares fueron las que mostraron una mayor carga, seguidas por las células granulares. Lo anterior confirma los resultados de los trabajos de Wang *et al.* (2002) y Jiravanichpaisal *et al.* (2006b), quienes reportaron la posibilidad de que el WSSV infecte tanto a los hemocitos granulares como a los semi-granulares, y que en éstos últimos existe una mayor carga viral además de presentar una infección más rápida, siendo más susceptibles a la infección por el virus que los de tipo granular.

Por otro lado, la citometría de flujo a pesar de no ser una metodología muy utilizada aún para estudios de infección por WSSV, es una técnica que puede ser interesante para estudios sobre la evolución de infecciones experimentales e incluso, como método de diagnóstico. En este trabajo se ensayó la posibilidad de detección de hemocitos infectados utilizando citometría de flujo con la ventaja de no requerir de anticuerpos marcados, sino únicamente detectando el cambio de complejidad celular que genera la replicación viral en el interior de la célula.

En los ensayos con citometría de flujo se observaron cambios en las células infectadas de manera muy clara por la distribución diferente en el citograma del organismo infectado con WSSV 24 horas antes y el organismo control. Estos cambios en la célula

infectada pueden estar relacionados por ejemplo: (1) a la formación de membranas de novo en el nucleoplasma cuando la infección comienza (Jiravanichpaisal *et al.*, 2006b); (2) a que el virus se replica en el núcleo de las células infectadas (Durand *et al.*, 1997) creando cuerpos de inclusión intranucleares en células de la hemolinfa (Ligthner *et al.*, 1998; Sahul-Hameed *et al.*, 2000); (3) a la necrosis generalizada y presencia de células con picnosis y cariorrexis nuclear (Pantoja y Ligthner, 2003; Rodríguez *et al.*, 2003); (4) al aumento de células apoptóticas en los hemocitos de animales infectados, (Flegel y Pasharawipas, 1998; Khanobdee *et al.*, 2002; Rojtinnakorn *et al.*, 2002).

En resumen, los resultados obtenidos permitieron aceptar nuestra hipótesis con lo que se logró demostrar que los hemocitos del camarón blanco pueden infectarse con WSSV en tiempos tan cortos como 0.5 horas, y que los granulares son los más susceptibles a la infección. Lo anterior se logró realizando una infección *in vitro* mediante una técnica que no requiere de equipo sofisticado ni medios de cultivo complejos, la solución isotónica para camarón.

CONCLUSIONES

Se determinó que los hemocitos del camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) son las células blanco del Virus del Síndrome de la Mancha Blanca (WSSV), que el tiempo en que el virus infecta a estas células puede ser tan corto como 30 minutos, y que existe diferencia en el grado de infección entre las diferentes poblaciones de hemocitos; son los hemocitos granulares y semigranulares los que presentan una mayor carga viral a diferencia de los hialinos en donde no se detecta carga viral alguna. Se demostró además que el mantenimiento *in vitro* de hemocitos en solución isotónica de camarón es útil para realizar pruebas de infección para este virus en esta y otras especies de crustáceos, y que la citometría de flujo puede ser usada para estudiar la evolución de infecciones experimentales así como un método de diagnóstico.

Sin ser el objetivo principal de este trabajo, se encontró también que a la amplia gama de hospederos del virus, se agregan dos especies de crustáceos que habitan en el Golfo de California, susceptibles a la enfermedad *F. californiensis* y *P. interruptus*.

RECOMENDACIONES

1. Infección *in vitro*

- * Realizar mediciones de componentes del sistema inmunológico del camarón como el sistema profenol-oxidasa, para complementar el análisis de la dinámica de infección del virus en tiempos cortos.
- * Aplicar la técnica de infección *in vitro* en hemocitos mantenidos en SIC para confirmar la viabilidad de aislados del virus.
- * Realizar análisis estadísticos entre los diferentes tiempos de infección para determinar el tiempo más significativo en cuanto a infección.

2. Citometría de flujo

- * Evaluar los cambios de complejidad en poblaciones separadas de hemocitos para determinar si existen diferencias de complejidad entre poblaciones.
- * Utilizar la técnica para definir la clasificación de los diferentes tipos de hemocitos.

