



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

ACTIVIDAD ENZIMÁTICA Y ESTRÉS OXIDATIVO EN
CAMARON BLANCO (*Litopenaeus vannamei*) INFECTADO
CON EL VIRUS DEL SÍNDROME DE LA MANCHA BLANCA
(VSMB)

TESIS

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación Biología Marina)

Presenta

DELIA PATRICIA PARRILLA TAYLOR

La Paz, Baja California Sur, Enero de 2011

ACTA DE LIBERACION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 12 horas del día 12 del Mes de Enero del 2011, 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:

“Actividad enzimática y estrés oxidativo en camarón blanco (Litopenaeus vannamei) infectado con el virus del síndrome de la mancha blanca (VSMB)”

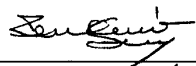
Presentada por el alumno:

Delia Patricia Parrilla Taylor

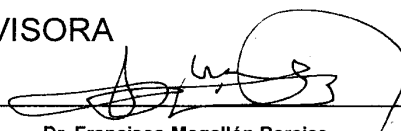
Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACION DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACION EN Biología Marina

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.

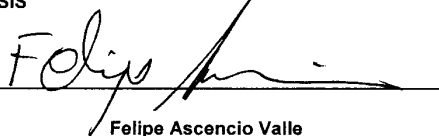
LA COMISION REVISORA



Dra. Tania Zenteno Savín
DIRECTOR DE TESIS



Dr. Francisco Magallón Barajas
CO-TUTOR



Felipe Ascencio Valle
CO-TUTOR



DRA. ELISA SERVIERE ZARAGOZA,
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

COMITÉ TUTORIAL Y REVISOR DE TESIS

Director de Tesis

Dra. Tania Zenteno Savín
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C.

Co-Tutor

Dr. Francisco Magallón Barajas
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C.

Co-Tutor

Dr. Felipe Ascencio Valle
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C.

JURADO DE EXAMEN DE GRADO

Dra. Tania Zenteno Savín
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C.

Dr. Francisco Magallón Barajas
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C.

Dr. Felipe Ascencio Valle
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C.

Suplente

Dr. Humberto Mejía Ruiz
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C.

RESUMEN

El virus del síndrome de la mancha blanca (VSMB) es considerado un patógeno extremadamente virulento que afecta la mayoría de los crustáceos en ambos hemisferios. VSMB causa estrés oxidativo debido a la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) como parte del sistema inmune que defiende al hospedero en contra de microorganismos extraños. Camarones de 10-12 g de peso fueron mantenidos en acuarios a 27° C, y se tomaron muestras de hemolinfa, hepatopancreas, branquias y musculo en diferentes intervalos de tiempo (1, 24 y 48 h) de camarones sanos e infectados por inyección intramuscular de un inoculo viral con VSMB. La carga viral fue confirmada y cuantificada por qPCR. Se cuantificó el daño oxidativo asociado con el estrés oxidativo (peroxidación de lípidos y carbonilos proteicos) y la actividad de (enzimas antioxidantes superoxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx), glutatión reductasa (GR) y glutatión S-transferasa (GST). Se encontró un efecto debido a la infección con VSMB en todos los tejidos y parámetros analizados. La peroxidación de lípidos y el contenido de carbonilos proteicos fue más alto en los tejidos infectados con VSMB comparado con los controles no infectados. La actividad de las enzimas antioxidantes fue significativamente más elevada a 1 h post-infección en hemolinfa, mientras que en los tejidos restantes, la actividad resultó más elevada a 24 h post-infección debido a la alta producción de ERO causada por la actividad fagocítica en contra de la infección con VSMB mientras que a 48 h post-infección se encontró un descenso de la actividad enzimática en todos los tejidos analizados. Los resultados sugieren estrés oxidativo y daño oxidativo debido a la inactivación de enzimas antioxidantes en camarones infectados con VSMB lo que da lugar al fallo del sistema y la muerte del organismo.

Palabras clave: Camarón blanco, enzimas antioxidantes, estrés oxidativo, virus del síndrome de la mancha blanca.

ABSTRACT

White spot syndrome virus (WSSV) is considered an extremely virulent pathogen that affects most of the crustaceans in both hemispheres. WSSV causes oxidative stress due to the production of ROS as part of the immune system that defends the host against foreign micro-organisms. Shrimp of 10-12 g body mass were held in aquaria at 27° C and samples of haemolymph, hepatopancreas, gills and muscle were taken at different time intervals (1, 24 and 48 h) from healthy and infected shrimps by intramuscular injection with a viral inoculum of WSSV. The viral load was confirmed and quantified by qPCR. The oxidative damage associated with oxidative stress was quantified with the levels of oxidative damage (lipid peroxidation and carbonyl protein) and the activity of antioxidant enzymes (superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) glutathione reductase (GR) and glutathione S-transferase (GST). An effect due to the infection with WSSV was found in all tissues and parameters analyzed. Lipid peroxidation and protein carbonyl levels were higher in WSSV-infected tissues compared to uninfected controls. The activity of antioxidant enzymes was significantly higher at 1 h post-infection in the haemolymph, while in the rest of the tissues, the activity was more elevated at 24 h post-infection due to high production of ROS caused by the phagocytic activity against infection with WSSV, while a significant reduction in antioxidant enzymes activities was found at 48 h post-infection in all the tissues analyzed. These results could indicate oxidative stress and tissue damage via inactivation of antioxidant enzymes in WSSV-infected shrimps resulting in system failure and sudden death.

Key words: White shrimp, antioxidant enzymes, oxidative stress, White spot syndrome virus.

DEDICATORIA

A mis padres

AGRADECIMIENTOS

A CONACYT por la beca número 224552 otorgada durante el desarrollo de la tesis de maestría.

Al comité tutorial conformado por la Dra. Tania Zenteno Savín por las facilidades otorgadas para la realización de este trabajo, el apoyo incondicional y sobre todo por su amistad, al Dr. Francisco Magallón por proporcionarnos los organismos y la ayuda para realizar el bioensayo, además de sus valiosos comentarios y al Dr. Felipe Ascencio por sus observaciones.

A todo el grupo de salud ambiental y biomedicina del CIBNOR, por todo su apoyo y comentarios durante la realización de este trabajo. Muy particularmente a los técnicos Norma Olgún y Orlando Lugo por su ayuda y asistencia en el trabajo de laboratorio. A la alumna de doctorado Vanessa Labrada por su apoyo en los análisis multivariados. A mis compañeras de laboratorio, por siempre enriquecer las juntas de laboratorio con sus comentarios y bocadillos.

Al alumno de doctorado Raúl Llera por el soporte técnico y logístico aportado para la realización de los análisis estadísticos. A mis compañeros de maestría, principalmente a Daniela, Verónica y Merit, que hicieron más gratos y entretenidos los días en los cubículos.

Al personal de Posgrado y a CIBNOR por brindarme un excelente ambiente de trabajo y por todas las facilidades otorgadas.

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	1
1. 1 VIRUS DEL SÍNDROME DE LA MANCHA BLANCA	2
1. 2 PRESENCIA DEL VIRUS DEL SÍNDROME DE LA MANCHA BLANCA	3
1. 3 PRODUCCIÓN DE CAMARÓN	4
1. 4 ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ERO)	5
1. 5 DEFENSAS ANTIOXIDANTES	7
2. ANTECEDENTES	11
2. 1 PREVENCIÓN Y CONTROL	11
2. 2 SISTEMA DE DEFENSA	12
2. 3 ESTRÉS OXIDATIVO EN CRUSTÁCEOS	13
3. JUSTIFICACIÓN	16
4. OBJETIVOS	16
4. 1 OBJETIVOS PARTICULARES	17
5. HIPÓTESIS	17
6. MATERIAL Y MÉTODOS	17
6. 1 DISEÑO EXPERIMENTAL	17
6. 2 BIOENSAYO	18
6. 3 MUESTREO DE LOS ORGANISMOS	19
6. 4 CUANTIFICACIÓN DE VSMB POR PCR TIEMPO-REAL	20
6. 5 VARIABLES BIOQUÍMICAS	21
6. 5. 1 <i>Lípidos Totales</i>	21
6. 5. 2 <i>Proteínas totales</i>	22
6. 6 ANÁLISIS DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA	23
6. 6. 1 <i>Superóxido dismutasa (SOD) (EC 1.15.1.1)</i>	23
6. 6. 2 <i>Catalasa (CAT) (EC 1.11.1.6)</i>	23
6. 6. 3 <i>Glutación peroxidasa (GPx) (EC 1.11.1.9)</i>	24
6. 6. 4 <i>Glutación-S-transferasa (EC 2.5.1.18)</i>	24
6. 6. 5 <i>Glutación disulfuro reductasa (EC 1.6.4.2)</i>	25
6. 7 DAÑO OXIDATIVO	25

6. 7. 1 <i>Proteínas carboniladas</i>	25
6. 7. 2 <i>Peroxidación de lípidos (TBARS)</i>	26
6. 8 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	27
7. RESULTADOS	27
7. 1 ANÁLISIS DE QPCR	28
7. 2 VARIABLES BIOQUÍMICAS	29
7. 2. 1 <i>Proteínas totales</i>	29
7. 2. 2 <i>Lípidos totales</i>	31
7. 3 ACTIVIDAD ENZIMÁTICA	33
7. 3. 1 <i>Superóxido dismutasa (SOD)</i>	33
7. 3. 2 <i>Catalasa (CAT)</i>	35
7. 3. 3 <i>Glutación peroxidasa (GPx)</i>	37
7. 3. 4 <i>Glutación reductasa (GR)</i>	39
7. 3. 5 <i>Glutación S- transferasa (GST)</i>	41
7. 4 DAÑO OXIDATIVO	43
7. 4. 1 <i>Carbonilos protéicos</i>	43
7. 4. 2 <i>Lípidos peroxidados</i>	45
7. 5 ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES (ACP)	47
8. DISCUSIÓN	49
8.1 ANÁLISIS DE QPCR	49
8. 2 VARIABLES BIOQUÍMICAS	51
8.3 ACTIVIDAD ENZIMÁTICA	54
8.4 DAÑO OXIDATIVO	63
9. CONCLUSIONES	68
10. BIBLIOGRAFÍA	70
11. LISTA DE TABLAS	81

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Serie histórica de la producción de camarón (toneladas) en peso vivo _____	4
Figura 2. Defensas enzimáticas antioxidantes _____	8
Figura 3. Representación de los eventos involucrados en la explosión respiratoria de las células fagocíticas _____	9
Figura 4. Diseño experimental realizado en el laboratorio de bioensayos de CIBNOR, Unidad Hermosillo _____	18
Figura 5. Inyección intramuscular de los camarones <i>L. vannamei</i> con virus del síndrome de la mancha blanca _____	19
Figura 6. Conteos de fragmentos virales de virus del síndrome de la mancha blanca en hemolinfa _____	28
Figura 7. Concentración de proteínas totales (mg mL^{-1}) en tejidos de camarón blanco expuesto a virus del síndrome de la mancha blanca _____	30
Figura 8. Concentración de lípidos totales (mg mL^{-1}) en tejidos de camarón blanco expuesto a virus del síndrome de la mancha blanca _____	32
Figura 9. Actividad enzimática de superóxido dismutasa (SOD, $\text{U mg de proteína}^{-1}$) en tejidos de camarón blanco expuesto a virus de la mancha blanca _____	34
Figura 10. Actividad enzimática de catalasa (CAT, $\text{U mg de proteína}^{-1}$) en tejidos de camarón blanco expuesto a virus de la mancha blanca _____	36
Figura 11. Actividad enzimática de glutatión peroxidasa (GPx, $\text{mU mg de proteína}^{-1}$) en tejidos de camarón blanco expuesto a virus de la mancha blanca _____	38
Figura 12. Actividad enzimática de glutatión reductasa (GR, $\text{mU mg de proteína}^{-1}$) en tejidos de camarón blanco expuesto a virus de la mancha blanca _____	40
Figura 13. Actividad enzimática de glutatión S-transferasa (GST, $\text{mU mg de proteína}^{-1}$) en tejidos de camarón blanco expuesto a virus de la mancha blanca _____	42
Figura 14. Concentración de carbonilos protéicos ($\text{nmol mg de tejido}^{-1}$) en tejidos de camarón blanco expuesto a virus de la mancha blanca _____	44
Figura 15. Concentración de lípidos peroxidados (TBARS, $\text{nmol mg de proteína}^{-1}$) en tejidos de camarón blanco expuesto a virus de la mancha blanca _____	46
Figura 16. Proyección de las variables analizadas con el análisis de componentes principales _____	48

Figura 17. Proyección gráfica del resultado del análisis multivariado de componentes principales para todos los datos obtenidos en tejidos de camarón blanco expuesto a virus de la mancha blanca _____ 48

LISTA DE TABLAS

Tabla I. Contenido de proteínas totales (mg mL^{-1}) en tejidos de camarón blanco expuesto a virus de la mancha blanca _____	81
Tabla II. Contenido de lípidos totales (mg mL^{-1}) en tejidos de camarón blanco expuesto a virus de la mancha blanca _____	82
Tabla III. Actividad enzimática de superóxido dismutasa (SOD), expresados como U $\text{mg de proteína}^{-1}$, en tejidos de camarón blanco expuesto a virus de la mancha blanca	82
Tabla IV. Actividad enzimática de catalasa (CAT), expresados como U $\text{mg de proteína}^{-1}$, en tejidos de camarón blanco expuesto a virus de la mancha blanca _____	83
Tabla V. Actividad enzimática de glutatión peroxidasa (GPx), expresados como mU $\text{mg de proteína}^{-1}$, en tejidos de camarón blanco expuesto a virus de la mancha blanca ____	83
Tabla VI. Actividad enzimática de glutatión reductasa (GR), expresados como mU $\text{mg de proteína}^{-1}$, en tejidos de camarón blanco expuesto a virus de la mancha blanca ____	84
Tabla VII. Actividad enzimática de glutatión S- transferasa (GST), expresados como mU $\text{mg de proteína}^{-1}$, en tejidos de camarón blanco de camarón blanco expuesto a virus de la mancha blanca _____	84
Tabla VIII. Contenido de carbonilos protéicos ($\text{nmol mg de tejido}^{-1}$) en tejidos de camarón blanco expuesto a virus de la mancha blanca _____	85
Tabla IX. Contenido de lípidos peroxidados (TBARS) ($\text{nmol mg de proteína}^{-1}$) en tejidos de camarón blanco expuesto a virus de la mancha blanca _____	85
Tabla X. Matriz de correlación con eigenvalores para todos los componentes extraídos del análisis de componentes principales. _____	86
Tabla XI. Coeficientes de correlación extraídos de los componentes principales para todas las variables analizadas. _____	86

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP: Adenosín trifosfato

CAT: Catalasa

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

ERO: Especies reactivas de oxígeno

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.

g: Gramo

GSH: Glutación

GSSG: Glutación disulfuro

GR: Glutación disulfuro reductasa

GPx: Glutación peroxidasa

GST: Glutación-S-transferasa

G6PDH: Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa

H₂O₂: Peróxido de hidrogeno

HCl: Acido clorhídrico

PCR: De las siglas en ingles: Reacción en cadena de la polimerasa

O₂: Oxígeno molecular

O₂•-: Radical superóxido

HO•: Radical oxhidrilo

NADPH: Nicotinamin adenín dinucleótido fosforilado reducido

Rpm: Revoluciones por minuto

SOD: Superóxido dismutasa

TBARS: Sustancias reactivas al ácido tiobartibúrico

U mg⁻¹: Unidades por miligramo

μL: Microlitros

Ups: Unidades porcentuales de salinidad

VSMB: Virus del síndrome de la mancha blanca

1. INTRODUCCIÓN

La producción de crustáceos es una actividad de alto valor comercial a nivel mundial. Ésta representa el mayor valor monetario de la industria acuícola, en donde aproximadamente la mitad corresponde a los camarones peneidos (Smith et al., 2003). La acuicultura de camarón se expandió significativamente a lo largo de América Latina y Asia durante la década de 1980 y desde entonces se ha multiplicado y extendido a través del mundo con una aportación del 40% de la producción total de camarón (Moss, 2002; FAO, 2009). De acuerdo a los reportes del Fisheries and Aquaculture Department of Food and Agriculture Organization (FAO, 2008) se obtuvo un excedente de 2.4 millones de toneladas por año en la producción de camarón por acuicultura. El camarón blanco del Pacífico (*Litopenaeus vannamei*, también denominada como *Penaeus vannamei*) es la especie de peneido más cultivada a nivel mundial y contribuye aproximadamente al 75% de la producción global con un valor aproximado de \$8.9 billones de dólares reportados en 2008 (FAO, 2009).

La rápida expansión de la industria de acuicultura de camarón ha sido acompañada de enfermedades que afectan la supervivencia y el desarrollo de los organismos lo que da lugar a mermas en los parámetros productivos o la disminución de la calidad del producto. Preservar la salud de los camarones es uno de los factores limitantes de mayor importancia para la producción ya que las mortalidades representan una pérdida directa de la inversión en alimento, trabajo, organismos, y otros componentes del costo total de la misma (Plumb, 2001; Harper, 2002).

Los virus de origen marino no se habían considerado ecológicamente importantes hasta la década de 1980, pues su concentración era desestimada. Estudios subsecuentes revelaron que existen millones de partículas virales en cada milímetro de agua de mar por lo que estas entidades biológicas se consideran las más abundantes en los océanos (Suttle, 2007; Sánchez-Paz, 2010). Las contribuciones más importantes al conocimiento de las enfermedades virales en los organismos marinos radican en sus efectos adversos en la acuicultura.

1. 1 Virus del síndrome de la mancha blanca

Entre los virus considerados más virulentos debido a su poder de infección y alta capacidad de propagación, se encuentra el virus del síndrome de la mancha blanca (VSMB ó WSSV por sus siglas en inglés). Este virus ha sido, hasta el momento, el problema de sanidad acuícola de mayor impacto para el cultivo de los camarones peneidos (Aguirre y Ascencio, 2000; Maldonado et al., 2004). El VSMB es un patógeno importante que infecta especies de crustáceos decápodos en ambos hemisferios. El VSMB cuenta con un amplio rango de organismos que actúan como hospederos o simplemente como acarreadores mecánicos, entre los cuales se incluyen rotíferos, bivalvos, anélidos, crustáceos no decápodos (como *Artemia salina*), copépodos, isópodos, larvas de insectos, y otros artrópodos acuáticos no crustáceos. Todas estas especies pueden acumular elevadas concentraciones de virus viable, aunque no existen pruebas de su replicación (Chang et al., 2002; Yan et al., 2004; Vijayan et al., 2005).

El VSMB es un virus de doble cadena de ADN que pertenece a la familia Nimaviridae del género Whispovirus. El VSMB posee forma elíptica y un apéndice en forma de flagelo en el extremo del virión, de 70-150 nm de diámetro y 275-380 nm de longitud. El genoma del VSMB puede variar de 290 a 305 kp (van Hulten et al., 2001; Huang et al., 2002; Jiravanichpaisal, 2005).

El VSMB puede infectar más de 90 especies de crustáceos acuáticos (Sánchez-Martínez et al. 2007; Escobedo-Bonilla, 2008), y casi todas las especies de peneidos de importancia económica son susceptibles de infección: *Penaeus monodon*, *Fenneropenaeus chinensis*, *P. indicus*, *P. penicillatus*, *P. japonicus*, *Metapenaeus ensis*, *P. aztecus*, *P. duorarum*, *P. merguensis*, *P. semisulcatus*, *L. stylirostris*, *L. vannamei*, y *Trachypenaeus curvirostris* (Chang et al., 1998; Lo et al., 1999; Sánchez-Martínez, 2007). Se ha reportado que, en muchos casos, los organismos infectados no mueren y funcionan como reservorios del patógeno en los ecosistemas (Wang et al., 2000; Zuidema et al., 2004; Sánchez-Martínez et al., 2007).

Los camarones infectados con VSMB pueden presentar manchas blancas en el rango de 0.5 a 3.0 mm de diámetro en el exoesqueleto, apéndices y epidermis, además de aletargamiento, reducción en el consumo de alimento y coloración rojiza en el cuerpo, apéndices, y pérdida de cutícula (Lo et al., 1996; Redman y Lightner 1999). La transmisión del VSMB se da de manera vertical por los progenitores (trans-ovum), horizontal por consumo de tejido infectado de organismos muertos y moribundos, y por agua contaminada con partículas virales. Lo anterior convierte al VSMB en uno de los virus más prevalentes y extendidos a nivel mundial lo que ha puesto en riesgo a la industria de la acuicultura casi en niveles de colapso en varios países (Lo et al., 1996; Rajan et al., 2000; Escobedo-Bonilla et al., 2008).

El manejo de la salud de los camarones peneidos y la prevención de la diseminación de enfermedades virales a nivel mundial depende del conocimiento que se tenga sobre la fisiología de estas especies, y en especial de sus sistemas de defensa. Varios marcadores ya han sido desarrollados y probados en especies como *L. vannamei*, *P. monodon*, *L. stylirostris*, *L. setiferus* y *L. schmitti*, entre otras. Estos marcadores, que forman parte de los mecanismos de defensa de los crustáceos, son de diferente naturaleza; entre ellos podemos encontrar enzimas de defensa, y constituyentes químicos y de metabolismo. La investigación en los mecanismos de defensa de los artrópodos se ha reforzado debido al incremento de la importancia económica de la acuicultura de crustáceos.

1. 2 Presencia del virus del síndrome de la mancha blanca

Desde hace 16 años, el VSMB ha sido un patógeno devastador en las granjas de acuicultura alrededor del mundo, lo que ha causado pérdidas económicas importantes de entre \$20 y 30 billones de dólares (Mc Clennen, 2004). El virus del síndrome de la mancha blanca se detectó por primera vez en Taiwán en 1992 y consecutivamente en la mayoría de los países asiáticos. En América, el primer caso de VSMB se presentó al sur de Texas y, posteriormente, en Ecuador causó mortalidades masivas. En México, se reportó la presencia del VSMB en Julio de 1999 en granjas de cultivo de peneidos en las

costas de Sonora y Sinaloa (Unzueta-Bustamante et al., 2002). El brote más reciente en un área considerada hasta el momento libre de VSMB se desató en Brasil en 2005, de acuerdo a la Organización Mundial para la Salud Animal (OMS) (Hasson et al., 2006).

1.3 Producción de camarón

En el año 2008-2009 se produjeron poco más de 130,000 ton de camarón por acuicultura en México y aproximadamente el 95 % del total se produjo en los estados de Sonora y Sinaloa. Sólo en el estado de Sonora se producen anualmente 81,000 ton de camarón.

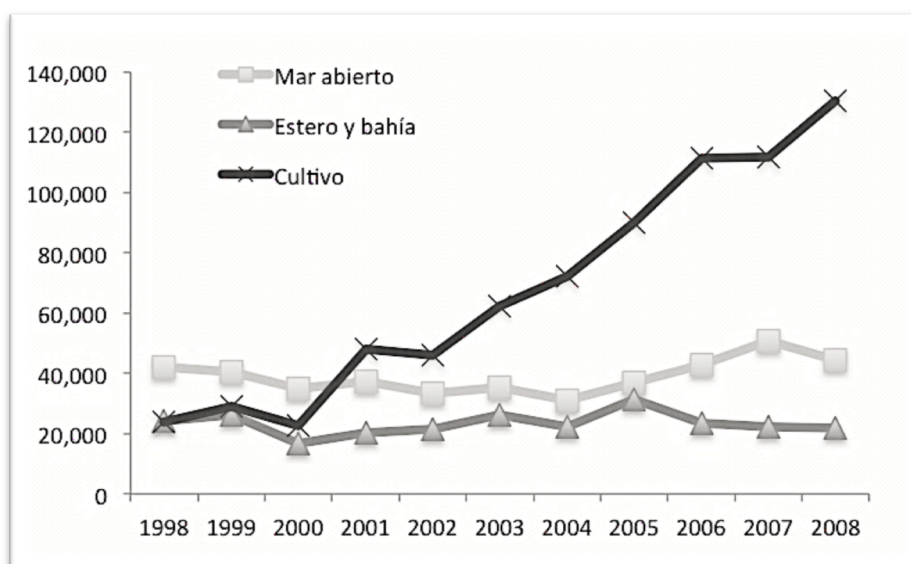


Figura 1. Serie histórica de la producción de camarón (toneladas) en peso vivo (FAO; 2009).

Para el año 2010 se tuvieron pérdidas en la producción de camarón blanco del 50-60% en los estados de Sonora y Sinaloa debido a la infección con VSMB. Se ha sugerido que probablemente la epidemia se presentó debido a la presencia del VSMB en hospederos silvestres de los ecosistemas adyacentes a las granjas durante el periodo de invierno-primavera, lo cual coincidió con el fenómeno de El Niño (Informe AERI).

1. 4 Especies Reactivas de Oxígeno (ERO)

El oxígeno es esencial para la vida de los organismos aerobios y en muchas vías metabólicas celulares en que interviene se producen especies reactivas de oxígeno (ERO). La concentración de ERO que se genera es proporcional al consumo de oxígeno y al número de mitocondrias en el tejido, la reducción del oxígeno a H₂O por la enzima citocromo oxidasa es un paso clave en la formación de ATP en la cadena de transporte de electrones; esta reducción es parcial y aproximadamente 0.1-0.2 % del O₂ consumido por la célula es reducido a O₂^{•-} (Fridovich, 2004). Otras fuentes relevantes de ERO incluyen la actividad de enzimas oxidasas solubles (xantina oxidasa y aldehído oxidasa), óxido nítrico sintetasa, NADPH oxidasa en la membrana de fagocitos, y la autooxidación de compuestos biológicos de bajo peso molecular (Boveris y Cadenas, 1982; Willmore and Storey, 1996; Hermes-Lima et al., 2002).

Las ERO incluyen al radical superóxido (O₂^{•-}), el cual da lugar al peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y al radical hidroxilo (HO•); este último es altamente reactivo. O₂^{•-} y H₂O₂ son relativamente poco reactivos y tienen una vida media larga en los sistemas biológicos, pero su peligrosidad radica en ser precursores de HO• (Storey, 1996). Se consideran otras especies reactivas como el oxígeno singulete, ozono, peróxidos lipídicos, óxido nítrico (NO) y peroxinitrito (ONOO⁻, también clasificada como una especie reactiva de nitrógeno, ERN, formado por la reacción de NO y O₂^{•-}). El oxígeno singulete, HO• y ONOO⁻ son los agentes químicos más relevantes en la inducción directa de daño oxidativo en los sistemas biológicos ya que están involucrados en muchas formas de daño oxidativo a macromoléculas (Halliwell y Gutteridge, 1999; Fridovich, 1998).

Todos los componentes celulares son susceptibles de ataque por ERO. El ataque a proteínas puede dar lugar a modificación de aminoácidos, oxidación de grupos sulfhidrilo, lo que da lugar a cambios conformacionales que alteran la actividad de enzimas (Lesser, 2006). Las ERO también son responsables de modificaciones en los

carbohidratos de glicoproteínas, pérdida de metales en metaloproteínas e incremento de susceptibilidad proteolítica; pueden causar rupturas de las cadenas de ADN y modificaciones de las bases (Hermes-Lima, 2004). Los ácidos grasos poliinsaturados, como el ácido araquidónico, parecen ser particularmente susceptibles al ataque de las ERO ya que contribuyen a la formación de radicales peroxilo y dan lugar a una cadena autocatalítica de reacciones que convierte a los lípidos en hidroperóxidos lipídicos, lo que puede alterar la fluidez y causar, eventualmente, la ruptura de la membrana (Storey, 1996; Hermes-Lima, 2004).

En algunos casos, la acción destructiva de las ERO se considera benéfica para el organismo ya que su formación en los sitios de inflamación e infección puede destruir los patógenos invasores mediante fagocitosis. La fagocitosis es la reacción más común de defensa celular y es una respuesta inmune innata dada por macrófagos en el caso de vertebrados y por hemocitos en invertebrados, los cuales internalizan a la célula, patógenos y cuerpos extraños, a través de la formación de un fagosoma, el cual mediante fusión con un lisosoma forma una vacuola digestiva llamada lisofagosoma, que a su vez, en conjunto con las ERO, contribuye a la eliminación directa de partículas extrañas o células envejecidas del propio organismo (Anderson, 1996; Rodríguez y Le Moullac, 2000).