BIBLIOGRAFÍA

- Andrade, J.A. 2011. Shrimp immunological reactions against WSSV: role of haemocytes on WSSV fate. Tesis de Maestría. Faculty of Bioscience Engineering. Universidad de Gent, Bélgica. 60 p.
- Anggraeni, M.S. y L. Owens. 2000. The haemocytic origin of lymphoid organ spheroid cells in the penaeid prawn *Penaeus monodon*. Diseases of Aquatic Organisms 40: 85-92.
- Bachère, E., E. Mialhe, J. Rodríguez. 1995. Identification of defense effectors in the haemolymph of Crustacean with particular reference to the shrimp *Penaeus japonicus* (Bate): prospects and application. Fish & Shellfish Immunology 5: 597-612.
- Barrocco, M.A., L.M. Perazzolo, R.D. Rosa. 2008. Inmunología del camarón. En Morales V. y J. Cuéllar-Anjel. Patología e Inmunología de camarones peneidos. Capítulo 6.
- Bonami, J.R., D.V. Lightner, R.M. Redman, B.T. Poulos. 1992. Partial characterization of a Togavirus (LOVV) associated with histopathological changes of the lymphoid organ of penaeid shrimp. Diseases of Aquatic Organisms 14: 145-152.
- Cann, A.J. 1997. Principles of Molecular Virology. Elsevier 4th Edition. United Kingdom. 315 p.
- Cavalli, S.L., L.F. Marín, S. Netto, P.C. Abreu. 2008. Evaluation of White Spot Syndrome Virus (WSSV) in wild shrimp after a major outbreak in shrimp farms at laguna, Southern, Brazil. Atlántica, Rio Grande 30: 45-52.
- Chang, P.S., C.F. Lo, Y.C. Wang, G.H. Kou. 1996. Identification of white spot syndrome associated baculovirus (WSBV) target organs in the shrimp *Penaeus monodon* by in situ hybridization. Diseases of Aquatic Organisms 27: 131-139.
- Chen, L.L., H.C. Wang, C.J. Huang, S.E. Peng, Y.G. Chen, S.J. Lin. 2002. Transcriptional analysis of the DNA polymerase gene of white shrimp syndrome virus. Virology 301: 136-147.

- Chomczynsky, P. y N. Sacchi. 1987. Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*. 162: 156-159.
- Clare, A.S. y G. Lumb. 1994. Identification of haemocytes and their role in clotting in the blue crab, *Callinectes sapidus*. *Marine Biology* 118: 601-610.
- Comité de Sanidad Acuícola del Estado de Sonora (COSAES). <http://www.cosaes.com/>. Accesado Noviembre de 2011.
- Corder, D.M. 1999. Assessment of Cell Viability. En: Robinson J.P., Darzynkiewicz Z., Dean P.N., Orfao A., Rabinovitch P., Stewart C.C., Tanke H.J, Wheelless L.L. *Current Protocols in Cytometry*. John Wiley & Sons, Inc. Capítulo 9.
- Di Leonardo, V.A., V. Bonnichon, P. Roch, N. Parrinello, J.R. Bonami. 2005. Comparative WSSV infection routes in shrimp genera *Marsupenaeus* and *Palaemon*. *Journal of Fish Diseases* 28: 565-569.
- Durand, S.V, D.V. Lightner, R.M. Redman, J.R. Bonami. 1997. Ultrastructure and morphogenesis of white spot syndrome baculovirus (WSSV). *Diseases of Aquatic Organisms* 29: 205-211.
- Durand, S.V. y D.V. Lightner. 2002. Quantitative real time PCR for the measurement of white spot syndrome virus in shrimp. *Journal of Fish Diseases* 25: 381-389.
- Escobedo-Bonilla, C.M., V. Alday-Sanz, M. Wille, P. Sorgeloos, M.B. Pensaert y H.J. Nauwynck. 2008. A review on the morphology, molecular characterization, morphogenesis and pathogenesis of white spot syndrome virus. *Journal of Fish Diseases*. 31: 1-18.
- Flegel, T.W. 1997. Special topic review, major viral diseases of the black tiger prawn *Penaeus monodon* in Thailand. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 13: 433-442.
- Flegel, T.W. y T. Pasharawipas. 1998. Active viral accommodation: A new concept for Crustacean Response to Viral Pathogens. In: Flegel, T.W. (Eds), *Advances in Shrimp*