Durante el contacto o reconocimiento del patógeno-hospedero por los macrófagos, se activan enzimas degradativas como la NADPH-oxidasa hacia el fagosoma, lo que incrementa el consumo de oxígeno, y resulta en una explosión en la producción de ERO, como el $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 , entre otros; esta cascada de eventos recibe el nombre de explosión respiratoria (ó estallido respiratorio) y tiene un valor como bioindicador de disturbios (Muñoz et al., 2000; Rodríguez y Le Moullac, 2000).

Las ERO son altamente microbicidas y proveen cierta protección al organismo ya que ayudan a eliminar los microorganismos invasores una vez fagocitados, en

combinación con compuestos nitrogenados (NO), o mediante un efecto sinérgico con lisozimas (Roch, 1999; Muñoz et al., 2000). El exceso de ERO debe ser eliminado para minimizar la naturaleza destructiva de estas moléculas, ya que el exceso de éste genera estrés oxidativo (Storey, 1996; Roch, 1999; Halliwell, 2007).

1. 5 Defensas antioxidantes

La formación de ERO se asocia con el desarrollo de muchas condiciones patológicas, así como el envejecimiento, debido a la generación de la condición de estrés oxidativo, la cual se define como una disrupción del control y señalamiento redox dado por el desbalance entre la formación de ERO y las defensas antioxidantes (Sies, 1991).

Para controlar los niveles de ERO y proteger a la célula de las condiciones que pueden generar daño oxidativo, los organismos han desarrollado una serie de respuestas, que incluyen: 1) mecanismos preventivos; 2) mecanismos reparadores; 3) defensas físicas, y 4) defensas antioxidantes (Valko et al., 2007). Los organismos tienen muchos sitios para la formación de ERO y las defensas antioxidantes resultan de suma importancia para evitar el daño oxidativo, el cual puede romper biomoléculas, tales como proteínas, ARN, ADN y lípidos poliinsaturados de membrana (Stadtman y Levine, 2000; Hermes-Lima y Zenteno-Savín, 2002).

Dentro de las defensas antioxidantes se incluye una variedad de antioxidantes no enzimáticos (glutación, ácido ascórbico, α -tocoferol y ácido úrico, entre otros) además de las enzimas antioxidantes (Fig. 1). Existen enzimas que neutralizan las ERO (superóxido dismutasa, SOD, y sus isoenzimas), enzimas encargadas de inactivar peróxidos (catalasa, CAT; glutación peroxidasa, GPx; y peroxiredoxinas) y enzimas detoxificantes (glutación S-transferasa, GST) (Nordberg y Arner, 2001; Blokhina et al., 2003; Valko et al., 2007).

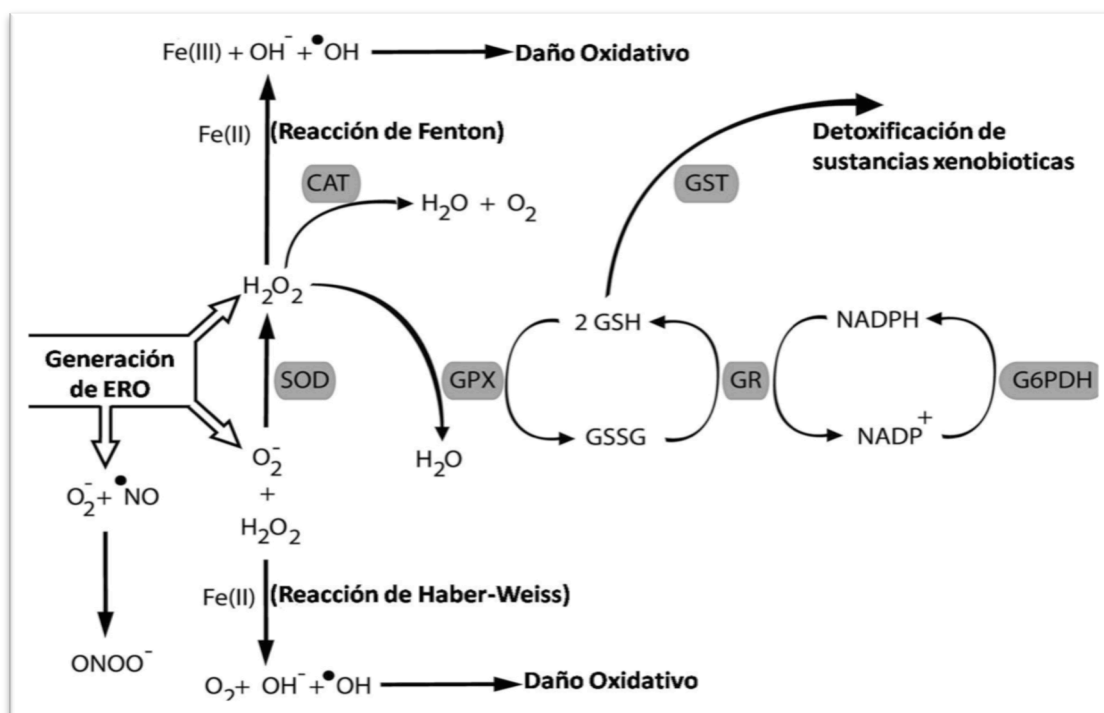


Figura 2. Las defensas enzimáticas antioxidantes funcionan en un constante sistema de retroalimentación y protegen a la célula de concentraciones elevadas de especies reactivas de oxígeno. Las principales enzimas antioxidantes son superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión S-transferasa (GST), glutatión reductasa (GR), glutatión peroxidasa (GPx) y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH). $O_2^{\cdot -}$ = radical superóxido, H_2O_2 = peróxido de hidrógeno, H_2O = agua, O_2 = oxígeno, GSH = glutatión reducido, $GSSG$ = glutatión oxidado, $NADPH$ = nicotinamida adenina dinucleótido fosfatado reducido, $NADP^+$ = nicotinamida adenina dinucleótido fosfatado oxidado (Modificado de Hermes-Lima, 2004).

La presencia de enzimas como la NADPH oxidasa y SOD se relaciona con los procesos de generación y eliminación de ERO durante la respuesta de fagocitosis de materiales extraños que invaden el organismo (Saran et al., 1999). Ésta constituye una de las principales respuestas inmunes innatas, tanto en los organismos vertebrados como invertebrados, por lo que se considera que tiene un papel inmunomodulatorio (Campa-Córdova et al., 2005).

La fagocitosis es reconocida como el fenómeno más importante de defensa celular, los invertebrados responden a los cuerpos extraños con una explosión de

actividad respiratoria. El mecanismo incluye la muerte celular del material fagocitado a través de la generación de ERO $_2$ a partir de NADPH oxidasa. Este complejo está localizado en la membrana celular y es responsable de la transferencia de un electrón del NADPH hacia el oxígeno lo que resulta en la formación de $O_2^{\cdot-}$ (Fig. 2) y, por consecuencia, H_2O_2 y $HO\cdot$. A través de una enzima llamada mieloperoxidasa, el H_2O_2 puede ser peroxidado para formar hipoclorito y otros iones derivados que resultan poderosos bactericidas (Virella, 2001).

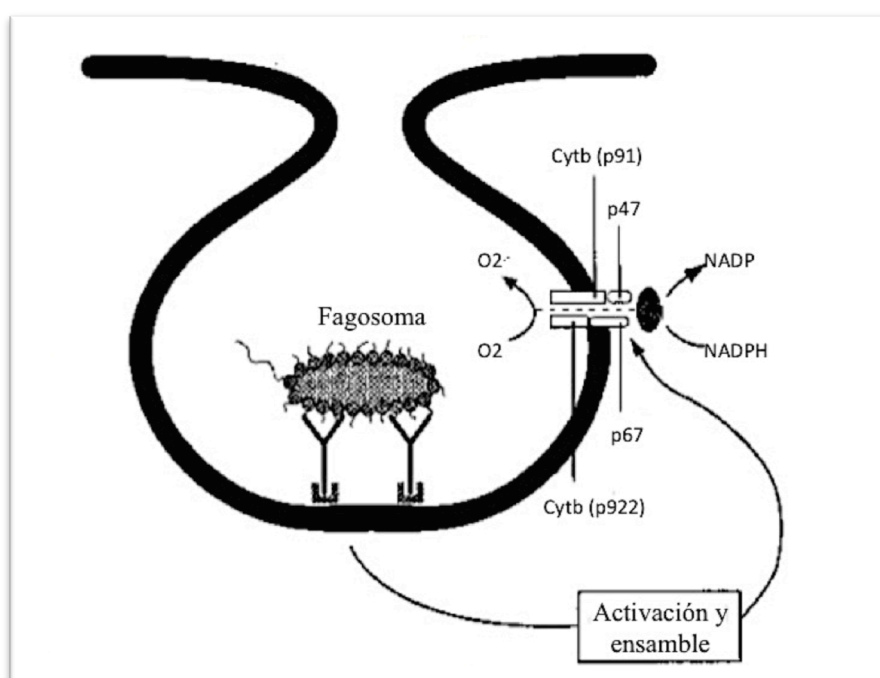


Figura 3. Representación de los eventos involucrados en la explosión respiratoria de las células fagocíticas. Los receptores desencadenan la secuencia de activación, lo que implica la activación de la proteín-quinasa, la activación enzimática, y la fosforilación de al menos una proteína citosólica (p47). Como resultado, un complejo molecular, constituido por el citocromo B (Cytb), p47, y p67, es ensamblado en la membrana celular, que es plegado para constituir un fagosoma. Este complejo cuenta con actividad NADPH oxidasa, y transferencia de los electrones resultantes a una molécula de oxígeno, lo que da lugar a la formación de superóxido ($O_2^{\cdot-}$). (Modificado de Virella (2001).

La enzima SOD es considerada la primera línea de defensa en contra de ERO $_2$, es una metaloenzima antioxidante con varias isoformas que se distribuyen de maneras diferentes en la célula. Esta enzima es un eficiente catalizador que se encarga de dismutar $O_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 y O_2 lo cual protege del daño celular generado por $O_2^{\cdot-}$. SOD

acorta de manera importante el tiempo de vida media del $O_2^{\bullet-}$, ya que mantiene los niveles controlados y en concentraciones menores a 10^{-10} mol por litro (Hombland y Söderhäll, 1999; Halliwell, 1999).

Las enzimas hidroxidrogenasas (CAT, GPx) son oxireductasas depuradoras responsables de la ruptura de H_2O_2 . CAT tiene la habilidad de tomar O_2 por oxidación del H_2O_2 para formar agua, por lo que se encarga de degradar el H_2O_2 por dismutación (Zamocky et al., 2008). GPx es una enzima tetramérica con un peso molecular de 84 kd, es una selenoenzima abundante en el citosol y en las mitocondrias de tejidos animales; esta enzima se encarga de catalizar la oxidación de glutatión (GSH), un tripéptido de bajo peso molecular, con H_2O_2 , y comparte el sustrato con CAT (Halliwell y Gutteridge, 1999). La enzima glutatión reductasa (GR) se encarga de regenerar el GSH y mantener abundantes niveles de este tripéptido en los tejidos animales. GSH a su vez es un potente antioxidante (Halliwell y Gutteridge, 1999; Lesser, 2006).

Los organismos marinos están expuestos a una gran variedad de factores ambientales que varían en la escala temporal y espacial, éstos afectan y modifican la generación de ERO y las defensas antioxidantes (Lesser, 2006). Las adaptaciones a la temperatura involucran ajustes de densidad y propiedades funcionales de la mitocondria. Los niveles de SOD pueden servir como amortiguador en contra de los cambios de temperatura a los cuales las especies poiquilothermas están sometidas naturalmente. Algunos aspectos a considerar en una infección con VSMB son el amplio número de hospederos, las múltiples vías de infección, la gran velocidad de replicación del virus, su poder de propagación y el estado fisiológico del huésped, el mismo que estaría estrechamente asociado a la temperatura.

2. ANTECEDENTES

2.1 Prevención y control

Bajo condiciones de acuicultura es importante mantener controlados los parámetros que puedan afectar la estabilidad del organismo. En este sentido, el control de enfermedades es algo que se ha investigado desde hace varios años. La mayoría de los conceptos detrás del control de enfermedades en las especies animales han sido desarrollados para especies terrestres de sangre caliente; este ambiente es muy diferente del marino, lo cual sugiere que la transferencia de tecnología hacia las condiciones de acuicultura debe hacerse con cuidado ya que algunos organismos en acuicultivo, como los camarones, son organismos poiquiloterms y la temperatura de su cuerpo fluctúa con la de su ambiente acuático lo cual representa un factor condicionante en el estado de salud.

Los brotes de enfermedades que se han presentado son el resultado de complejas interacciones entre el camarón, el patógeno y el ambiente (Lighter y Redman, 1998). Los cambios en las condiciones ambientales pueden incrementar la vulnerabilidad de los organismos hacia bacterias y virus presentes en el ambiente (Lee y Wickins, 1992), lo que reduce la capacidad de la respuesta inmune de los individuos. Por consiguiente, se favorece la susceptibilidad y el desarrollo de enfermedades (le Moullac y Haffner, 2000).

La resistencia de los camarones contra organismos invasores es fuertemente influenciada por su estado inmunológico, el mantenimiento de la integridad inmune de los organismos es una necesidad, y los principios selectos de inmunidad innata parecen estar conservados a nivel molecular. Las funciones del sistema de inmunidad innata incluyen una barrera epitelial en el hospedero que da lugar a interferencia microbiana, el reconocimiento de señales invasoras, fagocitosis de organismos invasores, el reclutamiento de células inmunes y la secreción de moléculas efectoras, como péptidos antimicrobiales (Rosenstiel et al., 2008).

2. 2 Sistema de defensa

Dado que los invertebrados no poseen un sistema de defensa con inmunidad adquirida, éste es no-específico y virtualmente nada es conocido para él. El sistema inmune de los camarones se divide en componentes celulares y humorales que actúan conjuntamente para detectar y eliminar todo microorganismo extraño que represente un peligro para el hospedero (Jiravanichpaisal et al., 2006). Los componentes celulares de defensa incluyen todas aquellas reacciones que son llevadas a cabo directamente por los hemocitos (fagocitosis, encapsulación, formación de nódulos). Los componentes humorales involucran la activación y liberación de moléculas almacenadas dentro de los hemocitos, como son proteínas anticoagulantes, aglutininas, enzima fenoloxidasa, péptidos antimicrobianos, inhibidores de proteasas, entre otros (Jiravanichpaisal et al., 2006; Holmblad y Söderhäll, 1999).

Ha habido un esfuerzo por estudiar los efectos de los factores ambientales en las funciones inmunes del camarón. Le Moullac y Haffner (2000) reportaron que los cambios en los factores ambientales reducen la actividad inmune de los crustáceos. Por ejemplo, cambios en el pH resultan en un conteo bajo de hemocitos en la langosta de agua dulce *Macrobrachium rosenbergii* (Cheng y Chen, 2000), y una alta concentración de amonio disminuye la actividad de fenoloxidasa y de los fagocitos en el camarón *L. vannamei* (Liu y Chen, 2004). Se ha observado que después de una baja concentración de oxígeno hay un decremento en el conteo de hemocitos de *L. vannamei* y una mayor susceptibilidad a infección por *Vibrio alginolyticus* (Le Moullac et al., 1998). La exposición a cambios en la salinidad produce efectos similares a los anteriormente descritos (Wang y Chen, 2005).

Las ERO deben ser eliminadas por moléculas antioxidantes, por lo que son potentes indicadores del estado de salud en organismos marinos (Roch, 1999; Neves et al., 2000; Downs et al., 2000; Rodríguez y Le Moullac, 2000). Se ha mostrado que las infecciones virales están asociadas con un incremento en el nivel de ERO que pueden dar lugar al daño oxidativo de lípidos y proteínas en membranas celulares y

subcelulares (Skulachev, 1998). Muñoz et al., (2002) demostraron que en *L. vannamei* la fagocitosis es realizada principalmente por los hemocitos hialinos. Por otra parte, varios autores han presentado evidencia de la producción intracelular de ERO en ensayos *in vitro* de fagocitosis realizados con hemocitos de camarón (Song y Hsieh, 1994; Muñoz et al., 2000).

Las ERO no distinguen entre células propias y microbios, lo que implica que son capaces de causar daño en caso de actuar en espacios extracelulares. Todos los organismos producen ERO continuamente, en particular, $O_2^{\bullet-}$, el cual es considerado la ERO producida en mayor medida por las células vivas (Halliwell y Gutteridge, 1999).

2. 3 Estrés oxidativo en crustáceos

La mayoría de los estudios de estrés oxidativo en crustáceos se restringen a su presencia, así como a su acción durante exposición a xenobióticos (Le Moullac y Haffner, 2000), aunque se reconoce que el sistema antioxidante es un componente importante para el mantenimiento del organismo. Las células eliminan a las ERO mediante la acción de los antioxidantes endógenos que actúan *in vivo* para proveer protección al organismo frente al daño oxidativo (Wayner et al., 1987). Se ha encontrado que la generación de metabolitos tóxicos se incrementa de manera significativa en condiciones patológicas cuando el flujo de ERO excede la capacidad de los mecanismos antioxidantes (McCord, 1988). Aun así, la información sobre la actividad de las enzimas antioxidantes en los organismos marinos es escasa.

En las células existe un delicado balance entre los prooxidantes y las defensas antioxidantes. Cuando las defensas antioxidantes son sobrepasadas por los prooxidantes, lo cual da origen a daño oxidativo, se presenta un estado de estrés oxidativo (Sies, 1986). El incremento en la actividad de enzimas detoxificantes en respuesta a un aumento en la producción de ERO parece ser un fenómeno natural; mientras que los cambios de la actividad enzimática han sido bien documentados en invertebrados y vertebrados, se han hecho pocos estudios en crustáceos.

Se han encontrado variaciones en los patrones de expresión de proteínas al comparar camarones *P. monodon* sanos e infectados con VSMB en ciertos tejidos. Se encontraron 11 bandas de nuevas proteínas y algunas otras sobreexpresadas en hospederos infectados, tanto de manera natural como experimental, relacionadas al grado de la dosis viral, infectividad y patogenicidad de VSMB en comparación con organismos sanos (Ramesthangam y Ramasamy, 2005).

La peroxidación de lípidos y, consecuentemente, el daño tisular es el mayor problema asociado con la pérdida del balance entre prooxidantes y las defensas antioxidantes. En algunas especies de crustáceos se ha encontrado evidencia de daño oxidativo a tejidos, reportado como incremento de los niveles de lípidos peroxidados, esto es significativo ya que los peróxidos lipídicos pueden ser, por sí solos, radicales libres con constantes de larga reacción (Ramesthangam y Ramasamy, 2006). Los peróxidos e hidroxiradicales, entre otros, pueden atacar moléculas como el ADN, ARN, enzimas, proteínas, fosfolípidos, y por ende, dañar la integridad de las membranas, lo que da lugar a muerte celular (Kidd, 1991).

Todos los organismos marinos contienen altos niveles de ácidos grasos poliinsaturados que son sustratos para la peroxidación de lípidos (Liu et al., 1997). El incremento en la peroxidación de lípidos puede dar lugar a la producción de malondialdehído (MDA) que aumenta la formación de radicales libres de ácidos poliinsaturados en las membranas de las células. Un reto patogénico, como el producido por bacterias, hongos e infecciones virales, también puede inducir peroxidación de membranas lipídicas (Chih et al., 2003).

El trabajo de Ramesthangam y Ramasamy (2006) señala que en *P. monodon* infectado con VSMB hay un incremento en la peroxidación de lípidos en todos los tejidos y un sustancial decremento de la actividad de las enzimas antioxidantes y ATPasas de membrana al comparar con el control. Estos datos en tejidos infectados sugieren que los camarones sufrieron estrés oxidativo debido al incremento en la producción y acumulación de ERO generados en crustáceos en respuesta a microorganismos invasores, como virus, bacterias y hongos (Rameshthangam y

Ramasamy, 2006).

Es claro el decremento en la actividad de las enzimas antioxidantes en los tejidos (hepatopáncreas, branquias, músculo, corazón, ojo y hemolinfa) infectados con VSMB en *P. monodon* al comparar con los camarones no infectados (Rameshtahangam y Ramasamy, 2006; Mathew, et al., 2007). Un decremento en el contenido de GSH puede disminuir la actividad de las enzimas antioxidantes y agravar el efecto del estrés oxidativo (Garg et al., 1996). Las ERO atacan aminoácidos altamente reactivos como arginina e histidina, lo que resulta en modificaciones químicas de la estructura de las proteínas y pérdida de actividad enzimática (Mallinowsky y Fridovich, 1979).

La dinámica de ocurrencia de patógenos en sistemas acuáticos está probablemente modulada por parámetros ambientales, tales como salinidad y temperatura (Jiménez et al., 2000). En camarón café (*Farfantepenaeus californiensis*) se encontró una reducción del sistema profenoloxidasas (proPo) a 32°C, la constancia de los valores de proPo en animales mantenidos a 18-28°C es compatible con la idea de que el camarón café es capaz de mantener una adecuada actividad de proPo a estas temperaturas y que la temperatura óptima para su crecimiento es alrededor de 25°C (Vargas-Albores et al., 1998, Villarreal y Ocampo, 1993). Esto apoya la importancia de la temperatura en el mantenimiento de los mecanismos de defensa del camarón.

La susceptibilidad al VSMB es menor en temperaturas cálidas, temperaturas inferiores a 30°C se consideran como un factor de riesgo. En estanques comerciales se han observado mayores pérdidas en la estación fría-seca que en la estación cálida-lluviosa (Jiménez et al., 2000; Rodríguez et al., 2003). En ensayos de exposición a diferentes temperaturas se ha detectado resistencia y sobrevivencia del 100 % en condiciones de hipertermia observándose que el aumento de la temperatura incentiva la proliferación de los hemocitos lo que favorece también la infiltración de éstos a los tejidos como parte de la respuesta inmune (Vidal et al., 2001; Sonnenholzner et al., 2002). Así mismo, resulta interesante el hecho de que los animales infectados con VSMB mueren en postmuda (Echeverría et al., 2002), lo que sugiere una mayor

susceptibilidad al virus durante la premuda tardía, tal como ha sido reportado para el síndrome del virus del taura (SVT) por Hasson et al. (1999). Otros autores también sugieren que la respuesta del sistema inmune podría ser responsable de las diferencias en la susceptibilidad a las enfermedades de acuerdo a las estaciones o la temperatura (Jiménez et al., 2000).

3. JUSTIFICACIÓN

El camarón blanco, *L. vannamei*, es la especie de mayor importancia para el cultivo en México el cual ha sido afectado de manera importante por el VSMB. Se sabe que la manifestación del VSMB es consistente a una temperatura de 27°C. Sin embargo, no se ha evaluado el efecto de esta temperatura sobre la expresión de la enfermedad de la mancha blanca y el grado de perturbación que sufren los organismos en términos de estrés oxidativo.

El efecto de la temperatura en la infección con VSMB en especies de crustáceos del alto Golfo de California es incierta. Es necesario estudiar las alteraciones en la producción de ERO, daño oxidativo y las defensas antioxidantes en *L. vannamei*, con y sin infección de VSMB expuestos a 27°C, dadas las alteraciones en el sistema de defensa antioxidante.

4. OBJETIVOS

Evaluar los cambios en el daño oxidativo y la actividad de las principales enzimas antioxidantes en camarón blanco (*L. vannamei*) en el transcurso de la infección de virus del síndrome de la mancha blanca, así como el grado de replicación viral bajo diferentes tiempos post-infección.

4. 1 Objetivos particulares

- Evaluar los niveles de replicación viral mediante el análisis de PCR tiempo real cuantitativo (qPCR) en hemolinfa de camarón blanco durante la infección por VSMB.
- Determinar la concentración de proteínas y lípidos totales en tejidos de camarón blanco durante la infección por VSMB.
- Analizar la actividad de las principales enzimas antioxidantes (SOD, CAT, GPx, GR y GST) en tejidos de camarón blanco durante la infección por VSMB.
- Cuantificar el daño oxidativo (peroxidación de lípidos y proteínas carboniladas) en tejidos de camarón blanco expuesto a infección por VSMB.

5. HIPÓTESIS

A mayor grado de infección se espera encontrar mayor daño oxidativo y un decremento en la actividad de las enzimas antioxidantes en camarón blanco, lo que pudiera indicar el grado de trastorno que sufre el organismo en términos de estrés oxidativo durante el transcurso de la infección por VSMB.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6. 1 Diseño experimental

Se utilizaron organismos juveniles de *L. vannamei* con un peso de entre 9 y 12 g obtenidos de una granja de Guaymas, Son. Los organismos fueron aclimatados al sistema experimental en el laboratorio para bioensayos de CIBNOR, Unidad Hermosillo. Los organismos se mantuvieron 20 horas bajo condiciones controladas, 38 ups de salinidad, aireación constante (i.e., normoxia) y 27°C de temperatura. Los bioensayos experimentales fueron realizados en CIBNOR-Hermosillo debido a las medidas sanitarias necesarias para el manejo de organismos con VSMB.

6. 2 Bioensayo

Después de la aclimatación, se repartieron 36 organismos previamente pesados en una serie de 6 acuarios con aproximadamente 20 L de agua de mar sintética. En éstos se mantuvieron las condiciones de oxígeno, temperatura y salinidad mencionadas anteriormente (Fig. 4).



Figura 4. Diseño experimental realizado en el laboratorio de bioensayos de CIBNOR, Unidad Hermosillo.

Los camarones ($n=6$) en el acuario número 1 no recibieron tratamiento experimental alguno; éstos se consideraron como organismos control para ser muestreados al final del bioensayo. Los camarones ($n=6$) en el acuario número 2 fueron inyectados vía intramuscular con inóculo inerte, el cual contenía glicerol y solución salina en proporción 1:1 para analizar el efecto de la manipulación y la inyección en los organismos. Los camarones de los acuarios numerados como 3, 4, 5 y 6 fueron inoculados con 50 μL de inóculo viral (Fig. 5)

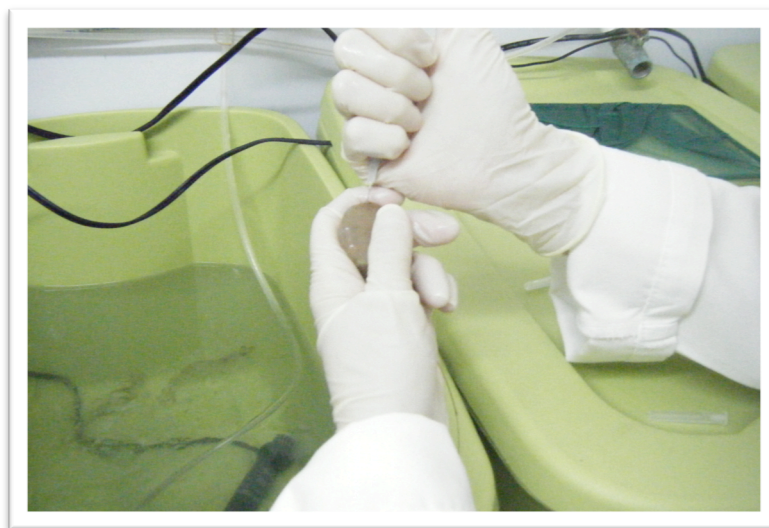


Figura 5. Inyección intramuscular de los camarones *L. vannamei* con virus del síndrome de la mancha blanca.

Los individuos del acuario número 3 fueron muestreados a una hora post-infección (t1) para conocer el primer efecto del inóculo viral. Los camarones del acuario número 4 fueron muestreados 24 horas post-infección (t24) y, finalmente, los del acuario número 5 se muestrearon 48 horas después de la infección (t48), momento en que se dio por terminado el bioensayo debido a la muerte prematura de los organismos restantes (acuario número 6, mortalidad del 80 % a las 50 horas post-infección).

6. 3 Muestreo de los organismos

Para los muestreos, se tomaron 6 organismos de cada acuario a los cuales se les extrajo hemolinfa inmediatamente. Se tomó al camarón con la mano y se utilizó el dedo índice para inmovilizar el cefalotórax. Con una jeringa para insulina se extrajeron 300 μ L de hemolinfa de la zona ventral entre el último par de pereiópodos y el primer par de pleópodos del segmento abdominal. Antes del muestreo, cada jeringa fue enjuagada y llenada con 300 μ L de solución anticoagulante 20 mM EDTA (Hernández, 1992) y enfriada. Se extrajeron 300 μ L de hemolinfa para tener una proporción 1:1 de hemolinfa y anticoagulante.

De la muestra de hemolinfa con anticoagulante se separó una muestra de 100 μ L para análisis de qPCR en el laboratorio de Sanidad Acuícola de CIBNOR Hermosillo. Estos datos fueron utilizados para corroborar la presencia del VSMB en la muestra de hemolinfa así como el grado de replicación viral bajo los diferentes tratamientos. Estos procedimientos se realizaron para todos los organismos del experimento. Posterior a la extracción de hemolinfa, los organismos fueron pesados y después congelados en un contenedor de nitrógeno líquido para detener toda reacción enzimática. En el laboratorio seco, los organismos fueron disectados y se extrajeron aproximadamente 150 mg de branquias, músculo y hepatopáncreas de cada organismo. Los tejidos se depositaron en viales con aproximadamente 1% de solución fenil-metil-sulfonil fluoruro (PMSF) (1 mM en etanol) como inhibidor de proteasas, y se almacenaron a -80 °C hasta realizar los análisis bioquímicos pertinentes.

6. 4 Cuantificación de VSMB por PCR Tiempo-Real

Extracción de ADN

La extracción se realizó por medio del Kit Silica-Extraction componente del sistema de IQ REAL™ WSSV Quantitative System (GeneReach Biotechnology Corp). Se tomaron 100 μ L de hemolinfa diluida en anticoagulante (1:1) de cada muestra en tubos de 0.5 mL y se lavó con 500 μ L de GT buffer y 30 μ L de sílica para obtener un pellet mediante centrifugación. Posteriormente el pellet se dejó secar 10 min. Se agregó a cada tubo 500 μ L de GT buffer y 1 mL de etanol al 70% para deshacer y lavar el pellet. A los tubos anteriores se les adicionó 1 mL de DEPC dd H₂O para resuspender el pellet de sílica y se incubaron a 55 °C por 10 min para finalmente centrifugar. 500 μ L de la solución obtenida para cada muestra fue transferida a tubos de 1.5 mL para las reacciones posteriores.

Amplificación de reacción

Se cuantificó la concentración del VSMB por medio de RT-PCR cuantitativo (qPCR), utilizando un equipo Corbett Research Rotor-Gene 3000 con el sistema de diagnóstico de IQ REAL™ WSSV Quantitative System (GeneReach Biotechnology Corp).

Para la amplificación se agregó a cada tubo de reacción 23 μ L de la mezcla de IQzyme DNA polimerasa y Real-Time PreMix (buffer de reacción, mezcla de dNTPs y primers específicos para detección de partículas de VSMB). Posteriormente se agregaron 2 μ L de la muestra obtenida de la extracción de ADN o estándar y se realizó la reacción de PCR tiempo real.

Preparación de homogenizados

Previo a los análisis de lípidos totales, proteínas totales y actividad enzimática se prepararon homogenizados de cada uno de los tejidos colectados, músculo, branquias y hepatopáncreas. Se pesaron 100 mg de tejido en un tubo de vidrio y se homogenizaron con 2 mL de solución amortiguadora de fosfatos (50 mM, pH 7.5, EDTA 60 mM). Las muestras ya homogenizadas fueron centrifugadas por 15 minutos a 3000 rpm y se recuperaron los sobrenadantes que fueron utilizados inmediatamente para el análisis de actividad enzimática y posteriormente utilizados para determinar la concentración de lípidos y proteínas (Hermes-Lima y Storey, 1995). Todas las muestras se analizaron por triplicado.

6. 5 Variables Bioquímicas

6. 5. 1 Lípidos Totales

Se utilizó el kit de Randox (Randox Laboratories LTD (Antrim, UK)). El principio de este ensayo se basa en que los lípidos reaccionan con ácido sulfúrico, ácido fosfórico y vanilina para formar un complejo de color rosado. Para iniciar la reacción colorimétrica, se preparó una serie de 2 crioviales limpios para cada muestra, 2 blancos y una curva patrón de 6 puntos. Se pipeteó 0.25, 0.20, 0.15, 0.10, 0.05 y 0.02 mL de la solución patrón para formar la curva estándar, 0.025 mL de la muestra de cada homogenizado de las muestras y después tanto a los tubos con la muestra, como a aquellos con la curva estándar, se adicionó cuidadosamente 1 mL de ácido sulfúrico concentrado en el fondo del tubo. Posteriormente, se taparon los tubos, se agitaron suavemente invirtiéndolos 3 veces y se dejaron reposar en un baño de agua caliente a

90°C durante 10 minutos. Al terminar este lapso de tiempo se retiraron los tubos y fueron colocados en un baño de agua fría (0-5°C) para detener la reacción.

Después del baño, se tomaron 10 μL de cada muestra por duplicado, al igual que de la curva, se colocaron en una microplaca a la cual se adicionó 200 μL de la solución colorante para cada pozo. Para el blanco se pipetearon 10 μL de ácido sulfúrico al cual se le adicionó 200 μL de la solución colorante para obtener un volumen final de 210 μL para todos los pozos. La microplaca se incubó durante 25 minutos para posteriormente leer la absorbancia de la muestra y la curva estándar frente al blanco a 546 nm.

6. 5. 2 Proteínas totales

La cantidad de proteínas solubles en los extractos tisulares se midió para estandarizar los valores de actividad enzimática, mediante un kit comercial (Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA) basado en el método descrito por Bradford (1976) adaptado a microplaca. Este ensayo se basa en la reacción de los grupos amino libres presentes en la muestra con azul de Coomassie en presencia de ácido fosfórico y metanol. El complejo que se forma con la proteína y el colorante es determinado a 565 nm con una absorbancia proporcional a la concentración de proteína.

La concentración presente en la muestra se estimó al comparar con una curva estándar de 7 puntos de albúmina sérica bovina (ABS, 2 mg mL⁻¹) en el rango de concentraciones de 0.005 a 0.2 mg mL⁻¹ de ABS el cual se realizó por triplicado al igual que las muestras (dilución 1:100). La cantidad de proteínas solubles se calculó a partir de la ecuación de la recta ajustada a la curva estándar y se expresó en mg de proteína mL⁻¹.

6. 6 Análisis de Actividad Enzimática

6. 6. 1 Superóxido dismutasa (SOD) (EC 1.15.1.1)

Para la determinación de la actividad de la enzima SOD se utilizó el sistema xantina/xantina oxidasa como generador constante de $O_2^{\bullet-}$. El nitroazul de tetrazolio (NBT) reduce al $O_2^{\bullet-}$ y forma un producto de color rosa llamado formazán que es detectado a 560 nm cuando la SOD inhibe la reducción del NTB (Suzuki, 2000).

En una celda de plástico se mezcló solución de trabajo (solución amortiguadora sodio-carbonato 50 mM, xantina 0.1 mM, NBT 0.025 mM, EDTA 0.1 mM), XO (1 U mL⁻¹ en sulfato de amonio 2 M) y 25 μ L de solución para homogenizar (como blanco) o muestra. Se registró el cambio en la absorbancia cada 30 segundos durante 5 minutos en espectrofotómetro (Jenway 6505 uv/vis, Jenway Ltd., Londres, R. U.; Beckman-Coulter Du 800, Fullerton, CA) y se obtuvo el cambio en la absorbancia por minuto a 560 nm (ΔA_{560}) para el cálculo de la actividad enzimática de SOD. Los resultados se expresaron en U SOD mg proteína⁻¹ y cada unidad de actividad de SOD se define como la cantidad de enzima necesaria para inhibir el 50 % de la reacción del $O_2^{\bullet-}$ con el NBT.

6. 6. 2 Catalasa (CAT) (EC 1.11.1.6)

Para determinar la actividad de CAT se utilizó H_2O_2 como sustrato y se dio seguimiento al decremento continuo de la concentración de H_2O_2 a 240 nm (Aebi, 1984).

En una celda de cuarzo se leyó la absorbancia de la solución de trabajo (buffer de fosfatos 0.1 mM y solución stock de H_2O_2 20 mM) para calcular la concentración de H_2O_2 , manteniéndola en el rango de 0.45 a 0.5 mmol L⁻¹; posteriormente, se agregó 10 μ L de la muestra. Se registró la absorbancia cada 15 segundos durante 3 minutos a 240 nm y se calculó el ΔA_{240} . Los resultados se expresaron en U CAT mg proteína⁻¹; donde una unidad de catalasa se define como la cantidad de enzima necesaria para reducir un

$\mu\text{mol de H}_2\text{O}_2 \text{ minuto}^{-1}$.

6. 6. 3 Glutación peroxidasa (GPx) (EC 1.11.1.9)

Esta enzima es encargada de catalizar la reacción de H_2O_2 con GSH. La actividad de la GPx selenio-dependiente se calculó mediante el seguimiento del decremento continuo en la concentración de NADPH al mantener constantes los niveles de GSH y al usar H_2O_2 como sustrato (Flohé y Günzler, 1984).

Se analizó la absorbancia a 340 nm cada 3 s durante 40 s y se calculó el ΔA_{340} . Se corrieron simultáneamente dos blancos, uno sin H_2O_2 y otro sin muestra. El consumo basal de NADPH (0.25 mM) se determinó en un buffer de fosfatos (50 mM) que contenía azida de sodio (2 mM), glutatión (5 mM), GR (1.5 U mL^{-1}) y la muestra. La actividad enzimática se calculó mediante el coeficiente de extinción del NADPH (6.22 mL^{-1}) y se expresó en miliunidades de GPx mg proteína^{-1} . Una unidad de GPx se define como la cantidad de enzima necesaria para oxidar $1 \mu\text{mol}$ de NADPH por minuto.

6. 6. 4 Glutación-S-transferasa (EC 2.5.1.18)

La actividad de GST se calculó mediante el seguimiento de la formación del complejo tioéter-glutatión-dinitrobenceno, como producto de la reacción de GSH con 1-cloro-2,4- dinitrobenceno (CDNB) (Habig y Jakoby, 1981). Se analizó la aparición del complejo tioéter glutatión dinitrobenceno a 340 nm, cuando se conjugaron GSH y CNDB; la conjugación del sustrato CNDB se determinó mediante una solución de corrida (buffer de fosfatos 0.1 M pH 7.0, GSH 10 mM, EDTA 60 mM y agua desionizada) como blanco y posteriormente se agregó la muestra, se registró la absorbancia cada 30 segundos durante 6 minutos, y se tomó en cuenta 9.6 como el coeficiente de extinción del CNDB.

Se calculó la actividad con base en el ΔA_{340} y se expresó en miliunidades de GST por mg de proteína. Una unidad de GST se define como la cantidad de enzima que sintetiza $1 \mu\text{mol}$ de producto por minuto.

6. 6. 5 Glutación disulfuro reductasa (EC 1.6.4.2)

La actividad de GR se calculó mediante el seguimiento de la oxidación de NADPH por GSSG (Goldberg y Spooner, 1983, Hermes-Lima y Storey, 1995). La actividad catalítica de GR se midió mediante el decremento continuo de NADPH por oxidación a 340 nm basado en el método de Goldberg y Spooner (1987).

El consumo basal de NADPH (0.25 mM) se determinó en un buffer de fosfatos (50 mM) que contenía EDTA 50 mM, NADPH 2 mM, agua desionizada, muestra y glutación reducido (GSSG) (1 μ M). Se registró la absorbancia cada segundo durante 40 segundos a 340 nm (ΔA_{340}), se corrieron dos blancos, uno sin muestra y otro sin GSSG y se mantuvo un volumen final de 1 mL. La actividad de la enzima se determinó mediante el coeficiente de extinción del NADPH 6.22 m L^{-1} y se expresó en mU de GR por mg de proteína. Para ello se definió una unidad de GR como la cantidad de enzima necesaria para reducir 1 μ mol de GSSG por minuto.

6. 7 Daño oxidativo

6. 7. 1 Proteínas carboniladas

El daño oxidativo a proteínas se midió mediante la cantidad de derivados carbonilos de las proteínas que se forman a partir de reacciones en las que interactúan aldehídos procedentes de la peroxidación de lípidos o de la oxidación de carbohidratos con proteínas, de acuerdo con la técnica de Levine et al. (1990, 1994). En esta metodología, se mide la formación de un complejo entre los derivados carbonilados de las proteínas y la 2,4-dinitrofenil hidrazina (DNPH).

50 mg de cada muestra de tejido y 50 μ L de la muestra de hemolinfa, fueron homogenizadas agregando 1 mL de ácido sulfosalicílico frío al 5 % y posteriormente centrifugadas a 15000 rpm a 4°C durante 5 min. Se eliminó el sobrenadante y se agregó DNPH (10 mM en HCl 2 M) a los precipitados; a continuación, se incubaron por 1 h a temperatura ambiente mientras se agitaban por lapsos de 40 s en intervalos de 15

minutos. Inmediatamente, se adicionó 0.5 mL de TCA al 20 % a los tubos, los cuales fueron nuevamente centrifugados a 15000 rpm a temperatura ambiente durante 5 min. Se desecharon los sobrenadantes, se lavó 3 veces con una mezcla de etanol y acetato de etilo (1:1) y después de cada lavado se centrifugaron las muestras a 15000 rpm por 5 min a temperatura ambiente. Transcurrido el centrifugado, los precipitados fueron disueltos en clorato de guanidina (6 M), el cual, en molaridades altas, se encarga de desnaturalizar las proteínas. Se incubaron los tubos por 15 min a 37°C y posteriormente fueron centrifugados a 15000 rpm por 5 min.

Se recuperaron los sobrenadantes en celdas de plástico las cuales se leyeron en un espectrofotómetro con barrido en el rango de 360-410 nm, se registró la absorbancia máxima para obtener la concentración final de proteínas carboniladas mediante el coeficiente de extinción de 22 mmol L⁻¹. En paralelo con las muestras se prepararon blancos en los cuales se reemplazó la DNPH con HCl (2 M) siguiendo la misma metodología. Los resultados se expresaron en nanomoles de carbonilos proteicos por g de tejido húmedo.

6. 7. 2 Peroxidación de lípidos (TBARS)

El contenido de sustancias reactivas al ácido tiobarbiturico (TBA) se utilizó para determinar la cantidad de peroxidación de lípidos en las muestras. Los niveles de TBARS fueron evaluados mediante la medición de la concentración de MDA. El MDA es un pigmento rosa cristalino que se forma cuando los hidroperóxidos y aldehídos lipídicos producto de peroxidación de lípidos reaccionan con el TBA y cuya absorción se registra a 532-535 nm (Okhawa et al. 1979; Persky et al. 2000).

Se utilizaron 50 µL de hemolinfa y 50 mg de tejido para cuantificar los niveles de TBARS. Los tejidos se homogenizaron en 1 mL de solución salina para crustáceos (SIC) fría; los tejidos homogenizados y la hemolinfa se centrifugaron a 3000 rpm a 4°C durante 10 min. Posteriormente, se tomó 250 µL del sobrenadante, se colocó en tubos, los cuales fueron incubados en un baño de agua con agitación continua a 37°C. Transcurridos 15 minutos, los tubos se colocaron en un baño de agua con hielo y se les

adicionó 250 μL de ácido tricloroacético (TCA) al 12.5 % (en HCl 1.0 M) para detener la reacción, seguido de 500 μL de TBA al 1 % en agitación. Los tubos fueron incubados nuevamente en un baño de agua a 90° C por 10 minutos, se enfriaron y fueron centrifugados otros 10 minutos a 3000 rpm a 4° C. Se recuperó el sobrenadante de los tubos y se leyó la absorbancia a 532 nm. Los resultados fueron calculados a partir de una curva estándar preparada con una solución de 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP, 10 $\mu\text{moles mL}^{-1}$), corrida en paralelo con las muestras, para ser expresados en nanomoles de TBARS g^{-1} de tejido.

Todos los reactivos utilizados en los análisis bioquímicos de actividad enzimática y daño oxidativo se obtuvieron de Sigma Chemical Co. (San Luis, MO, USA)

6. 8 Análisis Estadísticos

Con los datos obtenidos se realizaron las pruebas básicas de estadísticas descriptivas, pruebas de normalidad (Shapiro-Wilkins) y de homocedasticidad (Levene). Los resultados fueron en su mayoría no normales y se utilizó estadística no paramétrica para su análisis debido a que las transformaciones utilizadas no lograron normalizar los datos. Para detectar diferencias significativas entre tejidos y entre tratamientos se utilizó el análisis de variancia por rangos de Kruskal- Wallis (*K-W*) seguido de una prueba *a posteriori* de Kolmogorov-Smirnov (*K-S*) (Zar, 1999). Para todos los casos se consideró 95 % como nivel de confianza. Se utilizó el análisis multivariado de componentes principales (ACP) para construir variables teóricas mediante la reducción del número de dimensiones que representan las relaciones entre las muestras con las variables analizadas a partir de la matriz de los datos. Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo mediante el uso los paquetes SYSTAT© 12.0 (SPSS, Richmond, CA) y STATISTICA 8. Los datos se reportaron como la media \pm error estándar. Los valores probabilísticos (p) inferiores e iguales a 0.05 fueron considerados estadísticamente significativos.

7. RESULTADOS

7. 1 Análisis de qPCR

Se cuantificó el número de copias virales por qPCR en las muestras de hemolinfa de todos los organismos obtenidos en el bioensayo. Se encontraron diferencias significativas entre todos los tratamientos analizados, el tratamiento donde se encontró el mayor número de fragmentos virales fue a las 48 H Pi.

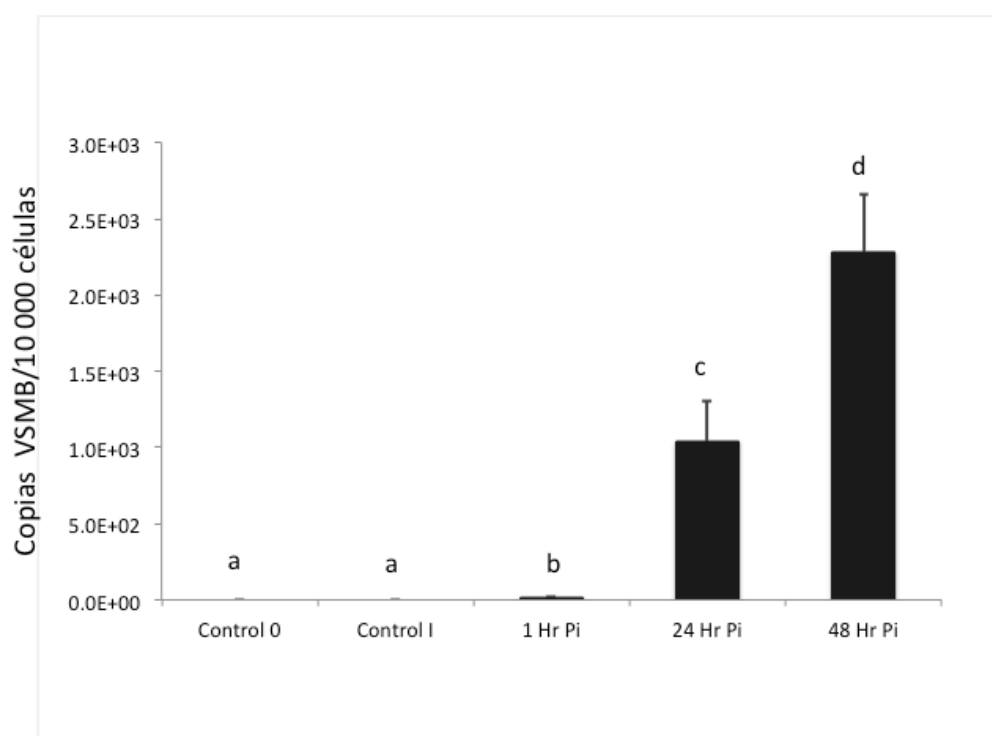


Figura 6. Conteos de fragmentos virales de virus del síndrome de la mancha blanca (VSMB) en hemolinfa. Control 0= No sufrieron tratamiento alguno, Control I = Inyectados con inóculo inerte, 1 H Pi= 1 hora post-infección, 24 H Pi= 24 horas post-infección, 48 H Pi= 48 horas post-infección. Los datos se expresan como promedio \pm error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ($p \leq 0.05$). N=6.

7. 2 Variables bioquímicas

7. 2. 1 Proteínas totales

Los resultados del contenido de proteínas totales en tejidos de camarón blanco sometido a infección por VSMB se resumen en la figura 7 y tabla I. No se encontraron diferencias significativas entre tratamientos en la concentración de proteínas en músculo, branquias y hepatopáncreas.

Se encontraron diferencias entre tratamientos en la concentración de proteínas totales en hemolinfa, el mayor valor se encontró en el Control 0, el cual fue estadísticamente diferente del Control I ($p<0.05$), 1 H Pi ($p<0.05$) y 48 H Pi ($p<0.005$). La concentración de proteínas totales en hemolinfa fue significativamente menor a 1 H Pi en comparación con Control 0 y Control I ($p<0.05$) (Tabla I y Fig.7).

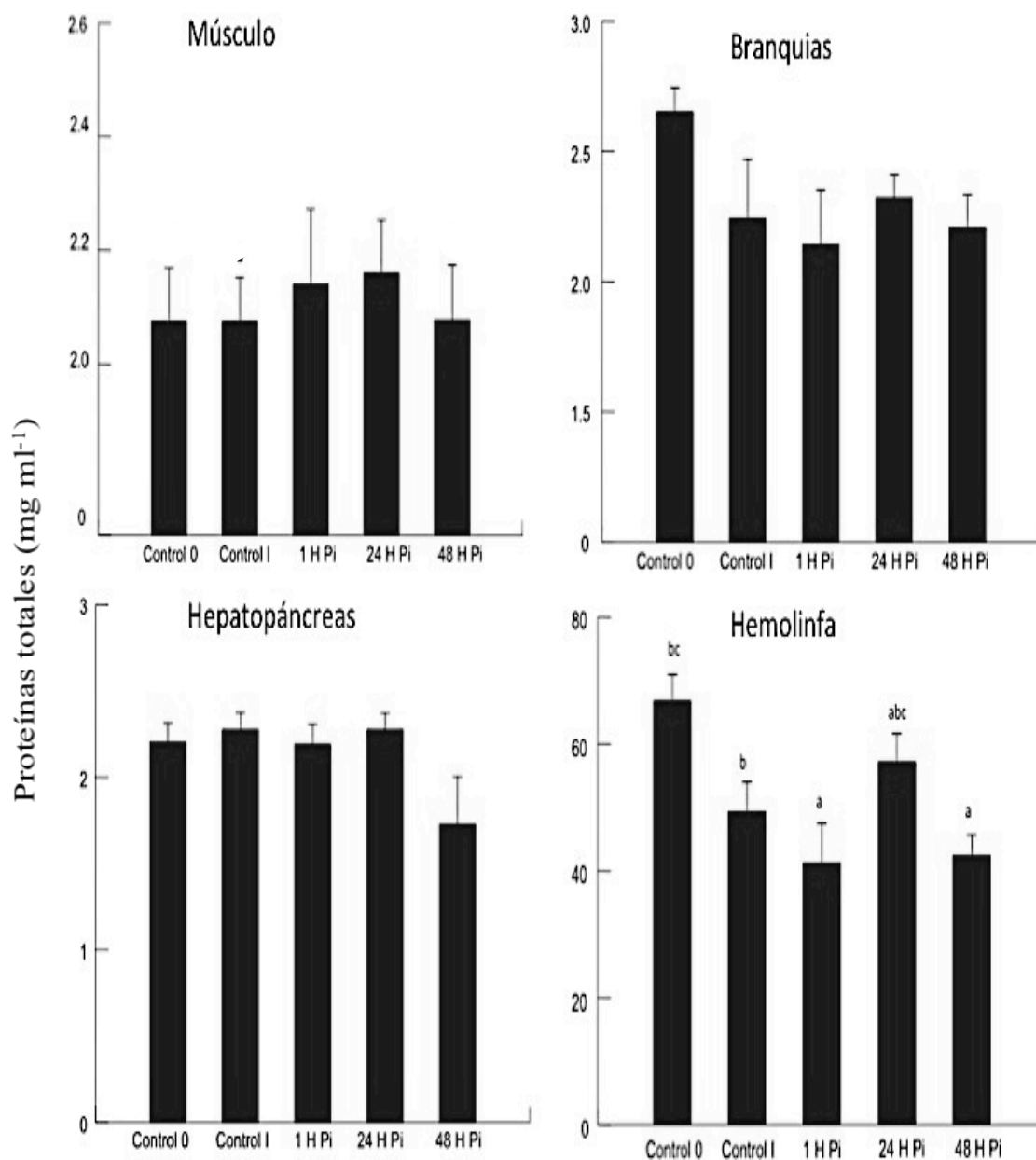


Figura 7. Concentración de proteínas totales (mg mL^{-1}) en tejidos de camarón blanco expuesto a virus del síndrome de la mancha blanca. Control 0= No sufrieron tratamiento, Control I= Inyectados con inóculo inerte, 1 H Pi= 1 hora post-infección, 24 H Pi= 24 horas post-infección, 48 H Pi= 48 horas post-infección. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ($p \leq 0.05$). N=6.

7. 2. 2 Lípidos totales

No se encontraron diferencias significativas entre tratamientos en la concentración de lípidos totales en músculo y en hepatopáncreas de camarón blanco expuesto a VSMB, aunque los menores valores se encontraron en Control I sin resultar significativo en tejidos (Tabla II y Fig. 8).

Se encontraron diferencias entre tratamientos en el contenido de lípidos totales en branquias y hemolinfa. La concentración de lípidos totales de branquias fue significativamente menor en el Control 0 que en todos los tratamientos. La concentración de lípidos totales de branquias en el Control I fue significativamente mayor que aquella del Control 0 ($p < 0.05$), 24 y 48 H Pi ($p < 0.005$ en ambos casos) (Tabla II y Fig. 8). La concentración de lípidos totales en hemolinfa en el tratamiento de 48 H Pi fue estadísticamente mayor que en los tratamientos post-infección a 1 y 24 H ($p < 0.005$) (Tabla II y Fig. 8).