- Biotechnology. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok, 245-250 pp.
- Galaviz-Silva, L., Z.J. Molina-Garza, J.M. Alcocer-Gonzalez, J.L. Rosales-Encinas, C. Ibarra-Gamez. 2004. White spot syndrome virus genetic variants detected in Mexico by a new multiplex PCR method. *Aquaculture* 242:53-68.
- Gracia, V.M., M.D. Coronado, L.J. Hernández y G.T. Gollas. 2009. A simple method for purifying the White Spot Syndrome Virus using ultrafiltration. *Aquaculture Research* 40: 737-743.
- Granja, C.B., L.F. Aranguren, O.M. Vidal, L. Aragón, M. Salazar. 2003. Does hyperthermia increase apoptosis in white spot syndrome virus (WSSV)-infected *Litopenaeus vannamei*. *Diseases of Aquatic Organisms* 54: 73-78.
- Gross, PS, T.C. Bartlett, C.L. Browdy, R.W. Chapman, G.W. Warr. 2001. Immune gene discovery by expressed sequence tag analysis of hemocytes and hepatopancreas in the Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*, and the Atlantic White Shrimp, *L. setiferus*. *Developmental and Comparative Immunology* 25: 565-577.
- Gollas-Galván, T., J. Hernández-López, F. Vargas-Albores. 1997. Effect of the calcium on the prophenoloxidase system activation of the brown shrimp (*Penaeus californiensis*, Holmes). *Comparative Biochemistry and Physiology* 117: 419-425.
- Gollas-Galván, T., J. Hernández-López y F. Vargas-Albores. 1999. Prophenoloxidase from brown shrimp (*Penaeus californiensis*, Holmes) hemocytes. *Comparative Biochemistry and Physiology* 122: 77-82.
- Gollas-Galván, T.G., R. Sotelo-Mundo, G. Yepiz-Plascencia, R.C. Vargas, F. Vargas-Albores. 2003. Purification and characterization of $\alpha 2$ -macroglobulin from the white shrimp (*Penaeus vannamei*). *Comparative Biochemistry and Physiology* 134: 431-438.
- Han, F., J. Xu, X. Zhang. 2007. Characterization of an early gene (wsv477) from shrimp white spot syndrome virus (WSSV). *Virus Genes* 34: 193-198.

- Hernández-López, J. 2001. Diseño de técnicas para la cuantificación de moléculas plasmáticas de camarón. Tesis Doctoral. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. Sonora, México. 137 p.
- Hose, J.E., G.G. Martin, A.S. Gerard. 1990. A decapod hemocyte classification scheme integrating morphology, cytochemistry, and function. *Biological Bulletin, Marine Biological Laboratory* 178: 33-45.
- Holmblad, T., P.O. Thornqvist, K. Söderhäll, M.W. Johansson. 1997. Identification and cloning of an integrin b subunit from hemocytes of the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *Journal of Experimental Zoology* 277: 255-261.
- Huang, S., R.I. Endo, G.R. Nemerow. 1995. Upregulation of integrins avb3 and avb5 on human monocytes and T lymphocytes facilitates adenovirus-mediated gene delivery. *Journal of Virology* 69: 2257-2263.
- Huang C.H., L.R. Zhang, J.H. Zhang, L.H. Xiao, Q.J. Wu, D.H. Chen, J.K.K. Li. 2001. Purification and characterization of white spot syndrome virus (WSSV) produced in an alternate host: crayfish, *Cambarus clarkia*. *Virus Research* 76:115-125.
- Huang, C., X. Zhang, Q. Lin, X. Xu, Z. Hu, C.L. Hew. 2002. Proteomic analysis of shrimp white spot syndrome viral proteins and characterization of a novel envelope protein VP466. *Molecular Cellular Proteomics* 1: 223-231.
- Jiravanichpaisal, P., K. Söderhäll, I. Söderhäll. 2006a. Characterization of white spot syndrome virus replication in in vitro-cultured haematopoietic stem cells of freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *Journal of General Virology* 87: 847-854.
- Jiravanichpaisal, P., S. Sricharoen, I. Söderhäll, K. Söderhäll. 2006b. White spot syndrome virus (WSSV) interaction with crayfish haemocytes. *Fish Shellfish Immunology* 20: 718-727.
- Johansson, M.W. y K. Söderhäll. 1989. Cellular immunity in Crustaceans and the proPO system. *Parasitology Today* 5: 171-176.