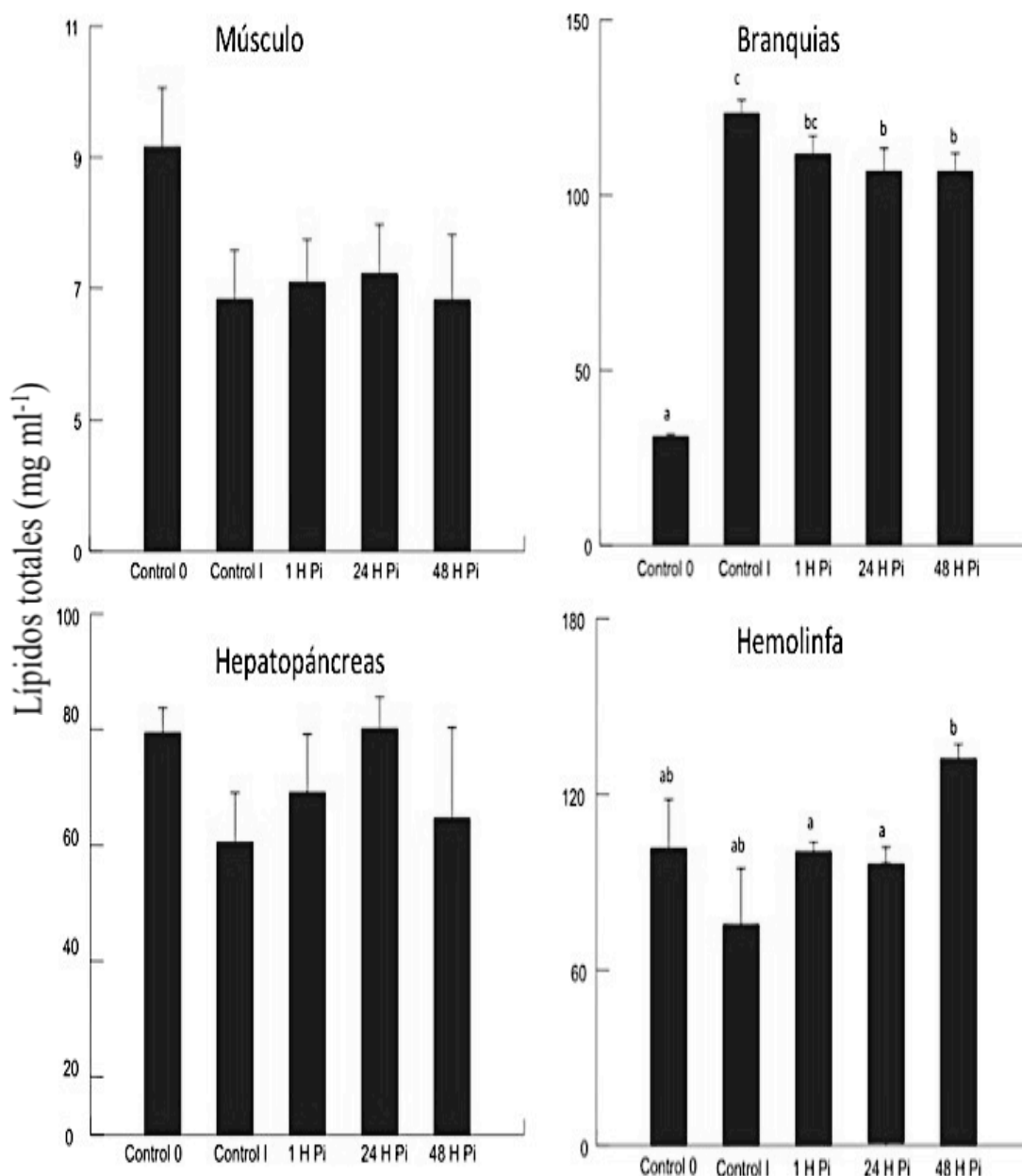


Figura 8. Concentración de lípidos totales (mg mL^{-1}) en tejidos de camarón blanco expuesto a virus del síndrome de la mancha blanca. Control 0= No sufrieron tratamiento, Control I= Inyectados con inóculo inerte, 1 H Pi= 1 hora post-infección, 24 H Pi= 24 horas post-infección, 48 H Pi= 48 horas post-infección. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ($p \leq 0.05$). N=6

7.3 Actividad enzimática

7.3.1 Superóxido dismutasa (SOD)

En músculo de camarón blanco *L. vannamei* expuesto a VSMB la actividad de SOD fue significativamente más elevada a las 24 H Pi en comparación con el resto de los tratamientos ($p < 0.05$). La actividad de SOD en músculo disminuyó considerablemente a las 48 H Pi (Tabla III y Fig. 9) ($p < 0.05$).

En branquias la actividad enzimática de SOD fue más elevada a las 24 H Pi, con un nivel diferente de todos los tratamientos excepto con 48 H Pi ($p < 0.01$) donde se encontró un decremento de la actividad. La menor actividad de SOD en branquias se encontró en el Control I, el cual fue significativamente diferente de todos los tratamientos ($p < 0.005$) (Tabla III y Fig. 9).

La actividad de la enzima SOD en hepatopáncreas fue en aumento conforme avanzó la infección por VSMB y se encontró estadísticamente más elevada a 48 H Pi en comparación con el Control I y el tratamiento 1 H Pi ($p < 0.005$) (Tabla III y Fig. 9).

En hemolinfa la actividad de la enzima SOD fue mayor a 48 H Pi y estadísticamente diferente del Control 0 ($p < 0.05$) (Tabla III y Fig. 9).

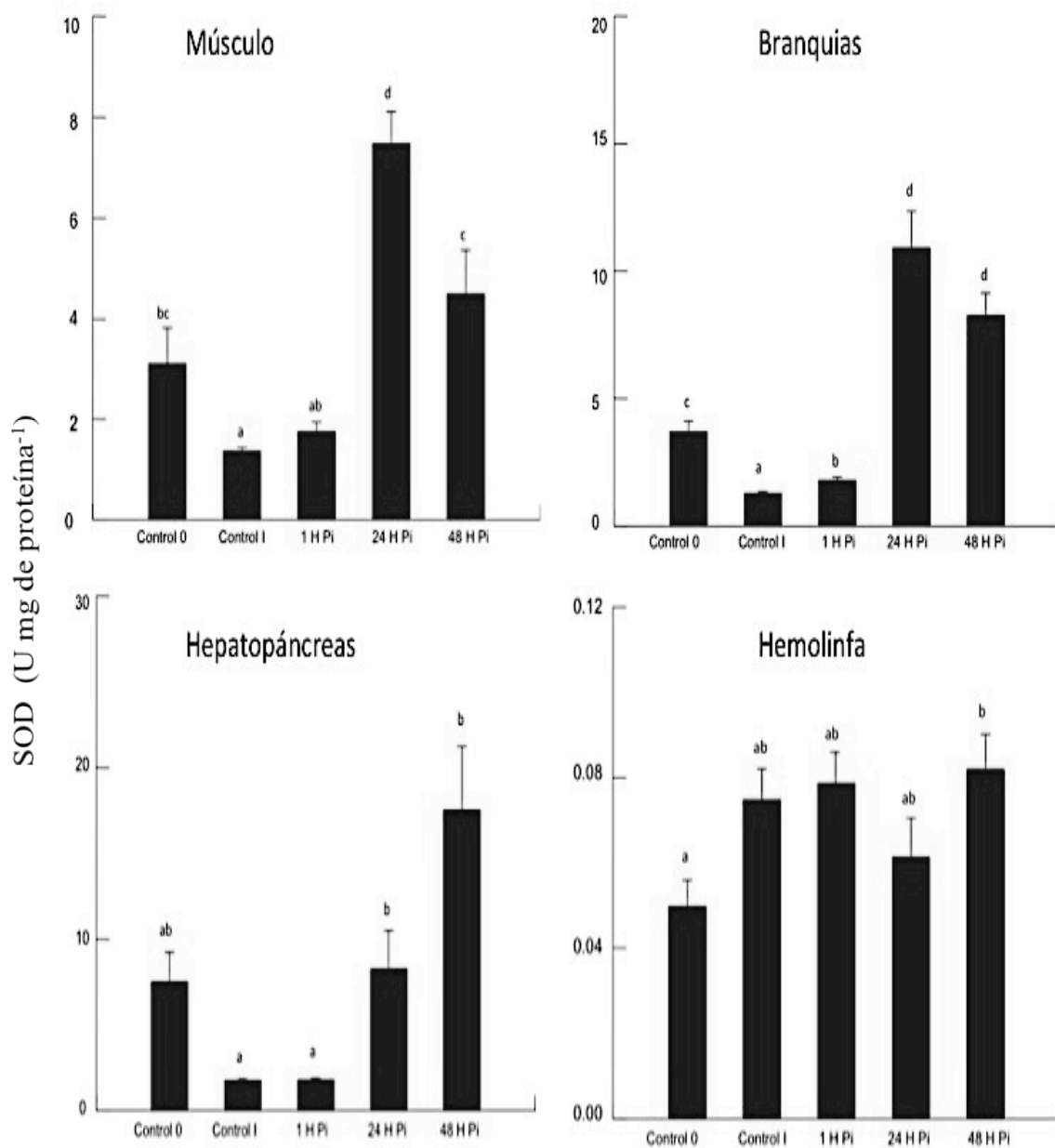


Figura 9. Actividad enzimática de superóxido dismutasa (SOD, U mg de proteína⁻¹) en tejidos de camarón blanco expuesto a virus de la mancha blanca. Control 0= No sufrieron tratamiento, Control I Inyectados con inóculo inerte, 1 H Pi= 1 hora post-infección, 24 H Pi= 24 horas post-infección, 48 H Pi= 48 horas post-infección. Los datos se expresan como promedio \pm error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ($p \leq 0.05$). N=6

7. 3. 2 Catalasa (CAT)

En músculo de camarón blanco expuesto a VSMB la actividad de CAT disminuyó significativamente a 1 H Pi en comparación con el Control 0 ($p < 0.05$) y los tratamientos 24 H Pi y 48 H Pi ($p < 0.005$). La actividad se incrementó significativamente a las 24 H Pi y se encontró una disminución a las 48 H Pi que no fue considerada significativa en el músculo (Tabla IV y Fig. 10).

En branquias la mayor actividad de la enzima CAT se encontró a las 24 H Pi y fue estadísticamente diferente de Control I ($p < 0.005$) y 1 H Pi ($p < 0.05$); a las 48 H Pi la actividad descendió aunque no se encontró una tendencia significativa (Tabla IV y Fig. 10).

En hepatopáncreas la actividad de la enzima CAT fue significativamente mayor a las 24 y 48 H Pi en comparación con los tratamientos Control I y 1 H Pi ($p < 0.005$ en todos los casos) (Tabla IV y Fig. 10).

La actividad de CAT en hemolinfa fue más elevada a 1 H Pi y fue diferente estadísticamente del tratamiento 48 H Pi ($p < 0.05$). La actividad bajó a partir de 24 H Pi, y a 48 H Pi se encontró la menor actividad enzimática de CAT (Tabla IV y Fig. 10).

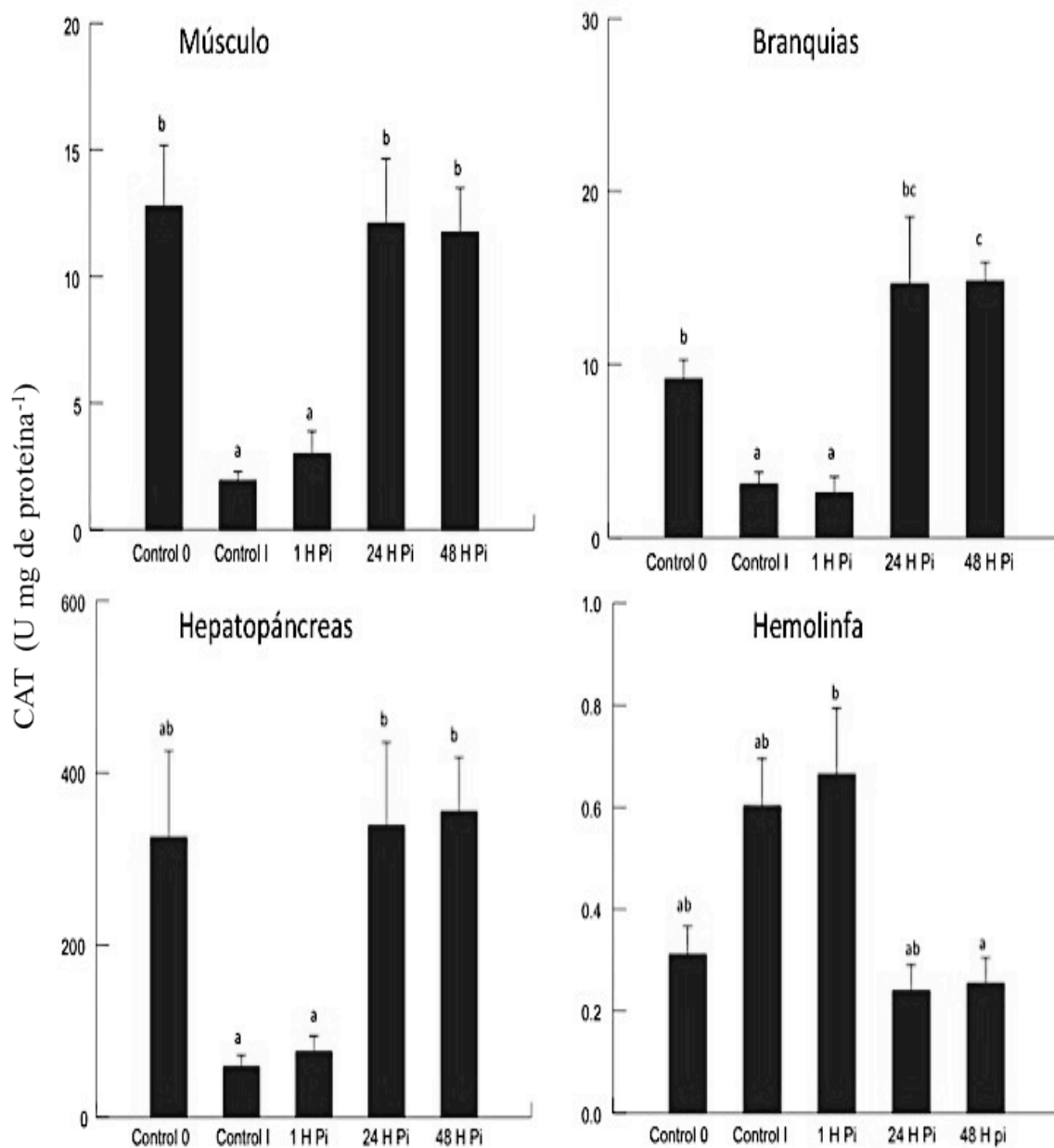


Figura 10. Actividad enzimática de catalasa (CAT, U mg de proteína⁻¹) en tejidos de camarón blanco expuesto a virus de la mancha blanca. Control 0= No sufrieron tratamiento, Control I Inyectados con inóculo inerte, 1 H Pi= 1 hora post-infección, 24 H Pi= 24 horas post-infección, 48 H Pi= 48 horas post-infección. Los datos se expresan como promedio \pm error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ($p \leq 0.05$). N=6

7. 3. 3 Glutación peroxidasa (GPx)

En músculo de camarón blanco expuesto a VSMB la actividad enzimática de GPx disminuyó significativamente a 1 H Pi comparada con el Control 0 y Control I, mientras que la mayor actividad se encontró a las 24 H Pi, y fue diferente del resto de los tratamientos ($p < 0.05$). La actividad de la enzima GPx en músculo a las 48 H Pi fue estadísticamente menor que la del tratamiento 24 H Pi ($p < 0.05$) (Tabla V y Fig. 11).

La actividad de GPx en branquias disminuyó significativamente a 1 H Pi y en Control I al comparar con el Control 0. A su vez, la actividad de GPx en este tejido fue significativamente mayor en los tratamientos a 24 H Pi y 48 H Pi que en el Control I y 1 H Pi ($p < 0.005$ y $p < 0.05$, respectivamente) (Tabla V y Fig. 11).

La actividad de la enzima GPx en hepatopáncreas fue mayor a las 24 H Pi en comparación con los tratamientos Control I, 1 H Pi y 48 H Pi ($p < 0.005$). La actividad de esta enzima mostró un descenso significativo a las 48 H Pi comparado con el tratamiento 24 H Pi ($p < 0.05$) (Tabla V y Fig. 11).

No se encontraron diferencias estadísticas entre tratamientos en la actividad de GPx en hemolinfa, aunque se observó una tendencia no significativa a aumentar la actividad a 1 H Pi y a disminuir a las 24 y 48 H Pi (Tabla V y Fig. 11).

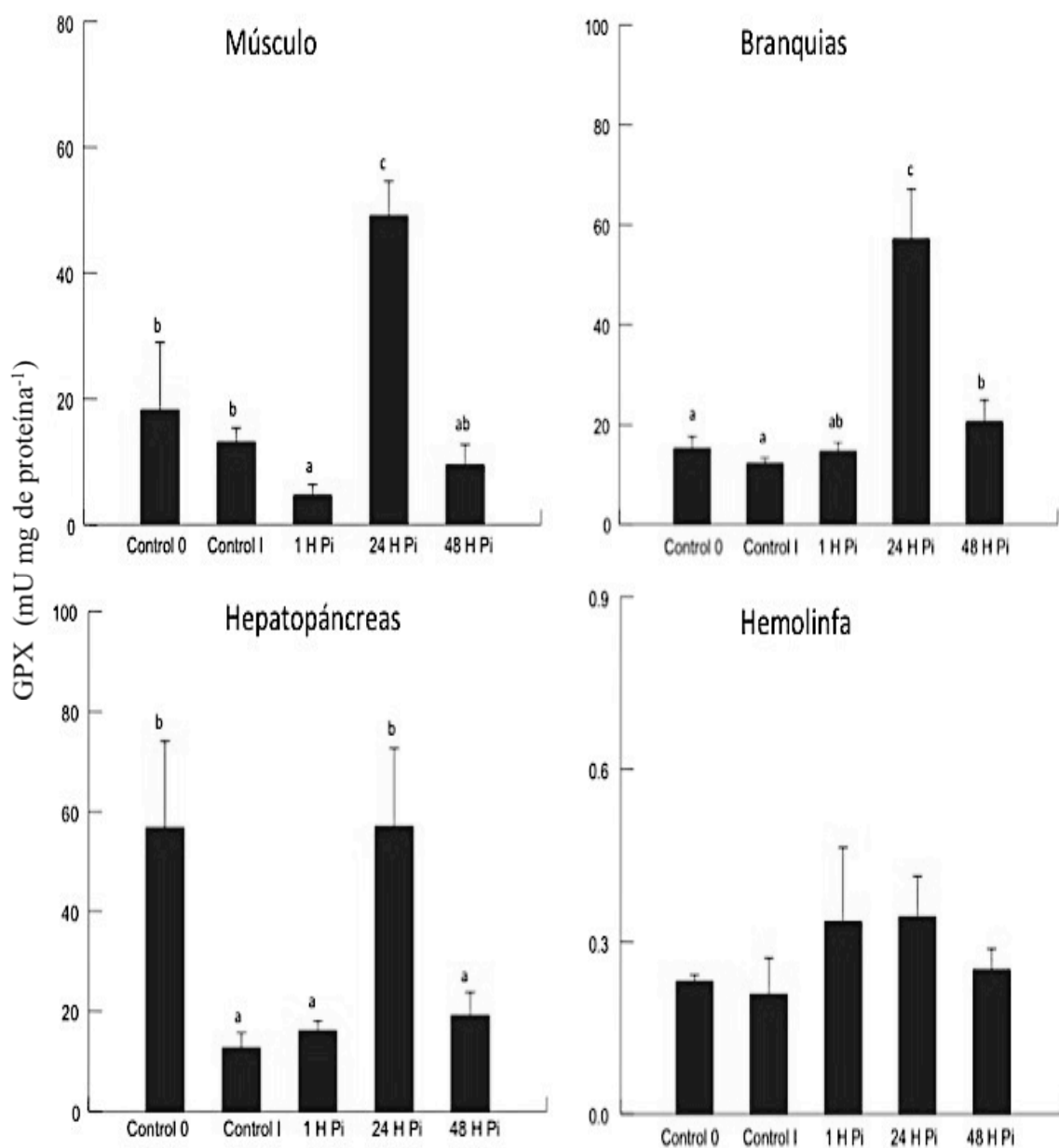


Figura 11. Actividad enzimática de glutatión peroxidasa (GPx, mU mg de proteína⁻¹) en tejidos de camarón blanco expuesto a virus de la mancha blanca. Control 0= No sufrieron tratamiento, Control I Inyectados con inóculo inerte, 1 H Pi= 1 hora post-infección, 24 H Pi= 24 horas post-infección, 48 H Pi= 48 horas post-infección. Los datos se expresan como promedio \pm error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ($p \leq 0.05$). N=6

7. 3. 4 Glutación reductasa (GR)

En músculo de camarón blanco expuesto a VSMB, la actividad enzimática de GR disminuyó significativamente en Control I y después de 1 H Pi, comparada con el Control 0 ($p < 0.05$) (Tabla VI y Fig. 12). El aumento de la actividad se observó a las 24 H Pi y fue diferente únicamente del Control I ($p < 0.005$) y 1 H Pi ($p < 0.05$) (Tabla VI y Fig. 12).

En branquias la actividad de GR fue más elevada en el tratamiento a 24 y 48 H Pi ($p < 0.005$) en comparación con los tratamientos restantes (Tabla VI y Fig. 12). La menor actividad se encontró en el tratamiento Control 0 ($p < 0.05$) (Tabla VI y Fig. 12).

La actividad de GR en hepatopáncreas disminuyó significativamente en Control I y después de 1 H Pi, comparada con el Control 0 ($p < 0.05$) (Tabla VI y Fig. 12). Se encontró más elevada actividad a las 24 H Pi y fue diferente estadísticamente del Control I y 1 H Pi ($p < 0.005$), la actividad disminuyó a las 48 H Pi aunque no se consideró estadísticamente significativo (Tabla VI y Fig. 12).

En hemolinfa de camarón blanco expuesto a infección por VSMB, la actividad de GR estuvo por debajo del límite de detección de la metodología utilizada en este estudio.

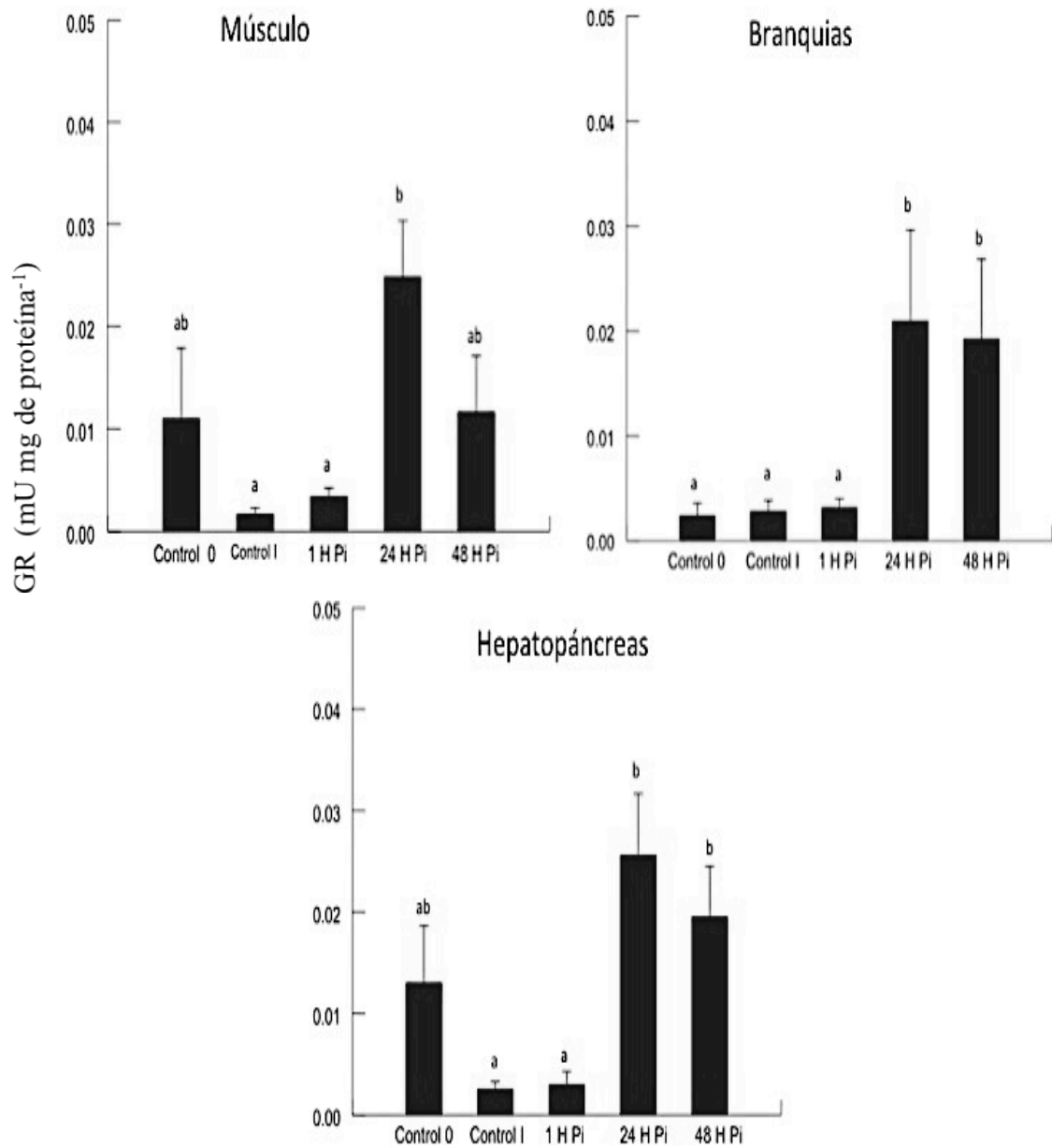


Figura 12. Actividad enzimática de glutatión reductasa (GR, mU mg de proteína⁻¹) en tejidos de camarón blanco expuesto a virus de la mancha blanca. Control 0= No sufrieron tratamiento, Control I Inyectados con inóculo inerte, 1 H Pi= 1 hora post-infección, 24 H Pi= 24 horas post-infección, 48 H Pi= 48 horas post-infección. Los datos se expresan como promedio \pm error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ($p \leq 0.05$). N=6

7. 3. 5 Glutación S- transferasa (GST)

La enzima GST presentó menor actividad en los tratamientos Control I y 1 H Pi comparado con el Control 0 ($p < 0.05$ y $p < 0.005$, respectivamente) en el músculo (Tabla VII y Fig. 13). La actividad de GST aumentó a las 24 H Pi comparado con el Control I ($p < 0.005$) y disminuyó, aunque no de manera significativa, a las 48 H Pi (Tabla VII y Fig. 13).

La actividad de GST fue más alta a 24 H Pi en branquias y fue diferente estadísticamente del resto de los tratamientos ($p < 0.005$), excepto del Control 0 (Tabla VII y Fig. 13). La actividad de GST a las 48 H Pi disminuyó de manera significativa al comparar con el tratamiento a 24 H Pi ($p < 0.05$) (Tabla VII y Fig. 13).

En hepatopáncreas la actividad enzimática de GST fue mayor en el tratamiento 24 H Pi. Sólo se encontraron diferencias significativas entre 48 H Pi y el Control I donde se encontró la menor actividad de GST ($p < 0.05$) (Tabla VII y Fig. 13).

La actividad de GST en hemolinfa fue más elevada en el Control 0 y disminuyó significativamente en el Control I al igual que en el resto de los tratamientos post-infección ($p < 0.05$) (Tabla VII y Fig. 13).

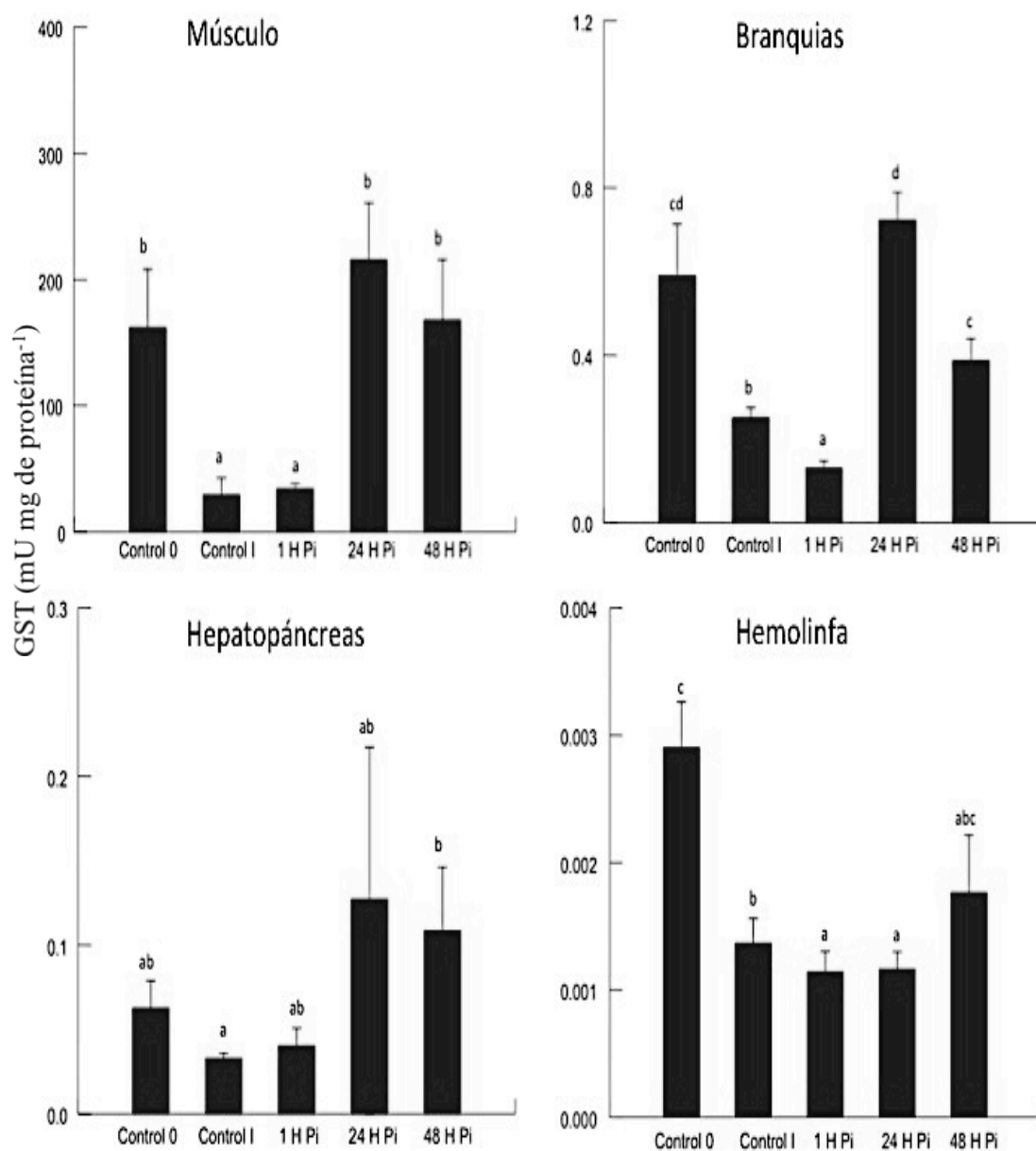


Figura 13. Actividad enzimática de glutatión S-transferasa (GST, mU mg de proteína⁻¹) en tejidos de camarón blanco expuesto a virus de la mancha blanca. Control 0= No sufrieron tratamiento, Control I Inyectados con inóculo inerte, 1 H Pi= 1 hora post-infección, 24 H Pi= 24 horas post-infección, 48 H Pi= 48 horas post-infección. Los datos se expresan como promedio \pm error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.05$). N=6.

7. 4 Daño oxidativo

7. 4. 1 Carbonilos protéicos

El daño oxidativo a proteínas fue más elevado durante los tratamientos post-infección (1, 24 y 48 H) en comparación con los controles aunque no se detectaron diferencias significativas entre los mismos. La concentración de carbonilos protéicos fue menor en el Control 0 en el Control I y los tratamientos post-infección ($p<0.05$ y $p<0.005$, respectivamente) (Tabla VIII y Fig. 14).

El contenido de carbonilos protéicos en branquias aumentó de acuerdo al grado de infección con VSMB y a las 48 H Pi el contenido fue significativamente mayor en comparación con todos los demás tratamientos ($p<0.005$) (Tabla VIII y Fig. 14). La menor concentración se encontró a 1 H Pi y fue significativamente diferente de todos los tratamientos ($p<0.005$) (Tabla VIII y Fig. 14).

En hepatopáncreas el contenido de carbonilos protéicos aumentó conforme avanzaba la infección. En el tratamiento de 48 H Pi la concentración de carbonilos protéicos fue estadísticamente mayor que en Control 0 y Control I ($p<0.005$) (Tabla VIII y Fig. 14).

El contenido de carbonilos protéicos en hemolinfa aumentó de acuerdo al tiempo post-infección y el mayor valor se encontró a las 48 H Pi que fue estadísticamente diferente de Control I y del tratamiento 1 H Pi ($p<0.05$) (Tabla VIII y Fig. 14).

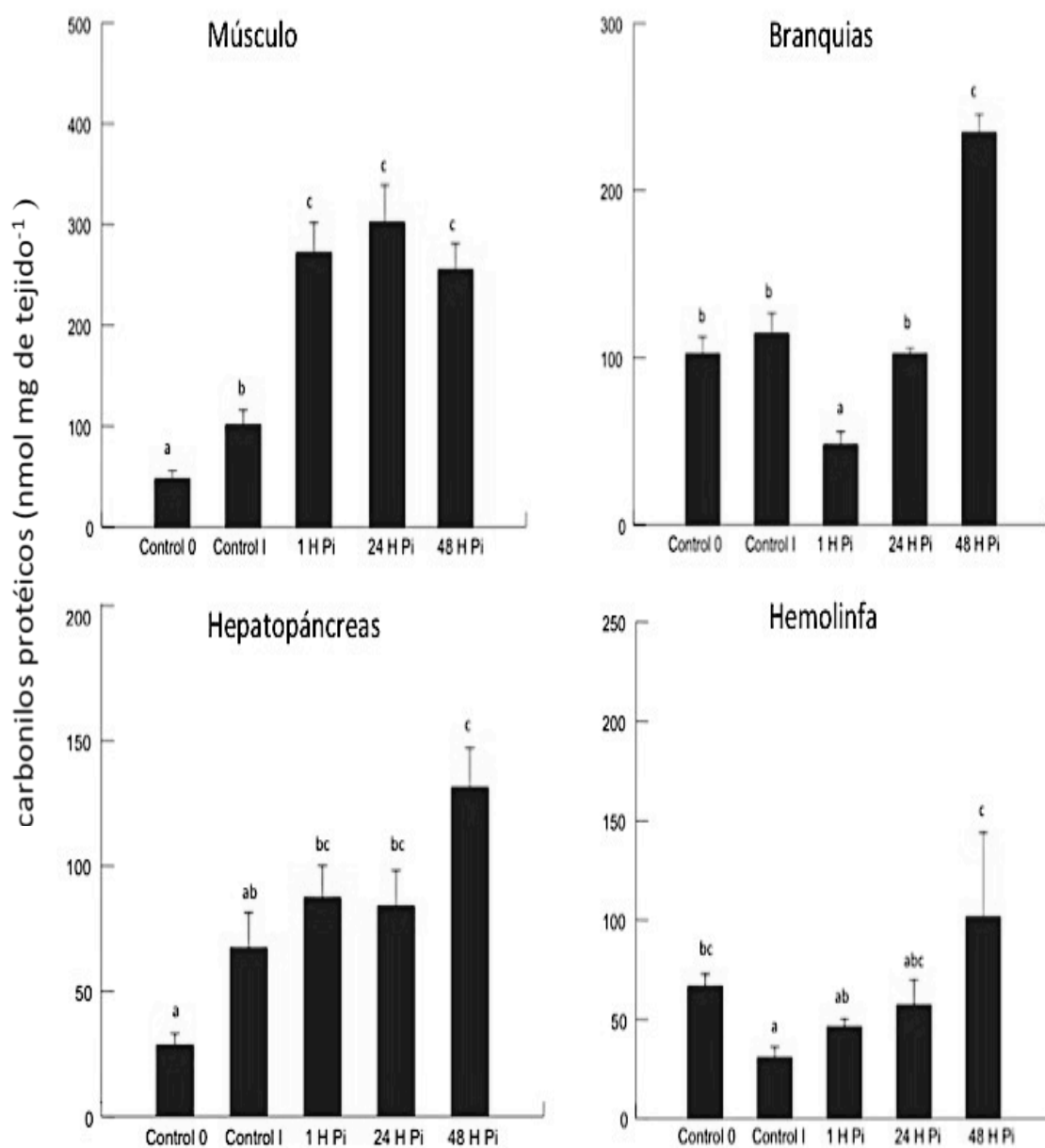


Figura 14. Concentración de carbonilos protéicos (nmol mg de tejido⁻¹) en tejidos de camarón blanco expuesto a virus de la mancha blanca. Control 0= No sufrieron tratamiento, Control I Inyectados con inóculo inerte, 1 H Pi= 1 hora post-infección, 24 H Pi= 24 horas post-infección, 48 H Pi= 48 horas post-infección. Los datos se expresan como promedio \pm error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ($p \leq 0.05$). N=6.

7. 4. 2 Lípidos peroxidados

Los niveles de TBARS encontrados no fueron diferentes entre los Controles I y 0 en músculo, branquias y hemolinfa de camarón blanco (Tabla IX y Fig. 15). La peroxidación de lípidos en músculo fue significativamente más elevada a las 24 y 48 H Pi en comparación con el Control 0 y el Control I ($p<0.005$) (Tabla IX y Fig. 15).

La peroxidación de lípidos en branquias de camarón blanco expuesto a infección con VSMB aumentó conforme avanzaba la infección (Tabla IX y Fig. 15). La concentración de TBARS en branquias a 48 H Pi fue estadísticamente mayor que en el Control 0 ($p<0.005$) y Control I ($p<0.05$) (Tabla IX y Fig. 15).

En hepatopáncreas los niveles de TBARS fueron significativamente diferentes entre Control I y los tratamientos 24 y 48 H Pi, ($p<0.005$). Los valores de TBARS fueron mayores a las 48 H Pi en comparación con Control I y 1 H Pi ($p<0.005$) (Tabla IX y Fig. 15).

En hemolinfa la peroxidación de lípidos fue más elevada en los tratamientos post-infección que en los controles ($p<0.05$) (Tabla IX y Fig. 15). A 1 H Pi y a 48 H Pi los niveles de TBARS fueron estadísticamente mayores que en el Control 0 y Control I ($p<0.005$) (Tabla IX y Fig. 15).

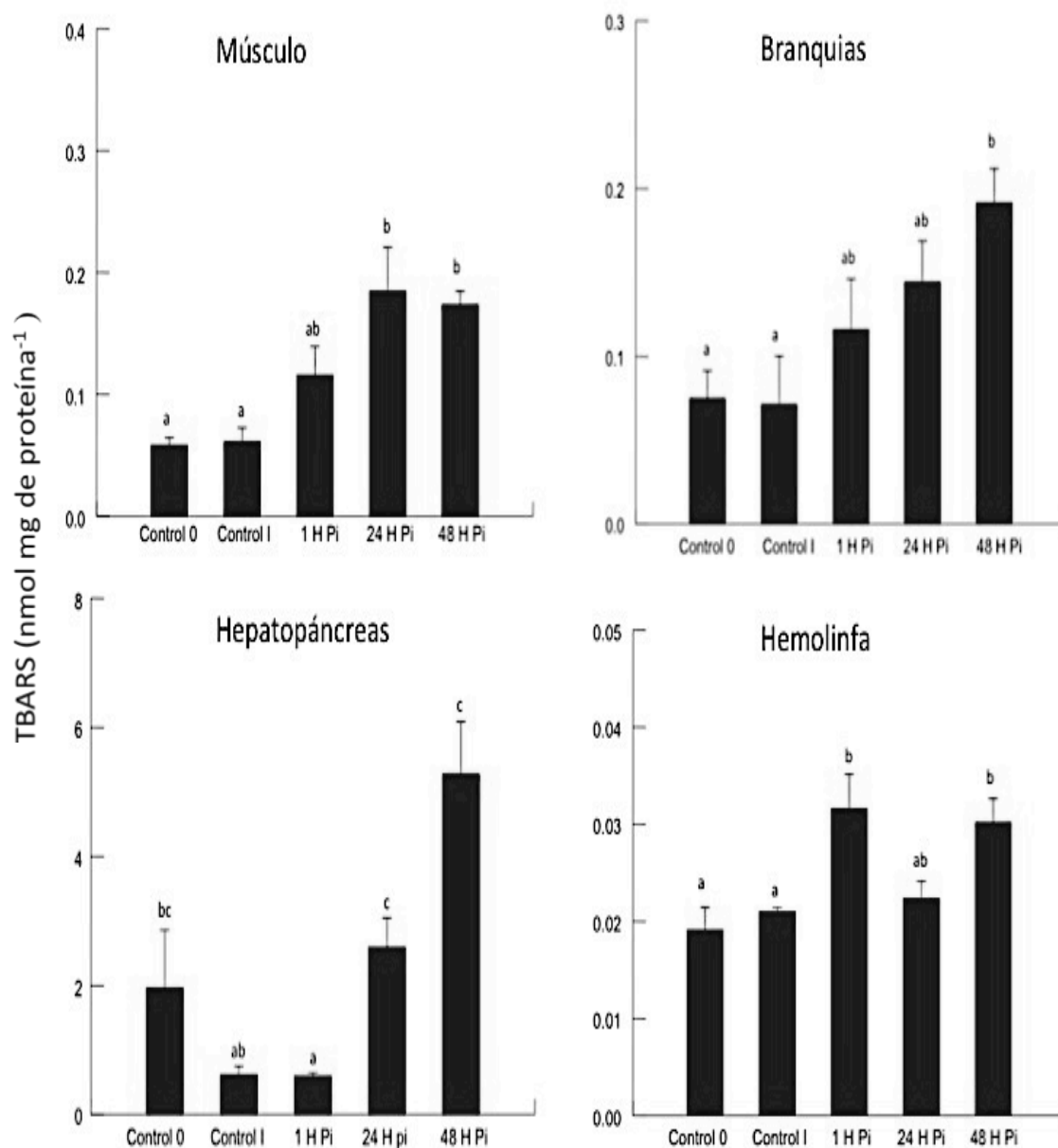


Figura 15. Concentración de lípidos peroxidados (TBARS, nmol mg de proteína⁻¹) en tejidos de camarón blanco expuesto a virus de la mancha blanca. Control 0= No sufrieron tratamiento, Control I Inyectados con inóculo inerte, 1 H Pi= 1 hora post-infección, 24 H Pi= 24 horas post-infección, 48 H Pi= 48 horas post-infección. Los datos se expresan como promedio \pm error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ($p \leq 0.05$). N=6

7. 5 Análisis de componentes principales (ACP)

El análisis multivariado de componentes principales permitió una ordenación y simplificación de las variables originales en otras nuevas llamadas componentes principales (CP).

Se generaron 3 componentes que explican el 77.6 % del total de varianza en los datos (40.14 %, 23.19 % y 14.26 %, respectivamente) (Anexos. Tabla X [eigenvalores y % de varianza por factor]. Las variables originales correlacionadas con los CP se muestran en el Anexo I. El análisis de componentes arrojó las cargas factoriales de los dos componentes principales y fueron considerados significativos aquellos valores mayores a 0.70 (Anexos. Tabla XI, coeficientes). La actividad de las enzimas, SOD (0.92), CAT (0.80) y el indicador de daño oxidativo a lípidos, TBARS (0.84), fueron las variables correlacionadas significativamente para el CP 1 mientras que la concentración de carbonilos protéicos (0.75) fue el indicador significativo para el CP 2, mientras que para el CP 3, la variable GST (0.77) resultó significativa, estas variables son las que explican la mayor variación en los datos (Fig. 16).

Con el ACP fue posible detectar y diferenciar la influencia de dos grupos en las muestras, distribuidos de manera aleatoria (Fig. 17, englobados en color rojo), las muestras de hepatopáncreas forman un grupo en el fondo del gráfico (puntos separados en color azul corresponden a hepatopáncreas) que se separa del resto de los tejidos de manera significativa (Fig. 17). La separación del hepatopáncreas y los tejidos restantes parecen estar influenciados, en su mayoría, por la actividad de las enzimas SOD, CAT y GST y el daño oxidativo estimado con los marcadores TBARS y carbonilos protéicos.

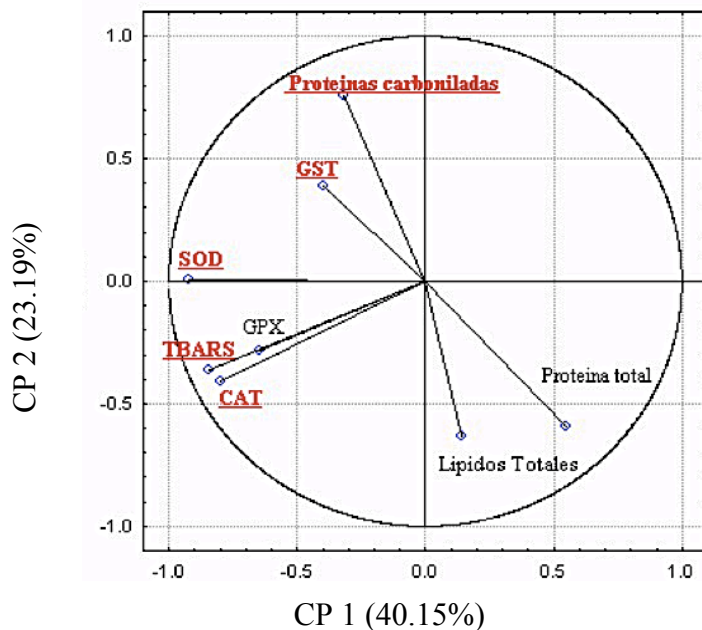


Figura 16. Proyección de las variables analizadas con el análisis de componentes principales (proteínas totales, lípidos totales, superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx), glutatión reductasa (GR), glutatión S-transferasa (GST), TBARS= lípidos peroxidados, y proteínas carboniladas) en tejidos de camarón blanco expuesto a virus de la mancha blanca. Cargas factoriales > 0.70 en rojo.

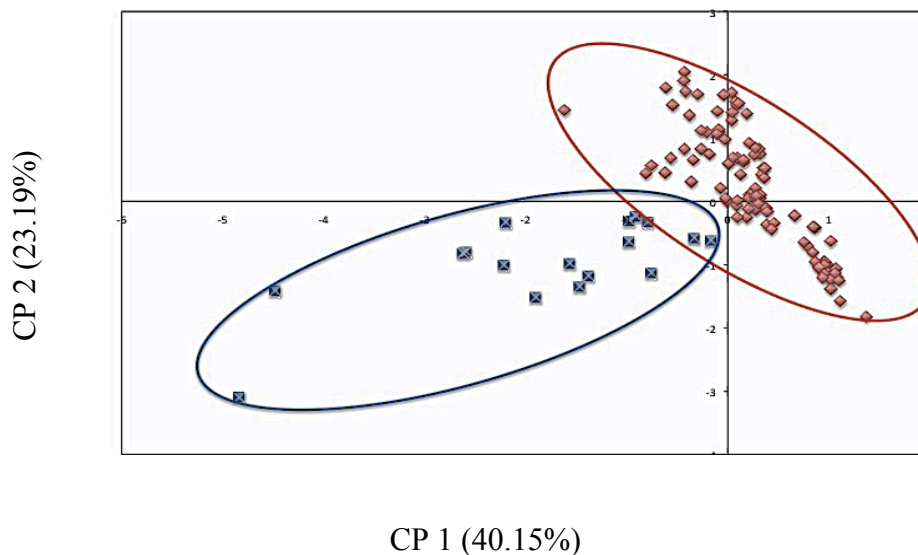


Figura 17. Proyección gráfica del resultado del análisis multivariado de componentes principales para todos los datos obtenidos en tejidos de camarón blanco expuesto a virus de la mancha blanca. El análisis identificó dos componentes principales (CP1, CP2). (Elipse que encierra la distribución de los individuos sin significancia estadística).

8. DISCUSION

8.1 Análisis de qPCR

Diversos autores han utilizado la técnica de PCR tiempo real (qPCR) para la cuantificación de una gran variedad de virus de tipo humano (Rincarz et al., 1999; Cane et al., 1999; Lewin et al., 1999). Actualmente, la técnica de cuantificación viral por medio de qPCR es utilizada para la vigilancia epidemiológica de la sanidad acuícola en granjas de camarón, en hospederos silvestres, y para la verificación de reproductores en laboratorios de cultivo larvario. La carga viral en tejidos infectados por VSMB en camarón es considerada como uno de los factores más importantes que representa, por un lado la replicación y proliferación viral y por otro la progresión y transmisión de la enfermedad. Esta técnica puede medir el número de copias de ADN viral en un máximo de 4 h, lo que implica que es más rápida que la técnica de PCR anillado o PCR de un paso.

Durand y Lightner (2002) utilizaron este método con la prueba TaqMan para cuantificar ADN de VSMB en diferentes tejidos y especies de camarón y encontraron en organismos moribundos de *P. vannamei* un rango de 7.50×10^8 - 2.50×10^9 copias μg^{-1} de VSMB. En dicho estudio, se reportó que la hemolinfa contuvo 2.55×10^9 copias μg^{-1} de DNA y fue el tejido con la mayor concentración de copias virales en comparación con varios tejidos analizados.

En el presente estudio, los análisis de cuantificación de VSMB se realizaron en hemolinfa debido a que el método de infección fue por inyección al seno hemolinfático, ya que la literatura menciona que es ahí donde se pueden obtener los mayores conteos virales (Kimura et al., 1999; Durand y Lightner, 2002). Los resultados del presente estudio se encuentran en el rango de 2.0×10^4 - 5×10^7 copias virales a las 48 H Pi, al convertir los datos a copias μg^{-1} de DNA, obtuvimos resultados menores en comparación con el estudio de Durand y Lightner (2002). Esto pudo deberse al tiempo

del bioensayo y a que en el estudio de Durand y Lightner (2002) las infecciones se realizaron vía inmersión, lo que pudo haber favorecido una infección más lenta y una mejor asimilación del organismo al virus (6-7 días en total). Es posible que el inóculo en el presente estudio sea más agresivo para los organismos por lo que no se alcanzó una mayor proliferación de copias virales en la hemolinfa de los camarones. Otro factor a considerar es que el inóculo utilizado para el experimento de infección viral en este estudio fue preparado a partir de tejidos de organismos gravemente enfermos por VSMB lo que garantizó un alto nivel de virus en el inóculo; aunque antes del análisis cuantitativo de qPCR, el contenido de VSMB era desconocido.

El análisis de qPCR resultó suficientemente sensitivo para detectar copias virales a 1 H Pi (Powell et al., 2006). Shritunyalucksana et al. (2006) reportan que el mismo análisis resulta confiable para cuantificar el VSMB en muestras de hasta 5 copias. En este trabajo se pudo observar el aumento en la concentración de virus conforme transcurrió el tiempo post-infección y progresó la enfermedad, mediante el análisis cuantitativo de qPCR a 1 H Pi se obtuvieron 13.68 copias de VSMB, mientras que a 24 H Pi fueron cuantificadas 1038.33 copias de VSMB, en este caso, la replicación del virus aumentó 75 veces, a 48 H Pi, el virus dobló su concentración, estos datos confirman la validez e importancia del análisis cuantitativo por qPCR. Diversos autores reportan que existe una concentración crítica, la cual detona el brote de la enfermedad (Durand y Lightner, 2002; Durand et al., 2003), estos estudios sugieren que las cargas virales cambian conforme al tiempo de infección.

El método de análisis por qPCR puede ser aplicado para estudios en donde la detección y cuantificación de niveles bajos de VSMB es necesaria, como es el caso de la evaluación de hospederos silvestres, reproductores y camarones infectados durante la progresión de la enfermedad, organismos sometidos a altas o bajas temperaturas, pues ya se ha probado protección térmica (Rahman et al., 2007), y en la determinación del contenido viral en camarones resistentes a la infección con VSMB ó libres de patógenos (SPF) (Durand y lightner, 2002; Meng et al., 2010).

8. 2 Variables bioquímicas

Los estudios realizados en crustáceos decápodos infectados con VSMB reportan que los virus infectan órganos vitales de origen mesodérmico y ectodérmico, evidenciado por la presencia de células degeneradas con núcleo hipertrófico (Wang et al., 1995; Chang et al., 1996; Yoganandhan et al., 2003). Por ello, resulta importante determinar los cambios metabólicos ocurridos en los tejidos infectados con VSMB en camarón blanco.

Los resultados encontrados en este estudio demuestran que existen diferencias en el perfil bioquímico de algunos tejidos entre camarones blancos sanos y aquellos infectados por VSMB. En este trabajo la concentración de proteínas totales sólo presentó cambios en hemolinfa, anteriormente fue considerada como un parámetro importante para evaluar el estado de salud de peneidos (Rodríguez y Le Moullac, 2000). Se pudo observar que la concentración de proteínas totales disminuyó después de la manipulación e inyección, aún en los camarones que no fueron inyectados con virus (Control I). La menor concentración de proteínas totales se encontró después de 1 H Pi manifestándose el efecto inmediato del estrés causado debido a la introducción de partículas virales al organismo.

Ruan et al. (2010) reportan que existe un incremento en la demanda de energía durante la compensación fisiológica debida a estrés biológico causado por la infección con VSMB. Esto es evidente en los camarones infectados con VSMB en el presente estudio, en donde a 1 H Pi se encontraron los niveles más bajos en la concentración de proteínas totales en hemolinfa.

El decremento en la concentración de proteínas totales en hemolinfa ha sido reportado previamente en *L. vannamei* sometido a diferentes condiciones de estrés ambiental (Racotta y Palacios, 1998; Racotta y Hernández-Herrera, 2000; Mercier et al., 2006) y estrés por infección con el virus del síndrome del Taura (Song et al., 2003). Esto se explica debido a que las proteínas pueden ser utilizadas como suplemento de energía en situaciones de estrés abiótico al tratar de satisfacer el incremento de la demanda metabólica (Racotta y Palacios, 1998). Se ha documentado que la infección

con VSMB también llega a provocar un bajo consumo de alimento en los organismos (Mohankumar Ramasamy, 2006), lo cual contribuye a una baja disponibilidad de energía y la consecuente disminución en la concentración de proteínas totales en hemolinfa. Es posible que, en el presente estudio, la infección con virus y la manipulación por inyección pudieran haber generado un trastorno nutricional o energético que causaría la disminución en la concentración de proteínas totales.

En contraste con nuestros resultados, Lo et al. (1997) y Yoganandhan et al. (2003) reportaron que después de una infección con VSMB hay un aumento en la concentración de proteínas totales en la hemolinfa y lo refieren al aumento en la cantidad de virus circulante. Aun así, la concentración de proteínas totales encontrada en la hemolinfa de camarón blanco en el presente estudio está en el orden de 40-70 mg mL⁻¹, valor demasiado elevado como para considerar que las cápsides virales pudieran llegar a representar un aporte importante en la concentración de las proteínas totales en este tejido. Otros estudios reportan que el incremento en la concentración de proteínas es debido a que los baculovirus presentan una variedad de proteasas y otras enzimas que disuelven los tejidos y que principalmente las proteínas de músculo y hepatopáncreas pudieran ser incorporadas a la hemolinfa del camarón (Beckage, 1996). Esto no concuerda con nuestros resultados debido a que no se encontraron cambios en los niveles de concentración de proteínas en los tejidos restantes bajo los diferentes tratamientos a los que fueron sometidos los organismos.

La disminución en la concentración de proteínas totales en hemolinfa puede estar relacionada a la disminución de las proteínas que participan de manera importante en el sistema inmune de los invertebrados, los crustáceos despliegan una respuesta inmune en donde existe la participación de proteínas involucradas en el reconocimiento de micro-organismos invasores, sistema profenoloxidasa, además de péptidos antimicrobianos como las peneidinas, clustinas y aglutininas (Muñoz et al., 2000; Vargas-Albores; Yépiz-Plascencia, 2000; Bartlet et al., 2002; Zhao y Wang, 2008). En los camarones infectados con VSMB, en hemolinfa, la menor concentración de proteínas se encontró a 1 H Pi, la disminución en la concentración de proteínas totales observada en este estudio puede traer consecuencias adversas de manera prematura en

la capacidad inmune debido a la falta de proteína para el metabolismo de moléculas y enzimas de defensa.

Se ha sugerido que la respuesta hiperlipidémica es un indicador sensible y confiable de disturbios ambientales, y además existe una respuesta al incremento en la demanda de energía durante la compensación fisiológica debido a estrés físico y ambiental (Chang y O'Connor, 1983). La concentración de lípidos totales en este trabajo únicamente manifestó cambios significativos en branquias y hemolinfa. Generalmente, se considera que el aumento en los niveles de lípidos, glucosa y lactato puede reflejar la respuesta a retos ambientales y a infecciones para mantener la homeostasis (Ruan et al., 2010). En el presente estudio los últimos parámetros no fueron evaluados.

Se encontró en camarón blanco inyectado con VSMB una tendencia no significativa a disminuir el contenido de lípidos totales en músculo después de los tratamientos Control I y post-infección. La mayor concentración de lípidos totales fue obtenida en el Control 0 en comparación con los tratamientos restantes. Estos resultados concuerdan con los reportados por Yoganandhan et al. (2003), quienes encontraron un decremento en la concentración de lípidos totales en *P. indicus* después de la infección con VSMB.