- Johansson, M.W., P. Keyser, K. Sritunyalucksana, K. Söderhäll. 2000. Crustacean haemocytes and haematopoiesis. *Aquaculture* 191: 45-52.
- Khanobdee, K., C. Soowannayan, T.W. Flegel, S. Ubol, B. Withyachumnarnkul. 2002. Evidence for apoptosis correlated with mortality in the giant black tiger shrimp *Penaeus monodon* infected with yellow head virus. *Diseases of Aquatic Organisms* 48: 79-90.
- Kim, Y.J., W.C. Choi, H.R. Kim, S.J. Jung, M.J. Oh. 1999. Changes in *Penaeus chinensis* haemocytes during white spot baculovirus (WSBV) infections. *Bulleting of the European Association of Fish Pathologists* 19: 213.
- Lan, Y., X. Xu, F. Yang, X. Zhang. 2006. Transcriptional profile of shrimp white spot syndrome virus (WSSV) genes with DNA microarray. *Archives of Virology* 151: 1723-1733.
- Lee, S.Y. y K. Söderhäll. 2002. Early events in crustacean innate immunity. *Fish Shellfish Immunology* 12: 37.
- Lee, Y.K., B.S. Soh, J.H. Wu. 2001. Quantitative assessment of phagocytic activity of Hemocytes in the Prawn, *Penaeus merguensis*, by flow cytometric analysis. *Cytometry* 43: 82-85.
- Leu, J.H., S.J. Lin, J.Y. Huang, T.C. Chen, C.F. Lo. 2012. A model for apoptotic interaction between white spot syndrome virus and shrimp. *Fish & Shellfish Immunology* In press 1-7.
- Li, Q., J. Zhang, Y. Chen, F. Yang. 2003. White spot syndrome virus (WSSV) infectivity for *Artemia* at different developmental stages. *Diseases of Aquatic Organisms* 57: 261-264.
- Li Q., D. Pan, J.H. Zhang, F. Yang. 2004. Identification of the thymidylate synthase within the genome of white spot syndrome virus. *Journal of General Virology*. 85: 2035-2044.
- Li, C. y J.V. Shields. 2007a. Primary culture of hemocytes from the Caribbean spiny lobster, *Panulirus argus*, and their susceptibility to *Panulirus argus* Virus 1 (PaV1). *Journal of Invertebrate Pathology* 94: 48-55.

- Li, Z., Q. Lin, J. Chen, J.L. Wu, T.W. Lim, S.S. Loh. 2007b. Shotgun identification of the structural proteome of shrimp white spot syndrome virus and iTRAQ differentiation of envelope and nucleocapsid subproteomes. *Molecular Cellular Proteomics* 6: 1609-1620.
- Liu, X., F. Yang F. 2005. Identification and function of a shrimp white spot syndrome virus (WSSV) gene that encodes a dUTPase. *Virus Research* 110: 21-30.
- Lightner, D.V. 1996. Handbook of pathology and diagnostic procedures for diseases of penaeid shrimp. World Aquaculture Society, Baton Rouge, L.A. EE.UU. 256 p.
- Lightner, D.V., K.W. Hasson, B.L. White, R.M. Redman. 1998. Experimental infection of Western hemisphere penaeid shrimp with asian white spot syndrome virus and Asian yellow head virus. *Aquatic Animal Health* 10: 271-281.
- Lots, J.M. y M.A. Soto. 2002. Model of white spot syndrome virus (WSSV) epidemics in *Litopenaeus vannamei*. *Diseases of Aquatic Organisms* 50: 199-209.
- Marks, H., R.W. Golodbach, J.M. Vlak, M.C. van Hulten. 2004. Genetic variation isolates of white spot syndrome virus. *Archives of Virology* 149: 673-693.
- Martin, G. y B. Graves. 1985. Fine structure and classification of shrimp hemocytes. *Journal of Morphology* 185: 339-348.
- Martin, G.G., J. Kay, D. Poole y C. Poole. 1998. In vitro nodule formation in the ridgeback prawn, *Syciona ingentis*, and the american lobster, *Homarus americanus*. *Invertebrate Zoology* 117: 155-168.
- Martorelli, S.R., M. Robin, J.A. Jovonovich. 2010. First report of viral pathogens WSSV and IHHNV in Argentine crustaceans. *Bulletin of Marine Science* 86: 117-131.
- Morales-Covarrubias, M. 2004. Enfermedades del camarón. Detección mediante análisis en fresco e histopatología. Editorial Trillas. México, D.F. 122 p.
- Muñoz, M., F. Vandenbulcke, D. Saulnier, E. Bachère. 2002. Expression and distribution of penaeidin antimicrobial peptides are regulated by haemocyte reactions in microbial challenge shrimp. *European Journal of Biochemical* 269: 2678-2689.