En las branquias de camarón blanco se encontró un aumento en la concentración de lípidos totales en el Control I (inyección con inóculo inerte) en comparación con el Control 0 (sin tratamiento); esto es considerado como una respuesta al estrés por la manipulación y por la introducción de material extraño (glicerol). El incremento en la concentración de lípidos en el Control I, como producto de la inyección de glicerol más que de la infección, puede tener una implicación bioquímica. El glicerol tiene una relación directa con los triglicéridos, es un precursor para la síntesis de triglicéridos y fosfolípidos, después de utilizar los lípidos de reserva, el glicerol es liberado al torrente sanguíneo y puede ser convertido a glucosa como suministro de energía para el metabolismo celular. En este caso, las branquias pudieran haber sido el órgano con la mayor necesidad de energía, ya que se ha reportado en *P. indicus*, una reducción en el

consumo de oxígeno debido a la infección con VSMB (Yoganandham et al., 2003). La disminución de energía en el organismo infectado podría causar que el glicerol aumente la concentración de glucosa, triglicéridos y fosfolípidos de manera preliminar casi inmediata en el caso de branquias debido a que el aumento en la concentración de lípidos totales fue evidente desde 1 H Pi manteniéndose en este rango durante todo el experimento.

En hepatopáncreas pudo haber ocurrido algo similar ya que la concentración de lípidos se incrementó conforme avanzó la infección viral aunque no de manera significativa. Yoganandham et al. (2003) mencionan incremento en la concentración de ácidos grasos en hepatopáncreas de *P. indicus* infectado con VSMB. En hemolinfa no se encontraron diferencias entre los tratamientos Control 0 y Control I, además, únicamente a 48 H Pi se encontró una mayor concentración de lípidos totales. Es posible que a las 48 H Pi la proliferación viral pudo haber causado una movilización de lípidos totales del músculo, en donde la concentración de éstos disminuyó, hacia el sistema circulatorio abierto del camarón blanco.

8.3 Actividad enzimática

El papel de los antioxidantes en *L. vannamei* infectado con virus de la mancha blanca es incierto. La importancia del sistema antioxidante de los organismos aerobios es debido a que previene los efectos de las ERO, tiene un papel vital en la protección de las células contra el estrés oxidativo, evita o repara el daño oxidativo, y contribuye a mantener los niveles de los agentes reductores, como el NAD, NADPH, y GSH, y, por lo tanto, mantener un ambiente reducido en las células (Muñoz et al., 2000; Downs et al., 2001).

La enzima SOD es una de las principales enzimas antioxidantes de defensa, ya que acelera la conversión de $O_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 y O_2 lo cual evita los efectos de las ERO (Fridovich, 1998). En este estudio, se encontró una disminución de la actividad de SOD en tejidos de camarón blanco 1 H después de la infección con VSMB en comparación con el Control 0. Resultados similares se encontraron en camarón *P. monodon*

inmediatamente después del reto con VSMB, en el cual se encontró una disminución significativa de la actividad de SOD (Chang et al., 2003). En el presente estudio se encontró una baja actividad de SOD a 1 H Pi y un aumento significativo de la actividad a 24 H Pi en músculo, branquias y hepatopáncreas de camarón blanco expuesto a infección por VSMB. Se ha reportado un decremento en el THC en camarones infectados con VSMB (Liu et al., 2010) debido a que los hemocitos migran y se acumulan en el sitio de inyección para efectos de coagulación además de que se activa la fagocitosis de los cuerpos extraños y se induce apoptosis por la infección viral (Sahul Hameed et al., 2006) estos resultados pudieran indicarnos el motivo de la disminución de la actividad enzimática a 1 H Pi en todos los tejidos analizados.

La elevada actividad de SOD a 24 H Pi en comparación con el resto de los tratamientos podría ser la consecuencia de la estimulación del sistema inmune dado por el estallido respiratorio a 1 H Pi debido a la infección. Esto es similar a los resultados de Zhang et al. (2005), después de retar al langostino chino *F. chinensis* con VSMB, se encontró un incremento en la actividad de SOD así como un incremento en la actividad de PO a las 24 hr post-infección, lo cual indica que el VSMB en estas especies parece estimular el sistema inmune mediante un incremento de la actividad de SOD y PO, por lo menos a 24 H Pi (Zhang et al., 2005).

En el caso de músculo y branquias, la actividad de SOD descendió a las 48 H Pi. En estudios en *P. monodon* (Rameshthangam y Ramasamy, 2006; Mathew et al., 2007) y en *F. indicus* (Mohankumar y Ramasamy, 2006) se reporta un descenso de la actividad de SOD después de la infección con VSMB en todos los tejidos analizados, la cual disminuye conforme aumenta la infección. El material extraño en el hospedero es filtrado y acumulado por las branquias, seguido de la fagocitosis dada por los hemocitos o la liquidación a través de la muda (Jiang y Mu, 1999). Ello demuestra la importancia de las branquias en la defensa contra el VSMB. En el presente estudio, sólo se encontró descenso de la actividad de SOD a 1 H Pi y 48 H Pi en músculo y

branquias, lo cual puede deberse a que el virus también pudo haber llegado a inhibir la síntesis de enzimas antioxidantes (Scharz, 1996).

En hepatopáncreas y hemolinfa se encontró un aumento significativo de la actividad de SOD a 48 H Pi en comparación con los tratamientos Control, probablemente relacionado a la importancia del hepatopáncreas ya que las células B del epitelio comparten la función de excretar material foráneo derivado de la hemolinfa (Alday et al., 2002). Los niveles más altos de actividad de las enzimas en hepatopáncreas y branquias de camarón blanco contribuirían a facilitar la degradación de material foráneo filtrado por estos órganos (Zhang et al., 2005).

Es importante destacar el efecto de los inmunoestimulantes en contra de la infección con VSMB. En *F. chinensis*, después de retar con WSSV y el inmunoestimulante zimosan A, la actividad de SOD fue más alta que la del grupo control en ambos casos, y después de los retos se observó un incremento en los niveles de actividad de SOD (Zhang et al., 2005). Así mismo, en *L. vannamei* aumentó la actividad de los parámetros inmunes, tales como la SOD, después de la inmersión en lipopolisacáridos (LPS) extraídos del alga roja *Gracilaria tenuistipitata* (Yeh et al., 2010). Estos resultados apoyan la sugerencia previa de que los polisacáridos pueden aumentar la actividad de SOD en hemolinfa y músculo de *L. vannamei* (Campa-Córdova et al. 2002). Estas referencias relacionan la inyección de polisacáridos de origen bacteriano con la activación de la fagocitosis, mediante la unión y reconocimiento de antígenos de la superficie microbiana, la cual a su vez induce el estallido respiratorio y la formación del fagosoma mediados por Rab GTPasas, las cuales están implicadas en la formación y maduración del fagosoma e inducen la activación de la fagocito NADPH oxidasa (Wu et al., 2008; Bustillo-Ruíz et al., 2009).

El papel del sistema de defensa antioxidante en invertebrados puede considerarse de mayor importancia que en vertebrados. La fagocitosis da lugar a la

formación de una gran cantidad de ERO y es la principal línea de defensa en contra de organismos invasores en invertebrados, debido a la falta de anticuerpos y de inmunidad adquirida (Johanson et al., 1999). Aun así, la producción de altos niveles de ERO debe ser localizada y controlada para evitar el daño oxidativo a los tejidos.

Catalasa es una enzima que trabaja en contra de altas concentraciones de H_2O_2 debido a que su K_m para H_2O_2 se encuentra en el rango milimolar (Fridovich, 1998; Yu, 1994), además se localiza sólo en los peroxisomas por lo que únicamente a altas concentraciones de H_2O_2 en la célula, la enzima puede ser difundida (Zhang et al., 2008). En esta investigación, se encontró un efecto significativo en la actividad de catalasa debido a la inyección con inóculo inerte (Control I) en camarón blanco, en el caso de músculo, branquias y hepatopáncreas. La actividad de Control I fue menor en la mayoría de los casos al comparar con el tratamiento Control 0, esto pudo ser debido a la manipulación del organismo y a la introducción de material extraño como es el glicerol y la solución de fosfatos que conforman el vehículo inerte utilizado para la conservación e inyección de las partículas virales.

En todos los tratamientos aplicados en este estudio en camarón blanco infectado con VSMB, la actividad de la enzima catalasa encontrada en hepatopáncreas, fue mayor que en el resto de los tejidos, en el orden de hasta más de 10 veces (Fig. 4). Esto ha sido reportado por Tavares-Sánchez et al. (2004) quienes mencionan que los transcritos de catalasa son más abundantes en hepatopáncreas, seguido de branquias y, a veces, pueden ser no detectables en músculo. El hepatopáncreas es considerado una glándula con alta actividad metabólica en la cual se espera una gran producción de ERO debido a su papel como órgano detoxificador (Arun y Subramanian, 1998). Aparentemente, catalasa juega un papel más importante en hepatopáncreas que en el resto de los tejidos debido a la alta actividad encontrada en este tejido en el presente estudio.

En músculo, branquias y hepatopáncreas de camarón blanco en este trabajo, la actividad más baja de catalasa fue encontrada a 1 H Pi lo que puede indicar que la inyección y la consecuente estimulación viral inducen algún tipo de reacción inmune que afecta la función fisiológica normal del organismo. El posterior aumento significativo de la actividad de catalasa a 24 H Pi puede deberse a un intento de contener y neutralizar el daño generado por los ERO inducidos por la infección con VSMB. Esto concuerda con los resultados de Zhang et al. (2008) quienes, después de realizar una cuantificación de los transcritos de catalasa en *F. chinensis* por medio de qPCR, señalan que los transcritos presentan regulación positiva en hemocitos a 14 H Pi en hepatopáncreas a 37 H Pi debido al estímulo causado por la infección con VSMB. En el presente estudio, los hemocitos pudieran haber sido irrigados hacia los tejidos lo cual mantiene la elevada actividad enzimática de catalasa a 24 H Pi en camarón blanco.

Nuestros datos revelan que la actividad de catalasa descendió a 48 H Pi en todos los tejidos analizados en este trabajo, aunque no de manera significativa. Lo anterior puede indicar que a 48 H Pi el organismo aun presentaba regulación positiva en contra de la infección con VSMB. Además, se ha encontrado que catalasa puede tener una respuesta tardía en el sistema inmune como respuesta al estímulo con VSMB (Zhang et al., 2008). Se ha encontrado en otros estudios, una disminución de la actividad enzimática en estados más avanzados de infección debido a la excesiva producción de H_2O_2 en *P. monodon* se evaluó la actividad de catalasa encontrándose a 72 h una disminución de la actividad al comparar solamente con organismos mantenidos bajo condiciones control (Ramesthangan y Ramasamy 2006).

En catalasa el ligando hemo-proximal es una tirosina, y su función puede estar relacionada al aumento de la resistencia a H_2O_2 lo que facilita la estabilidad de la enzima en concentraciones altas del mismo y permite evadir la formación de compuestos catalíticamente inactivos (Zamocky et al., 2008). Es posible que la actividad de catalasa en hemolinfa en este estudio sea más susceptible a daño en la tirosina debido a que se observó una disminución de la actividad a partir de las 24 H Pi.

Este resultado no coincide con los de Zhang et al. (2008) quienes encontraron regulación positiva en la actividad de catalasa en hemocitos entre 14 y 37 h después de la infección.

En el caso del experimento realizado en este trabajo, la infección avanzó hasta las 48 H Pi a partir de la cual la mortalidad se extendió a los organismos restantes por lo que el muestreo a las 72 H Pi no pudo efectuarse debido a una alta tasa de mortalidad. Aun así, se puede observar una ligera disminución de la actividad catalasa a las 48 H Pi al comparar con 24 H Pi en camarón blanco infectado con VSMB. Lo anterior pudiera indicar una saturación del sistema antioxidante debida a la infección con VSMB, que en este caso resultó más agresiva debido probablemente a que 27°C está dentro del rango de temperatura considerado óptimo para la replicación de este virus. Varios autores han reportado que el VSMB se replica más eficientemente en el rango de temperatura de 23 a 28°C (Guan et al., 2003, Du et al. 2006, Granja et al., 2006, Reyes et al., 2007). Además, se ha encontrado que altas temperaturas (33-35°C) previenen la aparición de la enfermedad (Rahman et al., 2006), aunque no se ha evaluado el efecto que puede existir en el metabolismo oxidativo debido a la alta temperatura en camarón blanco.

La enzima GPx y las peroxiredoxinas tienen un papel crítico en la defensa antioxidante de crustáceos, son proteínas multifuncionales con actividad biológica de peroxidasa, y se encargan de dismutar el H₂O₂ derivado de la respuesta a infecciones antes de que se produzcan más radicales, lo cual previene el daño oxidativo de H₂O₂ e hidroperóxidos lipídicos (Liu et al., 2007). Se ha probado que estas enzimas tienen un alto grado de afinidad por el H₂O₂ y lo pueden eliminar efectivamente aún en muy bajas concentraciones, a diferencia de catalasa, GPx es común en la mayoría de los eucariotes y se sugiere que GPx es más importante que CAT en la remoción de peróxidos en humanos (Johanson et al., 1995; Aruoma, 1998; Liu et al., 2004; Zhang et al., 2008).

En este estudio encontramos que la actividad de GPx tuvo una disminución significativa en el Control I y a 1 H Pi en comparación con Control 0 debido a la inyección y la infección con VSMB. Es posible que GPx aumente también como resultado de una inhibición por patógenos previamente reportada en el decremento de la expresión de genes de GPx en *P. monodon* infectado con VSMB y *Photobacterium damsela* (Liu et al., 2010). En el presente estudio, la actividad de GPx se incrementó en músculo, branquias y hepatopáncreas a las 24 H Pi, lo que sugiere un aumento de los mecanismos de protección para disminuir el daño oxidativo debido a una posible producción de H₂O₂ después de la infección con VSMB. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Ren et al. (2009), quienes analizaron la actividad y los transcritos de GPx en *F. chinensis* y encontraron que la actividad de esta enzima en branquias se incrementa a partir de 6 h y se mantiene en niveles altos hasta las 24 h después del reto con *V. anguillarum*. En dicho estudio, la actividad de GPx en el hepatopáncreas decayó a las 6 h con los menores niveles a 12 h pero se incrementó a las 24 h después del reto con *V. anguillarum* en donde también se encontraron los mayores niveles de transcritos de GPx (Ren et al., 2009). El aumento significativo de la actividad de GPx puede estar asociado con disminuir el daño por H₂O₂ que es generado por la invasión de patógenos.

GPx no sólo es importante para la eliminación de H₂O₂, su especificidad abarca también alquil hidroperóxidos, reduciéndolos a los alcoholes correspondientes (Meister y Anderson, 1983 y Fridovich, 1998). Como es el caso con SOD y CAT, existen al menos 4 isoformas de GPx, una de ellas se encuentra en el espacio extracelular (Perry, et al., 1992), y otra actúa específicamente sobre los hidroperóxidos fosfolipídicos, todas las cuales son selenoenzimas y están presentes en la mayoría de las células (Ursini et al., 1985 y Fridovich, 1998). Otros autores han encontrado una reducción significativa de la actividad de CAT, SOD, GPx, GR y GST en camarones infectados con VSMB (Mohankumar y Ramasamy, 2006; Mathew et al., 2007; Rameshthangam y Ramasamy, 2006), a diferencia de nuestro trabajo donde fue evidente el aumento de la actividad a 24 H Pi. La diferencia en la respuesta pudo haber sido el resultado de diferentes dosis infecciosas y métodos de infección utilizados.

En camarón blanco, posterior al aumento de la actividad de GPx encontrada a 24 H Pi, la actividad disminuyó a las 48 H Pi, lo cual sugiere una saturación del sistema antioxidante y una inhibición por patógenos después del efecto compensatorio. Se ha reportado actividad de GPx en los hemocitos de camarón blanco *L. vannamei* (Cheng et al., 2005). En este caso, la actividad de GPx en hemolinfa no manifestó cambios significativos en respuesta a la infección con VSMB, pero se encontró una mayor actividad de esta enzima a 1 H Pi lo que pudo haber sido una respuesta temprana a la infección viral y a la explosión respiratoria que se presenta en camarones estimulados con bacterias y virus que da lugar a la producción de grandes cantidades de ERO (Liu et al., 2007; Ren et al., 2009).

GPx juega un papel en la división y diferenciación celular, es un factor importante en la regulación de la mitosis (Cotgreave y Gerdes, 1998), y cataliza la reducción de hidroperóxidos con la oxidación de glutatión reducido (GSH) a glutatión disulfuro (GSSG) durante su acción (Bandyopadhyay et al., 1999). Glutatión reductasa (GR) es una enzima ampliamente distribuida en animales, plantas y microorganismos, GR convierte el GSSG de nuevo a GSH y utiliza NADPH como el reductor por lo que funciona como un reciclador de GSH (Halliwell y Gutteridge, 1999; Lesser, 2005). Niveles elevados de GSH protegen a las proteínas celulares de la oxidación a través del ciclo redox del glutatión y también detoxifican directamente ERO.

Glutation S-Transferasa (GST) se encarga de catalizar la conjugación de GSH con un amplio rango de sustancias electrofílicas que pueden haberse producido de manera endógena, tales como los aldehídos producidos durante la peroxidación de lípidos, y también tiene actividad en contra de hidroperóxidos orgánicos y xenobióticos (Ren et al., 2009), aproximadamente 15% del total de GSH está contenido en las mitocondrias. (Hansen et al., 2006). Ren et al. (2009) encontraron que la actividad de GPx y GST en el hepatopáncreas de *F. chinensis* inyectado con *V. anguillarum* muestra diferentes respuestas y especulan que GPx tiene una respuesta más temprana a los retos bacterianos que GST. En este trabajo, encontramos que la actividad de la enzima GPx

incrementó de manera significativa en el hepatopáncreas de camarón blanco, a las 24 H Pi como respuesta al estímulo por la infección de VSMB, mientras que en el mismo tejido, la actividad de GST aumentó, aunque no de manera significativa, esto pudo ser debido a que los valores de actividad enzimática de GST fueron más elevados en el musculo que en el resto de los tejidos.

En el presente estudio se encontró que la actividad de las enzimas GPx, GR y GST responde de manera similar a los tratamientos de infección con VSMB, quizá porque estas enzimas se encuentran profundamente ligadas y participan en un ciclo de continuo recambio. GPx, GR y GST se encargan de remoción de metabolitos tóxicos mediante reacciones de conjugación con GSH, el decremento en la actividad de estas enzimas observado en camarones infectados con VSMB pudiera estar ligado a una reducida disponibilidad de GSH a las 48 H Pi en camarón blanco en todos los tejidos analizados (Garg et al., 1996; Mohankumar y Ramasamy, 2006; Rameshthangam y Ramasamy, 2006; Mathew et al., 2007). El decremento en la actividad enzimática del hospedero puede estar relacionado directamente a la patogénesis del VSMB inyectado, lo que indica una pobre defensa del sistema antioxidante en contra del estrés oxidativo cuando la proliferación viral excede la capacidad de clarificación del hospedero (Rameshthangam y Ramasamy, 2006; Mathew et al., 2007).

La disminución en la actividad de las enzimas antioxidantes a 48 H Pi encontrada en este estudio puede provocar que las membranas celulares y subcelulares se vuelvan más sensibles al daño oxidativo (Yu, 1994; Ren et al., 2009) relacionado al mecanismo patogénico de los microbios y podría representar la respuesta tardía a la infección por VSMB después de su estimulación.

Además de los efectos en la concentración de lípidos y proteínas, el estrés ocasionado debido a la infección con VSMB puede afectar la calidad y cantidad de carbohidratos circulantes en camarón blanco (Telford, 1968; Lynch y Webb, 1972)

(Mathew et al., 2007b). La actividad de la enzima glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) aumentó en el hepatopáncreas y músculo de *P. monodon* infectado con VSMB (Mathew et al., 2007b). G6PDH está envuelta en el metabolismo de glucosa, recicla el NADPH a partir de NADP^+ en la célula y el NADPH es sustrato para el metabolismo de GSH (Cuzon et al., 2000 y Wilson, 2003). El incremento encontrado por Mathew et al. (2007b) en la actividad de G6PDH después de la infección con VSMB podría resultar en mayor producción de GSH a través de GR. El significado de esto es que se requiere de NADPH para mantener niveles adecuados de GSH que a su vez ayudará a controlar el estrés oxidativo a través de la enzima GPx. El incremento en la actividad de G6PDH podría ser resultado del estímulo causado por la infección con VSMB como parte del complejo mecanismo de defensa en contra del estrés oxidativo durante la infección (Mathew et al., 2007b), aunque en este caso, parece no haber sido suficiente para mantener elevados los niveles de actividad enzimática de GPx, GR y GST.

8.4 Daño oxidativo

Las ERO generadas en las células infectadas son asociadas con el daño oxidativo a lípidos y proteínas de las membranas celulares (Azenabor y Mahony, 1999). En los últimos años, la evaluación de la modificación oxidativa de proteínas se ha utilizado para estimar la intensidad del estrés oxidativo, como ejemplo, permite evaluar el estado de equilibrio cuando las concentraciones de ERO aumentan (Lushchak, 2007). Ya que todos los organismos poseen proteínas, la oxidación de éstas es un marcador confiable del daño oxidativo (Parvez y Raisuddin, 2005; Lushchak, 2007; Castex et al., 2009) sin embargo, no es comúnmente utilizado en camarones. En este estudio, se evaluaron los grupos carbonilos formados, los cuales son parte de los productos más estables de la oxidación de proteínas y son el marcador utilizado más frecuentemente (Standtman, 1986; Levine et al., 1994; Lushchak, 2007).

En este estudio se encontró que en camarón blanco infectado con VSMB el daño oxidativo, evaluado como el contenido de carbonilos protéicos y los niveles de TBARS, fue mayor a 48 Hr Pi, en la mayoría de los tejidos. En el mismo tratamiento se encontró la menor actividad de las enzimas involucradas en el ciclo del glutatión. Es posible que el daño oxidativo reflejado como el aumento en los carbonilos protéicos a 48 H Pi afecte también a las enzimas antioxidantes.

Los aminoácidos con residuos aromáticos son particularmente susceptibles a la oxidación por ERO. Los residuos de fenilalanina, tirosina y triptófano se integran a ciclos redox donde pueden estar involucrados en la consecuente producción de ERO, aunque se ha encontrado que estos residuos no se consideran como los principales blancos para oxidación en los sistemas biológicos. En contraste, los residuos de histidina, arginina, lisina, cisteína y prolina se consideran puntos altamente sensibles para la inducción de oxidación por radicales libres en sistemas que contienen iones de metales de transición, lo que resulta en la formación de derivados carbonilos (Stadtman, 1993; Bandyopadhyay, et al., 1999; Lushchak, 2007). La enzima SOD contiene residuos de arginina e histidina en su sitio activo (Mallinowsky y Fridovich, 1979). Los radicales libres atacan estos aminoácidos, lo que resulta en modificaciones químicas de la estructura de las proteínas y pérdida de actividad enzimática (Rameshthangam y Ramasamy, 2006) esto puede ser la causa de la baja actividad de SOD que se observó en este estudio.

En camarón blanco expuesto al VSMB, el estrés oxidativo es evidenciado como el aumento en la concentración de carbonilos protéicos y peroxidación de lípidos, quizá después de una producción excesiva de ERO por el sistema de la NADPH oxidasa y al consecuente estrés patogénico (Chin et al., 2003; Rameshthangam y Ramasamy, 2006). Sólo en el caso de músculo, la inyección con inóculo inerte (Control I) tuvo un efecto considerable en el aumento de la concentración de carbonilos protéicos comparado con Control 0 ($p < 0.05$). El daño oxidativo a proteínas fue significativo desde 1 H Pi con VSMB en comparación con el Control 0 en músculo y hepatopáncreas de camarón

blanco ($p < 0.005$ en ambos casos) lo que sugiere la inducción del estallido respiratorio y la elevada susceptibilidad de estos tejidos. El mayor nivel de carbonilos protéicos se encontró a 48 H Pi en branquias, hepatopáncreas y hemolinfa; en el músculo, la mayor concentración de carbonilos protéicos se observó a 24 H Pi. La concentración de carbonilos proteicos está relacionada con las proteínas totales (Fig 7), en branquias, hepatopáncreas y hemolinfa se encontró una disminución de la concentración de proteínas totales a 48 H Pi, lo que coincide con el aumento del daño oxidativo a proteínas y podría indicar que las proteínas se carboxilan debido al aumento en la formación de ERO conforme avanzó la infección con VSMB.

Este marcador es considerado importante debido a que es irreversible, causa cambios conformacionales y decrece la actividad catalítica en enzimas (Almroth et al., 2005). Los radicales libres inducen oxidación de ciertas proteínas celulares y, además, pueden inducir apoptosis, la cual cuando se extiende a una parte importante de las células, puede causar fallas en el funcionamiento de los órganos y la eventual muerte del organismo (Dalle-Donne et al., 2006; Lushchak, 2007). Es importante considerar varios marcadores de estrés oxidativo ya que se ha demostrado que la adición de H_2O_2 al medio induce la acumulación gradual de carbonilos protéicos en la enterobacteria *Escherichia coli* (Semsychn, 2002), mientras que la concentración de TBARS, primero aumentó y posteriormente tuvo un decremento, lo que nos indica la importancia de su comparación y manejo conjunto (Lushchak, 2007).

Los lípidos de los crustáceos marinos son ricos en ácidos grasos altamente insaturados (HUFA), principalmente, ácido eicosapentaenoico (20:5(n-3); EPA) y ácido docosahexaenoico (22:6 (n-3); DHA) (Mourente y Díaz-Salvago, 1999). DHA y EPA tienen un papel importante en la integridad de membrana y flexibilidad en invertebrados marinos (Bell y Dick 1990; Dall et al., 1990; Yepiz-Plascencia et al., 2000).

Existen varios factores que pueden resultar en daño oxidativo a lípidos (peroxidación de lípidos) en los camarones. Los niveles basales de lípidos peroxidados en el hepatopáncreas de *P. monodon* resultaron 3 veces más altos en granjas intensivas que en el caso de granjas de cultivo extensivas, estos resultados refuerzan la hipótesis de que el camarón de cultivo intensivo tiene que hacer frente a un mayor estrés ambiental que el cultivado en sistema extensivo (Tu et al., 2008). Las infecciones virales están asociadas con un incremento en los niveles de ERO en los organismos, lo que da lugar al daño oxidativo de membranas celulares y subcelulares (Chih-Hong et al., 2003).

Puede ocurrir que el organismo responda al daño oxidativo de lípidos en membranas de las branquias mediante el incremento en el transporte de lípidos para la renovación de ácidos grasos, en este caso observamos en músculo de camarón blanco, un importante aumento de la concentración de lípidos totales después de la inyección y la infección con VSMB lo que está relacionado con el aumento de TBARS en el músculo después de la infección. También se encontró un aumento en la movilización de los lípidos en el hepatopáncreas y hemolinfa (Fig. 8) lo que pudiera estar relacionado al daño oxidativo que inicia de manera significativa en hemolinfa y hepatopáncreas una hora después de la infección, con una tendencia similar en branquias y músculo.

En este trabajo encontramos los valores más altos de peroxidación de lípidos en hepatopáncreas de camarón blanco, con niveles hasta 10 veces más elevados que en el resto de los tejidos de camarón blanco expuesto a VSMB. Esto está relacionado al elevado metabolismo del hepatopáncreas y a un alto contenido de lípidos, específicamente de lípidos altamente poliinsaturados (PUFA), los cuales son susceptibles a daño oxidativo debido al alto número de sitios insaturados (Nagaoka et al., 1990; Zenteno et al., 2006). Por ello, la incidencia de peróxidos lipídicos depende del nivel de enzimas antioxidantes y la composición de los ácidos grasos en el organismo. Se ha reportado que en *P. monodon* y *F. indicus* los niveles de TBARS se

incrementan en todos los tejidos analizados debido al transcurso de la infección VSMB lo que indica el consecuente fallo del sistema oxidativo y el eventual daño tisular (Rameshthangam y Ramasamy, 2006; Mohankumar y Ramasamy, 2006; Mathew et al., 2007). Esto concuerda con nuestros resultados, en camarón blanco infectado con VSMB, se encontró un aumento en los niveles de TBARS en músculo, branquias, hepatopáncreas y hemolinfa, significativamente diferente de los tratamientos Control 0 y Control I en todos los tratamientos post-infección, por lo que, a diferencia del efecto por inyección, la infección sí determinó un aumento del daño estimado en la peroxidación de los lípidos.