- Pantoja, C.R. y D.V. Lighner. 2003. Similarity between the histopathology of White Spot Syndrome Virus and Yellow Head Syndrome Virus and its relevance to diagnosis of YHV disease in the Americas. *Aquaculture* 218: 47-54.
- Plow, E.F., T.A. Haas, L. Zhang, J. Loftus, J.W. Smith. 2000. Ligand binding to integrins. *Journal of Biological Chemistry* 275: 21785-21788.
- Puerta, C.J. y C.P. Ureña. 2005. *Prácticas de Biología Molecular*. Editorial Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia. 104 p.
- Ratcliffe, N.A., A.F. Rowley, S.W. Fitzgerald y C.P. Rhodes. 1985. Invertebrate immunity: Basic concepts and recent advances. *International Review of Cytology* 97: 183-350.
- Robinson, J.P. 2004. *Multispectral cytometry: the next generation*. Biophotonics International. Elsevier. 387 p.
- Roch, P. 1999. Defense mechanisms and disease prevention in farmed marine invertebrates. *Aquaculture* 172: 125-145.
- Rodríguez, J., B. Bayot, Y. Amano, F. Panchana, I. de Blas, V. Alday, J. Calderón. 2003. White spot Syndrome virus infection in cultured *Penaeus vannamei* (Boone) in Ecuador with emphasis on histopathology and ultrastructure. *Journal of Fish Diseases* 26: 439-450.
- Rodríguez, 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.
- Rojtinnakorn, J., I. Hirono, T. Itami, Y. Takahashi, T. Aoki. 2002. Gene Expression in haemocytes of Kuruma prawn, *Penaeus japonicus*, in response to infection with WSSV by EST approach. *Fish and Shellfish Immunology* 13: 69-83.
- Sahul-Hameed, A.S., M.X. Charles, M. Anilkmar. 2000. Tolerance of *Macrobrachium rosenbergii* to hite spot syndrome virus. *Aquaculture* 183: 207-213.
- Sahul-Hameed, A.S., M. Sarathi, R. Sudhakaran, G. Balasubramanian, S. Syed-Musthaq. 2006. Quantitative assessment of apoptotic hemocytes in white spot syndrome virus

- (WSSV)-infected Penaeid shrimp, *Penaeus monodon* and *Penaeus indicus*, by flow cytometric analysis. *Aquaculture* 201: 179-186.
- Sánchez-Paz, A. 2010. White spot syndrome virus: an overview on an emergent concern. *Veterinary Research* 41: 41-43.
- Sánchez-Paz, A., F. Mendoza-Cano, A. Hernández-Pérez, D. Galván-Álvarez. 2010. Virus: Gran amenaza para el camarón. *Ciencia y Desarrollo* 36: 54-59.
- Söderhäll, K. y L. Cerenius. 1992. Crustacean immunity. *Annual Review of Fish Diseases* 1: 3-23.
- Sonnenholzner, S., J. Rodríguez, F. Pérez, I. Betancourt, F. Echeverría, J. Calderón. 2002. Supervivencia y respuesta inmune de camarones juveniles *Litopenaeus vannamei* desafiados por vía oral a WSSV a diferentes temperaturas. *Boletín El Mundo Acuícola* 8: 50-56.
- Sieczkarski, S.B. y G.R. Whittaker. 2002. Dissecting virus entry via endocytosis. *Journal of General Virology* 83: 1535-1545.
- Sritunyalucksana, K., W. Wannapapho, C.F. Lo, T.W. Flegel. 2006. PmRab7 is a VP28-binding protein involved in white shrimp syndrome virus infection in shrimp. *Journal of Virology* 80: 10734-10742.
- Suttle, C.A. 2007. Marine viruses: major players in the global ecosystem. *Nature Reviews Microbiology* 5: 801-812.
- Sun, J., A. Wang, T. Zhang. 2010. Flow Cytometric Analysis of Defense Functions of Hemocytes from the Penaeid Shrimp, *Penaeus vannamei*. *Journal of the world Aquaculture Society* 41: 92-105.
- Syed-Musthaq, S., R. Sudhakaran, G. Balasubramanian, A.S. Sahul Haamed. 2006. Experimental transmission and tissue tropism of white spot syndrome virus (WSSV) in two species of lobsters, *Panulirus homarus* and *Panulirus ornatus*, *Journal of Invertebrate Pathology*. 93:75-80.

- Terán-Díaz, B.S. 2012. Evaluación del zooplancton como vector del Virus del Síndrome de la Mancha Blanca (WSSV) Tesis de Licenciatura. UABCS. Baja California Sur, México. 53 p.
- Tsai, M.F., T.H. Yu, H.F. Tzeng, J.H. Leu, C.M. Chou, H.J. Huang. 2000. Identification and characterization of a shrimp white spot syndrome virus (WSSV) gene that encodes a novel chimeric polypeptide of cellular-type thymidine kinase and thymidylate kinase. *Virology* 277: 100-110.
- Tsai, J.M., H.C. Wang, J.H. Leu, H.H. Hsiao, A.H. Wang, G.H. Kou, C.F. Lo. 2004. Genomic and proteomic analysis of thirty-nine structural proteins of shrimp white spot syndrome virus. *Journal of Virology* 78: 11360-11370.
- Vanpatten, K.A., L.M. Nunan, D.V. Lightner. 2004. Seabirds as potential vectors of Penaeid shrimp viruses and the development of a surrogate laboratory model utilizing domestic chickens. *Aquaculture* 241: 31-46.
- Van de Braak, K., M. Botterblom, W. Liu, N. Taverne, W. Van der Knaap, J. Rombout. 2002. The role of the haematopoietic tissue in haemocyte production and maturation in the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Fish & Shellfish Immunology* 12: 253-272.
- Van Hulten, M.C., M. Westenberg, S.D. Goodal, J.M. Vlak. 2000. Identification of two major virion protein genes of white spot syndrome virus of shrimp, *Virology* 266: 227-236.
- Van Hulten M.C.W., J. Witteveldt, S. Peters, N. Kloosterboer, R. Tarchini, M. Fiers. 2001a. The white spot syndrome virus DNA genome sequence. *Virology* 286:7-22.
- Van Hulten, M.C., J. Witteveldt, M. Snippe, J.M. Vlak. 2001b. White spot syndrome virus envelope protein VP28 is involved in the systemic infection of shrimp. *Virology* 285: 228-233.
- Van Hulten, M.C., M. Reijns, A.M. Vermeesch, F. Zandbergen, J.M. Vlak. 2002. Identification of VP19 and VP15 of white spot syndrome virus (WSSV) and glycosylation status of the WSSV major structural proteins, *Journal of General Virology* 83:257-265.

- Vargas-Albores, F., M.A. Guzmán-Murillo, J.L. Ochoa. 1993. An anticoagulant solution for haemolymph collection and prophenoloxidase studies of Penaeid shrimp (*Penaeus californiensis*). *Comparative Biochemistry and Physiology* 106: 299-303.
- Vidal, O., C. Granja, F. Aranguren. 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.
- Vijayan, K.K., V.S. Raj, C.P. Balasubramanian, S.V. Alavandi, V.T. Sekhar, T.C. Santiago. 2005. Polychaete worms—a vector for white spot syndrome virus (WSSV), *Diseases of Aquatic Organisms* 63: 107-111.
- Wang, Y.T., W. Liu, J.N. Seah, C.S. Lam, J.H. Xiang, V. Korzh, J. Kwang. 2002. White Spot Syndrome Virus (WSSV) infects specific hemocytes of the shrimp *Penaeus merguensis*. *Diseases of Aquatic Organisms* 52: 249-259.
- Wang, Y.C., C.F. Lo, P.S. Chang, G.H. Kou. 1998. Experimental infection of white spot baculovirus in some cultured and wild decapods in Taiwan. *Aquaculture* 164: 221-231.
- Wang, Y.G., M.D. Hassanm, M. Shariff, S.M. Zamri, X. Chen. 1999a. Histopathology and cytopathology of white spot syndrome virus (WSSV) in cultured *Penaeus monodon* from peninsular Malaysia with emphasis on pathogenesis and the mechanism of white spot formation. *Diseases of Aquatic Organisms* 22: 1-11.
- Wang Q., B.L. White, R.M. Redman, D.V. Lightner. 1999b. *Per os* challenge of *Litopenaeus vannamei* postlarvae and *Farfantepenaeus duorarum* juveniles with six geographic isolates of white spot syndrome virus. *Aquaculture* 170:179-194.
- Wongprasert, K., K. Khanobdee, S.S. Glunukarn, P. Meeratana, B. Withyachumnarnkul. 2003. Time-course and levels of apoptosis in various tissues of black tiger shrimp *Penaeus monodon* infected with white-spot syndrome virus. *Diseases of Aquatic Organisms* 55: 3-10.
- Wongteerasupaya, C., J.E. Vickers, S. Sriurairatana, G.L. Nash, A. Alarajamorn, V. Boonsaeng. 1995. A non-occluded, systemic baculovirus that occurs in cells of

ectodermal and mesodermal origin and causes high mortality in the black tiger prawn *Penaeus monodon*. *Diseases of Aquatic Organisms* 21: 69-77.