El incremento en la peroxidación de lípidos da lugar a la producción de malondialdehído (MDA), el cual es el precursor de radicales libres en los ácidos grasos poliinsaturados en la membrana celular (Mohankumar y Ramasamy, 2006). Como consecuencia, la peroxidación se vuelve extensiva especialmente en los ácidos grasos altamente insaturados, altera la tasa de polinsaturaciones a otros ácidos grasos, y el resultado final es el decremento en la fluidez de la membrana y la desorganización de la misma (Chen y Yu, 1994; Mohakumar y Ramasamy, 2006). Los niveles de TBARS encontrados en nuestro estudio pueden reflejar un estado de estrés oxidativo y ser resultado de la depleción de antioxidantes removedores de ERO (SOD, CAT, GPx, GR y GST), que si bien aumentaron su actividad a 24 H Pi en la mayoría de los casos, no resultó suficiente para evitar el daño oxidativo.

La explosión respiratoria causada por estrés químico, físico y biológico, en este caso por infección por VSMB, da lugar a grandes cantidades de oxígeno singulete que pueden afectar el balance pro-/anti-oxidante de las células hospederas lo cual incrementa los pro-oxidantes celulares, como el hierro y el óxido nítrico entre otras, las cuales pueden dañar moléculas importantes (Yu, 1994). El estrés inducido por las infecciones virales está relacionado con la activación de fagocitosis, la cual está asociada con la liberación de ERO (Bell y Smith, 1993; Schwarz, 1996). Además de que las ERO se consideran componentes importantes del sistema de defensa de

invertebrados y crustáceos en contra de organismos invasores, también pueden ser dañinas ya que inducen daño oxidativo a moléculas constituyentes de membranas, enzimas y ADN (Mohankumar y Ramasamy, 2006).

Cuando se estimulan los fagocitos, se incrementa el rango de consumo de O_2 de en lo que se llama explosión respiratoria. Esto es debido a la activación de NADPH oxidasa en la membrana la cual reduce O_2 a $O_2^{\cdot-}$ (Winterbourn, 2008). Esta explosión respiratoria se considera un componente importante de los fagocitos para eliminar los microorganismos invasores (Muñoz et al., 2000; Rodríguez y Le Moullac, 2000; Liu et al., 2007; Wang et al., 2010). El $O_2^{\cdot-}$ generado durante la explosión respiratoria es convertido a H_2O_2 por una reacción de dismutación, y el H_2O_2 es utilizado para oxidar Cl^- a hipoclorito bajo la influencia de mieloperoxidasas (Anderson, 1996; Klebanoff, 1996). El hipoclorito es considerado bactericida y es, por otra parte, el precursor de N-clorotaurina, el cual es un potente compuesto antibacterial (Fridovich, 1998; Levinson, 2006).

Adicionalmente se conocen otros marcadores de estrés oxidativo que pueden ser utilizados para evaluar la intensidad del estrés oxidativo, además de la concentración de lípidos peroxidados y carbonilos proteicos, la tasa de glutatión oxidado y reducido, la actividad de las enzimas que están involucradas directa o indirectamente en la protección o detoxificación de las ERO o los productos de su interacción con otros componentes celulares y reparación de daño, entre otros.

9. CONCLUSIONES

- El análisis de qPCR para cuantificar la carga viral realizado en la hemolinfa de camarón blanco durante el experimento resultó ser lo bastante sensible y confiable para detectar concentraciones pequeñas de partículas virales así como para evaluar la proliferación viral en el transcurso de la infección por VSMB.

- Hubo una respuesta fisiológica en el descenso del contenido de proteínas y en el aumento de los lípidos totales debido a la infección a 1 H Pi y después de la manipulación por la inyección con inóculo inerte.
- La infección viral resultó en alteraciones de la actividad de las enzimas antioxidantes, desde 1 H Pi y a 24 H Pi. En hemolinfa, la estimulación en el sistema antioxidante a 1 H Pi es debida posiblemente a la inducción de la fagocitosis por el sistema de la NADPH oxidasa y una alta producción de ERO.
- El sistema circulatorio abierto del camarón tiene un papel en el metabolismo y la patogénesis ya que en el caso de músculo, branquias y hepatopáncreas, se encontró una estimulación del sistema antioxidante a 24 H Pi.
- La disminución de la actividad de las enzimas del sistema glutatión sugieren poca disponibilidad de GSH a 48 H Pi.
- La disminución de la actividad de las enzimas antioxidantes contribuye al aumento del daño oxidativo causado por la infección por VSMB. El daño oxidativo se encontró en mayor medida a 24 H Pi en músculo, mientras que en los tejidos restantes, los valores más altos de daño oxidativo se encontraron a 48 H Pi.
- Los resultados de este estudio sugieren una pérdida de la estabilidad del sistema antioxidante y, posiblemente de la defensa inmune, a 48 H Pi con efectos adversos en la función metabólica.
- Este trabajo demuestra el efecto que tiene el VSMB en el sistema antioxidante del camarón blanco, la estimulación a 24 H Pi y el consecuente daño oxidativo a 48 H Pi, así como la importancia de la temperatura dado que una temperatura constante de 27° C causó la muerte prematura de los organismos.

10. BIBLIOGRAFIA

- Aebi, H. 1984. Catalase in vitro. En: Packer, L. Methods in enzymology, Oxygen radicals in biological systems. Academic Press, Inc. E.U.A. 105: 121-126
- Aguirre, G., Ascencio, F. 2000. Infectious disease in shrimp species with aquaculture potential. *Recent. Res. Develop. Microbiol.* 4: 333-348.
- Alday-Sanz, V., Roque, A., Turnbull, J.F. 2002. Clearance mechanisms of *Vibrio vulnificus* biotype I in the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Dis. Aquat. Org.* 48: 91-99.
- Almroth, C.B., Sturve, J., Berglund, A., Forlin, L. 2005. Oxidative damage in eelpout (*Zoarces viviparus*), measured as protein carbonyls and TBARS, as biomarkers. *Aquat. Toxicol.* 73:171-180.
- Anderson, R.S. 1996. Production of reactive oxygen intermediates haemocytes. Immunological significance. En: Soderhall, K., Sadaaki, I., Vasta, G. Eds. *New Directions in Invertebrate Immunology*. SOS Publications. Fair Haven. pp. 109-129.
- Arun, S., Subramanian, P. 1998. Antioxidant enzymes in fresh water prawn *Machrobrachium malcolmsonii* during embryonic and larval development. *Comp. Biochem. Physiol B.* 121: 273-277.
- Aruoma, O.I. 1998. Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. *J. Amer. Oil Chem. Soc.* 75: 199-212.
- Azenabor, A.A., Mahony, J. B. 2000. Generation of reactive oxygen species and formation and membrane lipid peroxides in cells infected with *Chlamydia trachomatis*. *Int. J. Infect Dis.* 4: 46-50.
- Bandyopadhyay, U., Das, D., Banerjee, R.K. 1999. Reactive oxygen species: oxidative damage and pathogenesis. *Curr Sci.* 77: 658-666.
- Bartlett, T.C., Cuthbertson, B.J., Shepard, E.F., Chapman, R.W., Gross, P.S., Warr, G.W. 2002. Crustins, homologues of an 11.5-kDa anti- bacterial peptide, from two species of penaeid shrimp, *Litopenaeus vannamei* and *Litopenaeus setiferus*. *Mar. Biotechnol.* 4: 278-293.
- Beckage, N.E. 1996. Interactions of viruses with invertebrate cells. En: Soderhall, K., Iwanaga, S., Vasta, G.R. (Eds.), *New Directions in Invertebrate Immunology*. SOS Publication. New York. pp. 375-399.
- Bell, M.V., Dick, J.R. 1990. The fatty acid composition of phospholipids from the eyes of the northern deepwater prawn, *Pandalus borealis*. *Biochem Soc Trans.* 18: 907-908.
- Bell, K.L., Smith, V.J. 1993. In vitro superoxide production by hyaline cells of the shore crab *Carcinus maenas*. *Dev. Comp. Immunol.* 17: 211-219.
- Blokhina, O., Viroleinen, E., Fagerstedt, K.V. 2003. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress. *Ann. Botany* 91: 179-194.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72: 248-254.
- Bustillo-Ruiz, M.I., Escobedo-Bonilla, C.M., Sotelo-Mundo, R.R. 2009. Revisión de

- patogénesis y estrategias moleculares contra el virus del síndrome de la mancha blanca en camarones peneidos. *Revista de biología marina y oceanografía*, 44(1): 1-11.
- Calderón, J., Sonnenholzner, S. 2003. Cultivo de camarón: Experiencia y desafíos en el uso de invernaderos. *El Mundo Acuícola*. 9: 4-8.
- Campa-Córdova, A.I., Hernández-Saavedra, N.Y., De Philippis, R., Ascencio, F., 2002. Generation of superoxide anion and SOD activity in haemocytes and muscle of American white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) as a response to β -glucan and sulphated polysaccharide. *Fish & Shellfish Immunology*. 12: 353-366.
- Cane, P.A., Cook, P., Ratcliffe, D., Mutimer, D., Pillay, D. 1999. Use of real time PCR and fluorimetry to detect lamivudine resistance-associated mutations in hepatitis B virus. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 43: 1600-1608.
- Castex, M., Lemaire, P., Wabete, N., Chim, L. 2009. Effect of dietary probiotic *Pediococcus acidilactici* on antioxidant defences and oxidative stress status of shrimp *Litopenaeus stylirostris*. *Aquaculture*. 294(3): 306-313.
- Chang, E., O'Connor, J.D. 1983. Metabolism and transport of carbohydrates and lipids. En: Mantell, L.H. (ed.), *The biology of Crustacea*. Vol. 5. Internal anatomy and physiological regulation. Academic Press: New York. Pp . 263–287
- Chang, P.S., Lo, C.F., Wang, Y.C., Kou, G.H. 1996. Identification of white spot syndrome associated baculovirus (WSBV) target organs in the shrimp *Penaeus monodon* by in situ hybridization. *Dis. Aquat. Org.* 27:131– 139.
- Chang, P.H., Chen, H.C., Wang, Y.C. 1998. Detection of 80 white spot associated baculovirus in experimentally infected wild shrimp, crab and lobsters by in situ hybridization. *Aquaculture*. 164: 233–242.
- Chang, C.F., Su, M.S., Chen, H.Y., Chiu, I., Liao, I.C. 2003. Dietary - β 1,3-glucan selectively improves immunity and survival of *Penaeus monodon* challenged with white spot syndrome virus. *Fish Shellfish Immunol.* 15, 297-310.
- Cheng, W., Chen, J.C. 2000. Effects of pH, temperature and salinity on immune parameters of the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Fish & Shellfish Immunology*. 10: 387–391.
- Cheng, W., Liu, C.H., Kuo, C.M., Chen, J.C. 2005. Dietary administration of sodium alginate enhances the immune ability of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. *Fish & Shellfish Immunol.* 18: 1–12.
- Chihuailaf, R.H., Contreras, P.A. Wittwer, F.G. 2002. Patogénesis del estrés oxidativo: Consecuencias y evaluación en salud animal Pathogenesis of oxidative stress: Consequences and evaluation in animal health. *Vet. Méx.* 33(3): 265.-283.
- Cotgreave, I.A., Gerdes, R.G. 1998. Recent trends in glutathione biochemistry–glutathione protein interactions: a molecular link between oxidative stress and cell proliferation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 242: 1–9.
- Cunningham, C., Tipton, K. F., H.B. Dixon. 1998. Conversion of taurine into N-chlorotaurine (taurine chloramine) and sulphoacetaldehyde in response to oxidative stress. *The Biochemical journal*. 330(2): 939-45.

- Cuzon, G., Rosas, C., Gaxiola, G., Taboada, G., Wormhoudt, A.V. 2000. Utilization of carbohydrates by shrimp In: Cruz-Suarez, L.E., Ricque- marie, D., Tapia-salazar, M., Olvera-Novoa, M.A., Civera-cerecedo, R. (Eds) Avances en nutrición acuícola. Memorias del V. Simposium Internacional de Nutricion Acuicola, Noviembre, 2001. Merida, Yucatan.
- Dall, W., Hill, J., Rothlisberg, P.C., Shaples, D.J. 1990. The Biology of the Penaeidae. Academic Press, San Diego, CA, 489 pp.
- Dalle-Donne, I., Aldini, G., Carini, M., Colombo, R., Rossi, R., Milzani, A. Protein carbonylation, celular dysfunction, and disease progression. 2006. J. Cell. Mol. Med. 389(10): 406.
- Downs, C., Fauth, J.E., Woodley, C.M., 2001. Assessing the health of grass shrimp (*Palaemonetes pugio*) exposed to natural and anthro-pogenic stressors: a molecular biomarker system. Mar. Biotechnol. 3, 380–397.
- Du, H.H., Li, W.F., Xu, Z.R., Kil, Z.N. 2006. Effect of hyperthermia on the replication of white spot syndrome virus (WSSV) in *Procambarus clarkii*. Dis. Aquat. Org. 71: 175–178.
- Durand, S.V., Redman, R.M., Mohny, L.L., Tang, N.K., Bonami, J.R., Lightner, D.V. 2003. Qualitative and quantitative studies on the relative virus load of tails and heads of shrimp acutely infected with WSSV. Aquaculture. 216: 9-18.
- Echeverría, F., Otero, V., Cornejo, F., Rodríguez, J. 2002. WSSV y ciclo de muda en el camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. El Mundo Acuícola. 8: 43-46.
- Escobedo-Bonilla, C.M., Alday-Sanz, V., Wille, M., Pensaert, M.B., Nauwynck, H.J. 2008. A review on the morfology, molecular characterization, morphogenesis and patogenesis of white spot syndrome virus. J. Fish. Dis. 31: 1-18.
- Esteves, A., Ehrlich, R. 2006. Invertebrate intracellular fatty acid binding proteins. Comp. Biochem. Physiol C. 142(3-4): 262–274.
- Evans, P., B. Halliwell. 2001. Micronutrients: oxidant/antioxidant status. British J. Nutr. 85(S2): 67–74.
- Food and Agriculture Organization. 2007. Anuario de estadísticas de pesca y acuicultura. Rome/Roma, FAO. 2009. 72p.
- Food and Agriculture Organization–Fisheries Department (FAO-FD). 2009. El estado mundial de la pesca y la acuicultura. 196 pp.
- Folhe, L., Gunzler, W.A. 1984. Assays for glutathione peroxidase. Methods Enzymol. 105: 114-120.
- Fridovich I. 1998. Oxygen toxicity: a radical explanation. J. Exp. Biol. 201: 1203-1209.
- Fridovich I. 2004. Mitochondria: are they the seat of senescence? Aging Cell. 3: 13–16.
- Garg, M.C., Ojha, S., Bansal, D.D. 1996. Antioxidant status of streptozotocin diabetic rats. Indian J. Exp. Biol. 34: 264–266.
- Goldberg, D.M., Spooner, R.J. 1983. Glutathione reductase. In: Bergmeyer, H. U. (Ed.). Methods of Enzymatic Analysis. Nueva York. 258–265 pp.
- Gómez-Anduro, G.A., Barillas-Mury, C.V., Peregrino-Uriarte, A.B., Gupta, L., Gollas Galván, T., Hernández-López, J., Yepiz-Plascencia, G. 2006. The cytosolic manganese

- superoxide dismutase from the shrimp *Litopenaeus vannamei*: molecular cloning and expression. *Dev. Comp. Immunol.* 30(10): 893-900.
- Granja, C.B., Vidal, O.M., Parra, G., Salazar, M. 2006. Hyperthermia reduces viral load of white spot syndrome virus in *Penaeus vannamei*. *Dis. Aquat. Org.* 68: 175–180.
- Guan, Y., Yu, Z., Lia, C. 2003. The effects of temperature on white spot syndrome infections in *Marsupenaeus japonicus*. *J. Invert. Pathol.* 83: 257-260
- Habig, W.H., Jakoby, W.B. 1981. Glutathione S-transferases (rat and human). *Methods Enzymol.* 77: 218– 235.
- Halliwell, B. 1999. *Nutr. Rev.* 57,104–113
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. 1999. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press. Nueva York. 851 pp.
- Hampton, M.B., Kettle, A.J., Winterbourn, C.C. 1998. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood.* 92(9): 3007-3017.
- Hansen, J.M., Zhang, H., Jones, D.P. 2006. Differential oxidation of thioredoxin-1, thioredoxin-2, and glutathione by metal ions. *Free Radic. Biol. Med.* 40: 138–145.
- Harper, C. 2002. Chemical Resistance of Pathogens of Aquaculture. *Aquaculture Magazine.* 1-2.
- Hasson, K., Lightner, D., Mohny, L., Redman, R., White, B. 1999. Role of lymphoid organ spheroids in chronic Taura syndrome virus (TSV) infections in *Penaeus vannamei*. *Dis. Aquat. Organ.* 38: 93-105.
- Hasson, K.W., Fan, Y., Reisinger, T., Venuti, J., Varner, P.W. 2006. White-spot syndrome virus (WSSV) introduction into the Gulf of Mexico and Texas freshwater systems through imported, frozen bait-shrimp, *Dis. Aquat. Organ.* 71: 91–100.
- Hermes-Lima, M., Storey, K.B. 1995. Antioxidant defenses and metabolic depression in a pulmonate land snail. *Am. J. Physiol.* 268: 1386-1393.
- Hermes-Lima, M. 2004. Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. In: Storey, K.B. *Functional Metabolism: Regulation and Adaptation*. John Wiley & Sons. New Jersey, NY. pp. 319-368.
- Hermes-Lima, M., Zenteno-Savín, T. 2002. Animal response to drastic changes in oxygen availability and physiological oxidative stress. *Comp. Biochem. Physiol. C.* 133 (4): 537-556.
- Holmblad, T., Söderhäll, K. 1999. Cell adhesion molecules and antioxidative enzymes in a crustacean, possible role in immunity. *Aquaculture* 172: 111–123.
- Huang, C., X, Zhang., Q, Lin., X, Xu., Hew, C.L. 2002. Characterization of a novel envelope protein (VP281) of shrimp white spot syndrome virus by mass spectrometry. *J. Gen. Virol.* 83: 2385-2392.
- Jiang, X.L., Mu, H.J. 1999. Immune mechanisms of penaeid shrimp. En: Guan, H.S. *Studies on the immunology, Cell culture and Disease of Marine Animals*. Shandong Science and technology Press. Jinan, China. pp 5-21.
- Jiménez, R., Barniol, R., De Barniol, L., Machuca, M., Romero, X. 2000. Viral like particles associated with cuticular epithelium necrosis in cultured *Litopenaeus vannamei* (Decapoda: Crustacea) in Ecuador. *Aquac. Res.* 31: 519-528.

- Jiravanichpaisal, P., Söderhäll, K., Söderhäll, I. 2006. Characterization of white spot syndrome virus replication in in vitro-cultured haematopoietic stem cells of freshwater crayfish, *Pacifastacus leniusculus*. J. Gen. Virol. 87: 847-54.
- Johansson, M.W., Lind, M.L., Holmblad, T., Thornqvist, P.O., Soderhall, K., 1995. Peroxinectin a novel cell adhesion protein from crayfish blood. Biochem. Biophys. Res. Commun. 216: 1079–1087.
- Johansson, M.W. 1999. Cell adhesion molecules in invertebrate immunity. Dev. Comp. Immunol. 23: 303–315.
- Kidd, P.M. 1991. Natural antioxidants the first line of defense. En: Kidd, P.M., Huber, W. Living with the AIDS virus: a strategy for long term survival. PMK Biomedical Nutritional Consulting. Albany, Cal. P. 115–142.
- Kimura, H., Morita, M., Yabuta, Y., Kuzushima, K., Kato, K., Kojima, S., Matsuyama, T., Morishima, T. 1999. Quantitative analysis of Epstein–Barr virus load by using a real-time PCR assay. J. Clin. Microbiol. 37: 132–136.
- Lee, D.O., Wickins, J.F. 1992. Crustacean Farming. Blackwell Scientific Publications. Oxford. U.K. 392 pp.
- Le Moullac, G.L., Haffner, P. 2000. Environmental factors affecting immune responses in crustacea. Aquaculture. 191: 121–13
- Lesser, M.P. 2006. Oxidative stress in marine environments: biochemistry and physiological ecology. Ann. Rev. Physiol. 68: 253-78.
- Levine, R.L., Garland, D., Oliver, C.N., Amici, A., Climent, I., Lenz, A., Ahn, B., Shaltiel, S., Stadtman, E.R. 1990. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. Methods Enzymol. 186: 464-478.
- Levine, R.L., Williams, J.A., Stadtman, E.R., Shacter, E. 1994. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. Methods Enzymol. 233: 346-357.
- Lewin, S.R., Vesanen, M., Kostriskis, L., Hurley, A., Duran, M., Zhang, L., Ho D.D., Markowitz, M. 1999. Use of real time PCR and molecular beacons to detect virus replication in human immunodeficiency virus type 1-infected individuals on prolonged effective antiretroviral therapy. J. Virol. 73: 6099–6103.
- Lightner, D.V., Redman, R.M. 1998. Shrimp diseases and current diagnostic methods. Aquaculture. 164: 201-220.
- Lynch, M.P., Webb, K.L. 1973. Variations in serum constituents of the blue crab *Callinectes sapidus* glucose. Comp. Biochem. Physiol. A. 45: 127-139.
- Liu, L., Ciereszko, A., Czesny, S., Dabrowski, K. 1997. Dietary ascorbyl monophosphate depresses lipid peroxidation in rainbow trout spermatozoa. J. Aquat. Anim. Health 9: 249–257.
- Liu, C.H., Yeh, S.T., Cheng, S.Y., Chen, J.C. 2004. The immune response of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio* infection in relation with the moult cycle. Fish & Shellfish Immunology. 16: 151–161.
- Liu, C.H., Tseng, M.C., Cheng, W. 2007. Identification and cloning of the antioxidant enzyme, glutathione peroxidase, of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, and its

- expression following *Vibrio alginolyticus* infection. *Fish & Shellfish Immunology*. 23(1): 34–45.
- Liu, K.F., Yeh, M.S., Kou, G.H., Cheng, W., Lo, C.F. 2010. Identification and cloning of a selenium-dependent glutathione peroxidase from tiger shrimp, *Penaeus monodon*, and its transcription following pathogen infection and related to the molt stages. *Dev. Comp. Immunol.* 34: 935-944.
- Lo, C.F., Ho, C.H., Peng, S.E., Hsu, H.C., Chiu, Y.L., Chang, C.F., Liu, K.F., Su M.S., Wang, C.H., Kou, G.H. 1996. White spot syndrome baculovirus (WSBV) detected in cultured and captured shrimp, crabs and other arthropods. *Dis. Aquat. Org* 27: 215–225.
- Lo, C.F., Ho, C.H., Chen, C.H., Liu, F.K., Chiu, Y.L., Yen, P.Y., Peng, S.E., Hsu, H.C., Liu, H.C., Chang, C.F., Su, M.S., Wang, C.H., Kou, G.H. 1997. Detection and tissue distribution of white spot syndrome baculovirus (WSBV) in captured brooders of *Penaeus monodon* with a special emphasis on reproductive organs. *Dis. Aquat. Org.* 30: 53-72.
- Lo, C.F., Hsu, H.C., Tsai, M.F., Ho, H.C., Peng, S.E., Kou, G.H., Lightner, D.V. 1999. Specific genomic DNA fragment analysis of different geographical clinical samples of shrimp white spot syndrome virus. *Dis. Aquat. Org.* 35: 175–185.
- Lushchak, V. I. 2007. Free radical oxidation of proteins and its relationship with functional state of organisms. *Biochemistry.* 72(8): 809-827.
- Mallinowski, D.P., Fridovich, I. 1979. Subunit association and side chain reactivities of bovine erythrocyte superoxide dismutase in denaturing solvents. *Biochemistry.* 18: 5055–5060.
- Mathew, S., Kumar, K.A., Anandan, R., Viswanathan Nair, P.G., Devadasan, K. 2007. Changes in tissue defence system in white spot syndrome virus (WSSV) infected *Penaeus monodon*. *Comp Biochem Physiol C.* 145(3): 315-20
- Mathew, S., Kumar, K.A., Anandan, R., Viswanathan Nair, P.G., Devadasan, K. 2007b. Biochemical studies on changes associated with enzymes of glucose metabolism in white spot syndrome virus (WSSV) infected with *Penaeus monodon* (Fabricius). *African. J. Biotech.* 6 (16): 1944-1948
- McClennen, C. 2004. White spot syndrome virus, the economic, environmental and technical implications on the development of latin american shrimp farming. The Fletcher School. Tufts University. Medford, MA. 106 pp.
- McCord, J.M. 1988. Free radicals and myocardial ischemia: Overview and outlook. *Free. Radic. Biol. Med.* 4: 9–14.
- Maldonado, M., Rodríguez, J., Blas, I. 2004. El camarón de cultivo frente al WSSV, su principal patógeno. *Revista AquaTIC.* 21: 78–91.
- Meister, A., Anderson, M.E. 1983. Glutathione. *Annu. Rev. Biochem.* 52: 711–760.
- Meng, X.H., Jang, I. K., Seo, H.C., Cho, Y.R. 2010. A TaqMan real-time PCR assay for survey of white spot syndrome virus (WSSV) infections in *Litopenaeus vannamei* postlarvae and shrimp of farms in different grow-out seasons. *Aquaculture.* 310(1-2): 32-37.

- Mercier, L., Palacios, E., Campa-cordova, A., Tovar-Ramírez, D., Hernandez-Herrer, R., Racotta, I. 2006. Metabolic and immune responses in Pacific whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* exposed to a repeated handling stress. *Aquaculture*, 258(1-4): 633-640.
- Mohankumar, K., Ramasamy, P. 2006. White spot syndrome virus infection decreases the activity of antioxidant enzymes in *Fenneropenaeus indicus*. *Virus Res.* 115: 69–75.
- Moss, S.M. 2002. Marine shrimp farming in the western hemisphere: past problems, present solutions, and future visions. *Rev. Fish Sci.* 10: 601–620.
- Moullac, G.L., Soyez, C. Saulnier, D., Ansquer, D., Avarre, J.C., Levy, P. 1998. Effect of hypoxic stress on the immune response and the resistance to vibriosis of the shrimp *Penaeus stylirostris*. *Fish and Shellfish Immunology.* 8: 621–629.
- Mourente, G., Díaz-Salvago, E. 1999. Characterization of antioxidant systems, oxidation status and lipids in brain of wild-caught size-class distributed *Aristeus antennatus* (Risso, 1816) Crustacea, Decapoda. *Comp. Biochem. Physiol B.* 124(4): 405-416.
- Muñoz, M., Cedeño, R., Rodríguez, J., Van der Knaap, W.P.W., Mialhe, E., Bachère, E. 2000. Measurement of reactive oxygen intermediate production in haemocytes of the penaeid shrimp, *Penaeus vannamei*. *Aquaculture.* 191:89-107.
- Nagaoka, S., Okauchi, Y., Urano, S., Nagashima, U. 1990. Kinetic and ab initio study of the prooxidation of vitamin E: hydrogen abstraction from fatty esters and egg yolk lecithin. *J. Am. Chem.* 112: 8921–8924.
- Neves, C.A., Santos, E.A., Bairy, A.C.D. 2000. Reduced superoxide dismutase activity in *Palaemonetes argentinus* (Decapode, Palaemonidae) infected by *Probopyris ringueleti* (Isopoda, Bopyridae). *Dis. Aquat. Org.* 39: 155–158.
- Nohl, H., Gille, L., Staniek, K. 2004. The mystery of reactive oxygen species derived from cell respiration. *Acta biochimica Polonica.* 51(1): 223-229.
- Nordberg, J., Arnér, E.S. 2001. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic. Biol. Med.* 31(11): 1287-1312.
- Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K. 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 95: 331–358.
- Pan, C.H., Chien, Y.H., Hunter, B. 2003. Alterations of antioxidant capacity and hepatopancreatic enzymes in *Penaeus monodon* (Fabricius) Juveniles fed diets supplemented with Astaxanthin and exposed to *Vibrio damsela* challenge. *J. Fish Soc. Taiwan.* 30: 279–290.
- Parvez, S., Raisuddin, S. 2005. Protein carbonyls: novel biomarkers of exposure to oxidative stress-inducing pesticides in freshwater fish *Channa punctata* (Bloch). *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 20: 112-117.
- Perry, A.C., Jones, R., Niang, L.S., Jackson, R.M., Hall, L. 1992. Genetic evidence for an androgen-regulated epididymal secretory glutathione peroxidase whose transcript does not contain a selenocysteine codon. *J. Biochem.* 285: 863–870.
- Persky, A.M., Green, P.S., Tubley, L., Howell, C.O., Zaulyanov, L., Brzaeau, G.A., Simpkins, J.W. 2000. Protective effect of estrogens against oxidative damage to heart and skeletal muscle in vivo and in vitro. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 223: 59–66.