Yang, F., J. He, X. Lin, Q. Li, D. Pan, X. Zhang, X. Xu. 2001. Complete genome sequence of shrimp white spot bacilliform virus. *Journal of Virology* 75: 11811-11820.

Yan, D.C., S.L. Dong, J. Huang, X.M. Yu, M.Y. Feng, X.Y. Liu. 2004. White spot syndrome virus (WSSV) detected by PCR in rotifers and rotifer resting eggs from shrimp pond sediments. *Diseases of Aquatic Organisms* 59: 69-73.

ANEXOS

Anexo 1.

Extracción y aislamiento de ADN.

Colocar 100 μL de cada filtrado o macerado por separado en tubos de 1.7 mL y adicionar 150 μL de solución de lisis (NaCl 100 mM, Tris 50 mM, EDTA 100 mM y SDS 1%) y homogeneizar. Centrifugar 5 min a 9,000 x g. Recuperar 50 μL del sobrenadante y colocarlo en otro microtubo de 1.7 μL con 150 μL del producto comercial GeneClean™ homogeneizado previamente, agitar en el vórtex durante 30 segundos y dejar reposar 3 min. Agitar nuevamente en el vórtex y dejar reposar 2 min. Centrifugar 3 min a 6,000 g y desechar el sobrenadante. Adicionar 500 μL de solución de lavado (50% TBE buffer: 130 mM Tris, 45 mM ácido bórico, y 2.5 mM EDTA, pH 8.0, 50% etanol) y agitar en el vórtex. Centrifugar la muestra durante 3 min a 6,000 g y desechar el sobrenadante. Repetir el paso anterior y dejar secar sobre una toalla de papel secante durante 10 min. Agregar 50 μL de agua libre de nucleasas, agitar en el vórtex y centrifugar 5 min a 6,000 g. Recuperar 25 μL y colocarlo en un microtubo de 0.22 μL . Mantener el ADN en congelación a -20°C debidamente etiquetado hasta su uso.

Anexo 2.

Cuantificación de la carga viral de un inóculo de WSSV por qPCR utilizando IQ™ Real® quantitative system.

En el programa de tiempo real correr sistema de ensayo cuantitativo para IQ Real quantitative system™. La calibración de la curva es esencial para Q_{ab} , y se cargaron 4 estándares (10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2). Para preparar el estándar se utilizó Yeast tRNA (40 ng/ μ L) y se usó como diluyente para el Standard Dual P (+).

Q_{ab} : añadir 2 μ L de Dual P (+) Standard (10^6 copias/ μ L) en 18 μ L de Yeast tRNA (40 ng/ μ L), mezclar bien para obtener 10^5 copias/ μ L de estándar. Usar la misma relación para diluir las 10^5 copias/ μ L de estándar a 10^4 , 10^3 , 10^2 y 10^1 copias/ μ L de estándar. Usar las cuatro diluciones para calibrar la curva. Q_{cp} : usar el procedimiento anterior para preparar 104 copias/ μ L de estándar.

Preparar las reacciones según el número de muestras y estándares para 25 μ L de volumen final por reacción mezclar: 21 μ L de Real-Time Premix, 2 μ L de IQzyme, DNA polimerasa 2 U/ μ L y 2 μ L de ARN de la muestra cuantificado.

Comenzar la PCR de Tiempo Real con condiciones de reacción: 93° C, 15 segundos; 60°C, 1 minuto, repetir 40 ciclos; 42°C, 30 min.

Anexo 3.

Detección del WSSV mediante la técnica de qPCR.

Para realizar el pipeteo es indispensable el uso de puntas nuevas (estériles, libres de nucleasas) y una vez empleadas desecharlas.

Utilizando una gradilla fría, mezclar los reactivos de acuerdo a las siguientes cantidades por reacción: iQTM SYBR[®] Green Supermix 7.5 μ L; Primer Fw 0.5 μ L; Primers 1 μ L; Agua libre de nucleasas 4.5 μ L y agregar 2 μ L de la muestra (ADN).

Amplificar los productos de la PCR siguiendo el siguiente esquema: 94°C 5 min; 35 ciclos de 94°C, 30 s, 60°C 30 s, 72°C 30 s; 72°C 5 min.

La lectura de amplificación de IQ SYBR[®] GREEN SUPER MIX en el Software se realiza a partir de la gráfica FAM generada por el programa de operación del equipo, serán consideradas positivas aquellas muestras cuya curva presente el mismo comportamiento que el control positivo, reportándose como “detectado” a reserva de la confirmación mediante el análisis de disociación (MELTING ANALYSIS: MELT).

Realizar el análisis MELT empleando las siguientes condiciones de reacción: Intervalo de temperatura 50°C - 99°C; incremento de temperatura en cada paso 0.5°C; Tiempo de espera en el primer paso 30 s; Tiempo de espera después 5s.

Las muestras cuya curva tenga una pendiente cercana a cero serán reportadas como “no detectado”.

Anexo 4.

Mantenimiento temporal *in vitro* de hemocitos de camarón blanco (*L. vannamei*).

Para realizar el cultivo temporal de hemocitos es indispensable el uso de material y soluciones estériles, libres de pirógenos.

Extraer hemolinfa del seno hemolinfático ventral (entre el último par de pereiópodos y el primer par de pleópodos) del organismo con el anticoagulante para camarón SIC-EDTA (NaCl 450 mM; KCl 10 mM; HEPES 10 mM (Vargas *et. al.*, 1993) EDTA 10 mM) en proporción 1:2 e inmediatamente homogeneizar suavemente la muestra para evitar su coagulación. Colocar en tubos de 1.7 µL y centrifugar durante 5 min a 1,000 g a una temperatura de 29°C; eliminar el sobrenadante y resuspender el paquete celular (visible en el fondo del tubo) en 500 µL de solución isotónica para camarón, SIC. Homogeneizar suavemente. Mantener en una incubadora con movimiento suave para evitar su adhesión a las paredes del tubo o placa a 29°C.

Corroborar la presencia y el número de células utilizando un contador de células o con observación directa al microscopio.

Anexo 5.

Contador de células clínico.

Homogeneizar suavemente la muestra; colocar en un microtubo de 1.7 mL y tomar un total 10 μ L para pasarlo a otro tubo igual al que se le agregan 10 μ L de azul de tripan al 0.4%. Homogeneizar con ayuda de la pipeta con mucha suavidad para evitar romper las células y colocar 10 μ L del tubo por duplicado en una de las celdas de las cámaras para promediar. Finalmente, introducir la cámara al equipo, ajustar el zoom para observar las células y realizar la cuenta presionando el botón “COUNT CELLS”. Posteriormente se guarda el resultado.

Anexo 6.

Protocolo para la extracción de ARN.

Suspender en un microtubo con capacidad de 1.7 mL, 1 mL de Trizol[®] por cada 5 - 10 10^6 células con pipeteo suave; dejar incubar las muestras durante 5 min a temperatura ambiente para permitir la disociación de proteínas complejas. Añadir 0.2 mL de cloroformo por cada mL de Trizol[®], agitar los tubos 15 segundos e incubar de 15-30°C 2-3 min. Centrifugar 12,000 x g 15 min a 2-8°C. Tomar la fase acuosa superficial y colocarlo en un nuevo microtubo conteniendo 0.5 mL de isopropanol por cada mL de Trizol[®], incubar a temperatura ambiente por 10 min, centrifugar 12,000 x g 10 min a 4°C. El precipitado es visible en el fondo del tubo. Remover el sobrenadante lavando el RNA con etanol al 75% frío, por cada mL de Trizol[®]. Agitar suavemente y centrifugar 7,500 x g 5 min a 4°C. Secar al aire el tubo y disolver en 50 μ L de agua libre de nucleasas e incubar 10 min a 55°C. Guardar a -70°C el RNA debidamente etiquetado.

Anexo 7.

Técnica de RT-PCR para WSSV.

Se utilizó la técnica de RT-PCR para amplificar el ARNm en un solo paso. Con éste método se realiza la transcripción reversa y la amplificación por PCR en el mismo tubo. Se usó 1 µg de mRNA en cada prueba y se adicionaron los componentes de la reacción de 12.5 µL de SYBR Green Mix, 1.5 µL de primers, 9 µL de agua libre de nucleasas, 0.5 µL de enzima. Una vez agregados los reactivos en el tubo, se colocó en un termociclador y se realizó la reacción de RT-PCR de acuerdo al siguiente protocolo: 60 min a 60°C, 2 min a 94°C, 40 ciclos de 45 seg 94°C/45 seg 60°C y finalmente 7 min a 72°C.