- Powell, J.W.B., Burge, E.J., Browdy, C.L., Shepard, E.F. 2006. Efficiency and sensitivity determination of Shrimple®, an immunochromatographic assay for white spot syndrome virus (WSSV), using quantitative real-time PCR. *Aquaculture*. 257: 167-172.
- Plumb, J.A. 2001. Overview of warm water fish diseases. En: Chhorn, Lim. Webster, C.D. Nutrition and Fish Health. Food Products Press. USA. pp. 1-10.
- Racotta, I.S., Hernández-Herrera, R., 2000. Metabolic responses of the white shrimp, *Penaeus vannamei*, to ambient ammonia. *Comp. Biochem. Physiol. A*. 125: 437-443.
- Racotta, I.S., Palacios, E. 1998. Hemolymph metabolic variables in response to experimental manipulation stress and serotonin injection in *Penaeus vannamei*. *J. World Aquac. Soc.* 29: 351-356.
- Rahman, M.M., Escobedo-Bonilla, C.M., Corteel, M., Dantas-Lima, J.J., Wille, M., Alday Sanz, V., Pensaert, M.B., Sorgeloos, P., Nauwynck, H.J. 2006. Effect of high water temperature (33°C) on the clinical and virological outcome of experimental infections with white spot syndrome virus (WSSV) in specific pathogen-free (SPF) *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*. 261: 842-849.
- Rahman, M., Corteel, M., Wille, M., Aldaysanz, V., Pensaert, M., Sorgeloos, P. 2007. The effect of raising water temperature to 33 °C in *Penaeus vannamei* juveniles at different stages of infection with white spot syndrome virus (WSSV). *Aquaculture*. 272(1-4): 240-245.
- Rajan, P.R., Ramasamy, P., Purushothaman, V., Brennan, G.P. 2000. White spot baculovirus syndrome in the Indian shrimp *Penaeus monodon* and *Penaeus indicus*. *Aquaculture*. 184: 31-44.
- Rameshthangam, P., Ramasamy, P. 2005. Protein expression in white spot syndrome virus infected *Penaeus monodon Fabricius*. *Virus Res.* 110: 133-141.
- Rameshthangam, P., Ramasamy, P. 2006. Antioxidant and membrane bound enzymes activity in WSSV-infected *Penaeus monodon Fabricius*. *Aquaculture*. 254: 32 -39.
- Ren, Q., Sun, R.R., Zhao, X.F., Wang, J.X. 2009. A selenium-dependent glutathione peroxidase (Se-GPx) and two glutathione S-transferases (GSTs) from Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*). *Comp. Biochem. Physiol. C*. 149(4): 613-623.
- Reyes, A., Salazar, M., Granja, C. 2007. Temperature modifies gene expression in subcuticular epithelial cells of white spot syndrome virus-infected *Litopenaeus vannamei*. *Dev. Comp. Immunol.* 31: 23-29.
- Ryncarz, A.J., Goddardet, J., Wald, A., Huang, M.L., Roizman, B., Corey, L. 1999. Development of a high-throughput quantitative assay for detecting herpes simplex virus DNA in clinical samples. *J. Clin. Microb.* 37: 1941-1947.
- Roch, P. 1999. Defense mechanisms and disease prevention in farmed marine invertebrates. *Aquaculture*. 172: 125-145.
- Rodríguez, J., Le Moullac, G. 2000. State of the art of immunological tools and health control of penaeid shrimp. *Aquaculture*. 191:109-119.
- Rodríguez, J., Bayot, B., Amano, Y., Panchana, F., de Blas, I., Alday, V., Calderón, J. 2003. White spot syndrome virus infection in cultured *Penaeus vannamei* (Boone) in Ecuador with emphasis on histopathology and ultrastructure. *J. Fish Dis.* 26: 439-450.

- Rosenstiel, P., Philipp, E.E.R., Schreiber, S., Bosch, T.C.G. 2009. Evolution and function of innate immune receptors insights from marine invertebrates. *J. Innate immun.* 1(4): 291-300.
- Ruan, Y.H., Kuo, C.M., Lo, C.F., Lee, M.H., Lian, J.L., Hsieh, S.L. 2010. Ferritin administration effectively enhances immunity, physiological responses, and survival of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) challenged with white spot syndrome virus. *Fish & Shellfish Immunology.* 28(4): 542-548.
- Sánchez-Martínez, J.G., Aguirre-Guzmán, G., Mejía-Ruíz, H. 2007. White Spot Syndrome Virus in cultured shrimp: A review. *Aquac. Res.* 38: 1339-1354
- Sánchez-Paz, A. 2010. White spot síndrome virus: an overview on an emergent concern. *Vet. Res.* 41-43.
- Sahul Hameed, A.S., Sarathi, M., Sudhakaran, R., Balasubramanian, G., Syed Musthaq, S. 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.* 256: 111–120.
- Semchyshyn, H.M. 2002. Biochemical Peculiarities of *Escherichia coli* Strains with Different Sensitivity to Oxygen: Thesis Ph. D. Chernivtsi National University, Chernivtsi.
- Sies, H. 1986. Oxidative stress. Academic Press. San Diego. 507 pp.
- Sies, H. 1991. Role of Reactive Oxygen Species in Biological Processes. *Klin Wochenschr.* 69: 965-968
- Skulachev, V.P. 1998. Possible role of reactive oxygen species in antiviral defense. *Biochem.* 63: 1438–1691.
- Smith, V.J., Brown, J.H., Hauton, C. 2003. Immunostimulation in crustaceans: does it really protect against infection. *Fish & Shellfish Immunol.* 15: 71-90.
- Song, M., Hsieh, Y. 1994. Immunostimulation of tiger shrimp (*Penaeus monodon*) haemocytes for generation of microbicidal substances: analysis of reactive oxygen species. *Dev. Comp. Immunol.* 18: 201–209.
- Song, Y.L., Yu, C.I., Lien, T.W., Huang, C.C., Lin, M.N. 2003 Haemolymph parameters of pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) infected with Taura syndrome virus. *Fish & Shellfish Immunol.* 14: 317-331.
- Sonnenholzner, S., Rodríguez, J., Pérez, F., Betancourt, I., Echeverría, F., Calderón, J. 2002. Supervivencia y respuesta inmune de camarones juveniles *Litopenaeus vannamei* desafiados por vía oral a WSSV a diferentes temperaturas. *El Mundo Acuícola* 8(1): 50-56.
- Sritunyalucksana, K., Srisal, J., Mccoll, K., Nielsen, L., Flegel, T. 2006. Comparison of PCR testing methods for white spot syndrome virus (WSSV) infections in penaeid shrimp. *Aquaculture.* 255(1-4): 95-104.
- Stadtman, E.R. 1986. Oxidation of proteins by mixed function oxidation system: implication in protein turnover, aging and neutrophil function. *Trends Biochem.* 11: 11.
- Stadtman, E.R., Levine, R.L. 2000. Protein oxidation. *Ann. NY Acad. Sci.* 899: 191- 208.
- Storey, K.B. 1996. Oxidative stress: animal adaptation in nature. *Brazilian Journal of Biological Research.* 29: 1715-1733.

- Suttle, C.A. 2007. Marine viruses: major players in the global ecosystem. *Nat. Rev. Microbiol.* 5: 801-812.
- Suzuki, K. 2000. Measurement of Mn-SOD and Cu, Zn-SOD. En: Taniguchi N, Gutteridge, J. *Experimental Protocols for Reactive Oxygen and Nitrogen Species*. Oxford University Press, Londres. pp. 91-95.
- Schwarz, K.B. 1996. Oxidative stress during viral infection: a review. *Free Radic. Biol. Med.* 21: 641-649.
- Tavares-Sánchez, O.L., Gómez-Anduro, G.A., Felipe-Ortega, X., Islas-Osuna, M.A., Sotelo-Mundo, R.R., Barillas-Mury, C. 2004. Catalase from the white shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*: molecular cloning and protein detection. *Comp Biochem. Physiol B.* 138(4): 331-337.
- Telford, M. 1968. Changes in blood sugar composition during the molt cycle of the lobster *Homarus americanus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 26: 917-926.
- Tu, H.T., Silvestre, F., Bernard, A., Douny, C., Phuong, N.T., Tao, C.T., Maghuin-Rogister, G., Kestemont, P. 2008. Oxidative stress response of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) to enrofloxacin and to culture system. *Aquaculture.* 285 (1-4): 244-248.
- Unzueta-Bustamante, M.L. 2001. Distribución, incidencia y transmisión del virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV) en el cultivo de camarón blanco del pacífico (*Litopenaeus vannamei*) cultivado en el noroeste de México. Tesis de Doctorado. CICESE. 86 pp.
- Ursini, F., Maiorino, M., Brigelius-Flohé, R., Aumann, K.D., Roveri, A., Schomburg, D., Flohé, L. 1995. Diversity of glutathione peroxidases. *Methods Enzymol.* 252: 38-53.
- Van Hulten, M.C., Witteveldt, J., Peters, S., Kloosterboer, N., Tarchini, R., Fiers, M., Sandbrink, H., Lankhorst, R.K., Vlaskov, J.M. 2001. The white spot syndrome virus DNA genome sequence. *Virol.* 286: 7-22
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncola, J., Cronin, M.T.D., Mazura, M., Telser, J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 39: 44-84.
- Vargas-Albores, F., Hinojosa-Baltazar, P., Portillo-Clark, G., Magallón-Barajas, F. 1998. Influence of temperature and salinity on the yellowleg shrimp, *Penaeus californiensis* Holmes, prophenoloxidase system. *Aquac. Res.* 29: 549-553.
- Vargas-Albores, F., G. Yepiz-Plascencia. 2000. Beta glucan binding protein and its role in shrimp immune response. *Aquaculture* 191, 13-21
- Vidal, O., C. Granja., F. Aranguren. 2001. A profound effect of hyperthermia on survival of *Litopenaeus vannamei* juveniles infected with White Spot Syndrome Virus. *J. World Aquac. Soc.* 32(4): 364-372.
- Vijayan, K.K., Raj, V.S., Balasubramanian, C.P., Alavandi, S.V., Sekhar, V.T., Santiago, T.C. 2005. Polychaete worms a vector for white spot syndrome virus (WSSV), *Dis. Aquat. Organ.* 63: 107-111.
- Virella, G. 2001. *Medical Immunology*. Fifth edition. Medical University of South Carolina. Marcel Dekker, Inc. 656 pp.

- Villarreal, H., Ocampo, L. 1993. Effect of size and temperature in the oxygen consumption of the brown shrimp *Penaeus californiensis* (Holmes, 1900). *Comp. Biochem. Physiol. A.* 106: 97-101.
- Wayner, D.D.M., Burton, G.W., Ingold, K.U., Barclay, L.R.C., Locke, S.J. 1987. The relative contribution of vitamin E, urate, ascorbate and proteins to the total peroxy radical-trapping antioxidant activity of human blood plasma. *Biochem. Biophys. Acta* 924: 408-419.
- Wang, S.Y., Hong, C., Lotz, J.M. 1995. Development of a PCR procedure for the detection of penaeid baculovirus in shrimp. *Dis. Aquat. Org.* 25: 123-131.
- Wang, Q.B., Poulos, B.T., Lightner, D.V. 2000. Protein analysis of geographic isolates of shrimp white spot syndrome virus. *Arch. Virol.* 145: 265-274.
- Wang, F.I., Chen, J.C. 2006. Effect of salinity on the immune response of tiger shrimp *Penaeus monodon* and its susceptibility to *Photobacterium damsela* subsp. *Damsela*. *Fish & Shellfish Immunology.* 20: 671-681.
- Wang, X., Lu, Z., Zhu, L., Zhang, Y., Ren, Y., Wang, Y. 2010. Innate immune response and related gene expression in red swamp crayfish *Procambarus clarkii* (Girard), induced by selenium-enriched exopolysaccharide produced by bacterium *Enterobacter cloacae*. *Aquac. Res.* 41(11): 819-827.
- Willmore, W.G., Storey, K.B. 1997. Antioxidant systems and anoxia tolerance in a freshwater turtle, *Trachemys scripta elegans*. *Mol. Cell. Biochem.* 170: 177-185.
- Wilson J.E. 2003. Isozymes of mammalian hexokinase: structure, subcellular localization and metabolic function. *J. Exp. Biol.* 206: 2049-2057.
- Winterbourn, C.C. 2008. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. *Nat. Chem. Biol.* 4(5): 278-86.
- Wu, W., Rongrong, Z., Jianyang, X., Xiaobo, Z. 2008. Antiviral phagocytosis is regulated by a novel Rab-dependent complex in shrimp *Penaeus japonicus*. *Proteome Res.* 7: 424-431.
- Yan, D.C., Dong, S.L., Huang, J., Yu, X.M., Feng, M.Y., Liu, X.Y. 2004. White spot syndrome virus (WSSV) detected by PCR in rotifers and rotifer resting eggs from shrimp pond sediments. *Dis. Aquat. Org.* 59: 69-73.
- Yeh, S.T., Li, C.C., Tsui, W.C., Lin, Y.C., Chen, J.C. 2010. The protective immunity of white shrimp *Litopenaeus vannamei* that had been immersed in the hot-water extract of *Gracilaria tenuistipitata* and subjected to combined stresses of *Vibrio alginolyticus* injection and temperature change. *Fish & Shellfish Immunology.* 29(2): 271-278.
- Yepiz-Plascencia, G., Vargas-Albores, F., Higuera-Ciapara, I. 2000. Penaeid shrimp hemolymph lipoproteins. *Aquaculture.* 191(1-3): 177-189.
- Yoganandhan, K., Sathish, S., Murugan, V., Narayanan, R.B., Sahul Hameed, A.S. 2003. Screening the organ for early detection of white spot syndrome virus in *Penaeus indicus* by histopathology and PCR techniques. *Aquaculture.* 215: 21-29.
- Yu, B.P. 1994. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol. Rev.* 74: 139-162.

- Zamocky, M., Furtmüller, P.G., Obinger, C. 2008. Evolution of Catalases from Bacteria to Humans. *Antioxidants and Redox Signaling*. 10(9): 1527-1548.
- Zhang, Z.F., Shao, M.Y., Kang, K.H. 2005. Changes of enzyme activity and hematopoiesis in Chinese prawn *Fenneropenaeus chinensis* (Osbeck) induced by white spot syndrome virus and zymosan A. *Aquac. Res.* 36: 674–681.
- Zhang, Q., Li, F., Zhan X., Dong, B., Zhang, J., Xie, Y. 2008. cDNA cloning, characterization and expression analysis of the antioxidant enzyme gene, catalase, of Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. *Fish & shellfish immunology*. 24(5): 584-91.
- Zar, J.H. 1999. *Biostatistical Analysis*. Prentice-Hall. Nueva Jersey. 123 pp.
- Zenteno-Savín, T., Saldierna, R., Ahuejote-Sandoval, M. 2006. Superoxide radical production in response to environmental hypoxia in cultured shrimp. *Comparative biochemistry and physiology*. *Comp. Biochem. Physiol C*. 142: 301-308.
- Zhao, X.F., Wang, J.X. 2008. The antimicrobial peptides of the immune response of shrimp. *ISJ* 5: 162-179.
- Zuidema, D., Van Hulten, M.C.W., Marks, H., Witteveldt, J., Vlak, J.M. 2004. Virus-host interactions of white spot syndrome virus. In: Leung K.Y. *Current trends in the study of bacterial and viral fish and shrimp diseases*. World Scientific, Singapore, 421 pp.

11. LISTA DE TABLAS

Tabla I. Contenido de proteínas totales (mg mL^{-1}) en tejidos de camarón blanco expuesto a virus de la mancha blanca (N=6).

Proteínas totales				
Tratamiento	Músculo	Branquias	Hepatopáncreas	Hemolinfa
Control 0	2.075 ± 0.084	2.652 ± 0084	2.204 ± 0.098	71.01 ± 7.41
Control I	2.095 ± 0.069	2.243 ± 0.204	2.277 ± 0.089	49.32 ± 4.21
1 H Pi	2.140 ± 0.119	2.142 ± 0.187	2.192 ± 0.106	41.24 ± 5.61
24 H Pi	2.160 ± 0.080	2.323 ± 0.079	2.277 ± 0.086	57.13 ± 4.04
48 H Pi	2.077 ± 0.087	2.208 ± 0.113	1.731 ± 0.246	42.38 ± 2.94

Control 0= No sufrieron tratamiento, Control I = Inyectados con inóculo inerte, 1 H Pi= 1 hora post-infección, 24 H Pi= 24 horas post-infección, 48 H Pi= 48 horas post-infección. Los resultados se presentan como media ± error estándar.

Tabla II. Contenido de lípidos totales (mg mL^{-1}) en tejidos de camarón blanco expuesto a virus de la mancha blanca (N=6).

Lípidos totales				
Tratamiento	Músculo	Branquias	Hepatopáncreas	Hemolinfa
Control 0	9.149 ± 0.815	31.042 ± 0.652	79.420 ± 3.867	98.06 ± 17.95
Control I	6.828 ± 0.675	123.317 ± 3.48	60.459 ± 7.776	75.5 ± 17.25
1 H Pi	7.089 ± 0.586	111.593 ± 4.80	69.123 ± 9.057	100.23 ± 3.03
24 H Pi	7.217 ± 0.907	106.776 ± 5.88	80.129 ± 4.940	100.42 ± 3.59
48 H Pi	6.821 ± 0.893	106.420 ± 3.15	64.651 ± 14.141	132.02 ± 4.51

Control 0= No sufrieron tratamiento, Control I = Inyectados con inóculo inerte, 1 H Pi= 1 hora post-infección, 24 H Pi= 24 horas post-infección, 48 H Pi= 48 horas post-infección. Los resultados se presentan como media \pm error estándar.

Tabla III. Actividad enzimática de superóxido dismutasa (SOD), expresados como U $\text{mg de proteína}^{-1}$, en tejidos de camarón blanco expuesto a virus de la mancha blanca (N=6).

Superóxido dismutasa (SOD)				
Tratamiento	Músculo	Branquias	Hepatopáncreas	Hemolinfa
Control 0	0.031 ± 0.006	0.037 ± 0.004	0.075 ± 0.015	0.0005 ± 0.00005
Control I	0.014 ± 0.001	0.013 ± 0.001	0.018 ± 0.001	0.0007 ± 0.00006
1 H Pi	0.017 ± 0.002	0.018 ± 0.001	0.018 ± 0.001	0.0009 ± 0.00001
24 H Pi	0.080 ± 0.002	0.109 ± 0.013	0.125 ± 0.045	0.0006 ± 0.00008
48 H Pi	0.045 ± 0.008	0.081 ± 0.026	0.175 ± 0.033	0.0008 ± 0.00007

Control 0= No sufrieron tratamiento, Control I = Inyectados con inóculo inerte, 1 H Pi= 1 hora post-infección, 24 H Pi= 24 horas post-infección, 48 H Pi= 48 horas post-infección. Los resultados se presentan como media \pm error estándar.

Tabla IV. Actividad enzimática de catalasa (CAT), expresados como U mg de proteína⁻¹, en tejidos de camarón blanco expuesto a virus de la mancha blanca (N=6).

Catalasa (CAT)				
Tratamiento	Músculo	Branquias	Hepatopáncreas	Hemolinfa
Control 0	12.77 ± 2.16	9.16 ± 0.98	380.2 ± 90.33	0.47 ± 0.16
Control I	1.94 ± 0.31	3.11 ± 0.60	58.66 ± 12.18	0.60 ± 0.08
1 H Pi	2.99 ± 0.79	2.57 ± 0.85	76.36 ± 16.47	0.76 ± 0.13
24 H Pi	12.09 ± 2.97	17.89 ± 4.26	439.6 ± 81.96	0.37 ± 0.14
48 H Pi	11.74 ± 1.58	22.07 ± 7.31	355.1 ± 56.38	0.25 ± 0.04

Control 0= No sufrieron tratamiento, Control I = Inyectados con inóculo inerte, 1 H Pi= 1 hora post-infección, 24 H Pi= 24 horas post-infección, 48 H Pi= 48 horas post-infección. Los resultados se presentan como media ± error estándar

Tabla V. Actividad enzimática de glutatión peroxidasa (GPx), expresados como mU mg de proteína⁻¹, en tejidos de camarón blanco expuesto a virus de la mancha blanca (N=6).

Glutatión peroxidasa (GPx)				
Tratamiento	Músculo	Branquias	Hepatopáncreas	Hemolinfa
Control 0	18.24 ± 9.66	15.19 ± 2.23	67.06 ± 16.04	0.23 ± 0.01
Control I	13.15 ± 2.02	12.19 ± 0.95	12.71 ± 2.72	0.21 ± 0.05
1 H Pi	4.67 ± 1.56	14.58 ± 1.66	16.13 ± 1.73	0.33 ± 0.11
24 H Pi	49.11 ± 8.88	64.54 ± 10.2	86.88 ± 27.10	0.34 ± 0.06
48 H Pi	9.49 ± 2.92	20.63 ± 3.86	23.05 ± 28.79	0.25 ± 0.03

Control 0= No sufrieron tratamiento, Control I = Inyectados con inóculo inerte, 1 H Pi= 1 hora post-infección, 24 H Pi= 24 horas post-infección, 48 H Pi= 48 horas post-infección. Los resultados se presentan como media ± error estándar.

Tabla VI. Actividad enzimática de glutatión reductasa (GR), expresados como mU mg de proteína⁻¹, en tejidos de camarón blanco expuesto a virus de la mancha blanca (N=6)

Glutatión reductasa (GR)			
Tratamiento	Músculo	Branquias	Hepatopáncreas
Control 0	0.011 ± 0.007	0.002 ± 0.001	0.013 ± 0.005
Control I	0.002 ± 0.001	0.003 ± 0.001	0.003 ± 0.001
1 H Pi	0.003 ± 0.001	0.003 ± 0.001	0.003 ± 0.001
24 H Pi	0.025 ± 0.007	0.030 ± 0.011	0.041 ± 0.016
48 H Pi	0.012 ± 0.005	0.034 ± 0.016	0.026 ± 0.007

Control 0= No sufrieron tratamiento, Control I = Inyectados con inóculo inerte, 1 H Pi= 1 hora post-infección, 24 H Pi= 24 horas post-infección, 48 H Pi= 48 horas post-infección. Los resultados se presentan como media ± error estándar.

Tabla VII. Actividad enzimática de glutatión S- transferasa (GST), expresados como mU mg de proteína⁻¹, en tejidos de camarón blanco de camarón blanco expuesto a virus de la mancha blanca (N=6)

Glutatión S-transferasa (GST)				
Tratamiento	Músculo	Branquias	Hepatopáncreas	Hemolinfa
Control 0	161.67 ± 42.07	0.59 ± 0.11	0.063 ± 0.015	0.0032 ± 0.0003
Control I	29.37 ± 12.02	0.25 ± 0.02	0.033 ± 0.003	0.0017 ± 0.0001
1 H Pi	34.26 ± 3.66	0.13 ± 0.02	0.040 ± 0.010	0.0015 ± 0.0001
24 H Pi	215.86 ± 53.18	0.11 ± 0.06	0.254 ± 0.076	0.0012 ± 0.0001
48 H Pi	167.98 ± 43.26	0.56 ± 0.18	0.162 ± 0.060	0.0032 ± 0.0003

Control 0= No sufrieron tratamiento, Control I = Inyectados con inóculo inerte, 1 H Pi= 1 hora post-infección, 24 H Pi= 24 horas post-infección, 48 H Pi= 48 horas post-infección. Los resultados se presentan como media ± error estándar.

Tabla VIII. Contenido de carbonilos protéicos (nmol mg de tejido⁻¹) en tejidos de camarón blanco expuesto a virus de la mancha blanca (N=6)

Carbonilos protéicos				
Tratamiento	Músculo	Branquias	Hepatopáncreas	Hemolinfa
Control 0	47.901 ± 6.934	102.41 ± 8.917	28.558 ± 4.203	33.48 ± 4.53
Control I	101.28 ± 13.43	114.41 ± 10.81	67.304 ± 12.738	12.26 ± 1.92
1 H Pi	271.84 ± 26.71	47.901 ± 6.934	87.398 ± 11.457	18.59 ± 1.35
24 H Pi	301.88 ± 18.05	102.39 ± 2.857	104.73 ± 23.10	22.95 ± 4.51
48 H Pi	255.12 ± 23.275	234.653 ± 9.954	131.36 ± 14.21	54.45 ± 30.9

Control 0= No sufrieron tratamiento, Control I = Inyectados con inóculo inerte, 1 H Pi= 1 hora post-infección, 24 H Pi= 24 horas post-infección, 48 H Pi= 48 horas post-infección. Los resultados se presentan como media ± error estándar.

Tabla IX. Contenido de lípidos peroxidados (TBARS) (nmol mg de proteína⁻¹) en tejidos de camarón blanco expuesto a virus de la mancha blanca (N=6)

Lípidos peroxidados (TBARS)				
Tratamiento	Músculo	Branquias	Hepatopáncreas	Hemolinfa
Control 0	0.058 ± 0.005	0.075 ± 0.015	2.174 ± 0.619	0.019 ± 0.002
Control I	0.061 ± 0.010	0.071 ± 0.026	0.614 ± 0.118	0.024 ± 0.009
1 H Pi	0.116 ± 0.021	0.116 ± 0.027	0.595 ± 0.046	0.032 ± 0.003
24 H Pi	0.185 ± 0.007	0.144 ± 0.027	3.767 ± 1.219	0.022 ± 0.001
48 H Pi	0.174 ± 0.010	0.144 ± 0.022	5.276 ± 0.732	0.028 ± 0.002

Control 0= No sufrieron tratamiento, Control I = Inyectados con inóculo inerte, 1 H Pi= 1 hora post-infección, 24 H Pi= 24 horas post-infección, 48 H Pi= 48 horas post-infección. Los resultados se presentan como media ± error estándar.

Tabla X. Matriz de correlación con eigenvalores para todos los componentes extraídos del análisis de componentes principales.

Componente	Total	% de varianza por factor	% de varianza acumulada	Eigenvalores-acumulada
1	3.212	40.148	40.148	3.211856
2	1.856	23.194	63.342	5.067396
3	1.141	14.268	77.611	6.208842
4	.621	7.768	85.379	6.830304
5	.516	6.448	91.827	7.346145
6	.428	5.355	97.182	7.774546
7	.149	1.860	99.042	7.923347
8	.077	.958	100.000	8.000000

Tabla XI. Coeficientes de correlación extraídos de los componentes principales para todas las variables analizadas.

Variables	Componente 1	Componente 2	Componente 3
Proteínas totales	0.549566	-0.590098	-0.033031
CAT	-0.800247	-0.409787	0.183200
SOD	-0.924527	0.004037	-0.228033
GST	-0.394005	0.392174	-0.777156
GPx	-0.649179	-0.284808	0.122303
TBARS	-0.845277	-0.359156	0.184294
Carbonilos proteicos	-0.321392	0.759268	0.086400
Lípidos Totales	0.142226	-0.631653	-0.628041
Varianza explicada	3.211856	1.855540	1.141446
Prp.Total	0.401482	0.231943	0.142681

Los valores mayores a .70000 se consideraron significativos.