



CENAIM – ESPOL

CENTRO NACIONAL DE ACUICULTURA E INVESTIGACIONES MARINAS

“EDGAR ARELLANO M.”

“Efecto de la proteína de choque térmico (HSP70) sobre la susceptibilidad del camarón *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* al WSSV y sobre la capacidad de los hemocitos para tolerar condiciones de estrés”

TESIS DE GRADO

Previo a la obtención del título de:

BIÓLOGO MARINO

Presentada por:

ROSA ELENA SANTANDER BERMEO

Santa Elena – Ecuador

2009

1. INTRODUCCIÓN

La Acuicultura es el cultivo de organismos acuáticos y su origen se remonta al siglo V antes de Cristo en China, de donde provienen las primeras evidencias que describen el cultivo de carpas, tanto para fines ornamentales como alimenticios (Tacon, 1989).

Actualmente, la acuicultura es el sector productor de alimento de mayor crecimiento en el mundo y una gran proporción de esta producción (90%) proviene de países en vías de desarrollo (Subasinghe, 2005).

En particular, el cultivo de camarón marino constituye una importante industria en América Latina, la cual produce aproximadamente el 25% del camarón consumido a nivel mundial (Rosenberry, 2005). Esta industria proporciona empleo a centenares de miles de trabajadores, generando importantes beneficios económicos y un producto alimenticio de alta calidad.

Una de las principales amenazas al desarrollo del cultivo de camarón marino es la aparición de enfermedades de origen infeccioso, principalmente las causadas por virus y bacterias (Lightner & Redman, 1998). Particularmente, el Virus del Síndrome de la mancha blanca (White spot syndrome virus - WSSV), agente etiológico de la enfermedad de la mancha blanca (White spot disease – WSD), es el que ha producido mayor devastación sobre los sistemas de producción de camarón cultivado, debido a su gran rango de hospederos y su extrema virulencia (Wang *et al.*, 1998).

Por otro lado, el estrés es considerado el factor más importante en la transformación de una infección en una enfermedad a nivel del hospedero (Overstreet, 1978), ya que ha sido implicado en el desarrollo de las enfermedades en animales acuáticos, tanto en acuicultura (Houghton & Matthews, 1986) como en condiciones naturales (Ross *et al.*, 1996).

El estrés se manifiesta por respuestas moleculares y fisiológicas que pueden ser evaluadas por indicadores moleculares y bioquímicos (Sánchez *et al.*, 2001).

Entre los más importantes indicadores de estrés se encuentran las proteínas de choque térmico ó “Heat-shock proteins” (HSPs), las cuales constituyen un grupo de proteínas considerablemente conservadas que tienen funciones protectoras generales en todos los organismos vivos (Parsell & Lindquist, 1993).

La proteína de choque térmico 70 ó HSP70, ha sido ampliamente estudiada en vertebrados y es una de las más conservadas en los seres vivos, desde bacterias a seres humanos (Gupta & Golding, 1993; Morimoto *et al.*, 1997).

Esta proteína es de particular interés por estar asociada con protección contra el estrés fisiológico (Volker *et al.*, 1992) y contra el efecto patógeno de agentes infecciosos (de la Vega *et al.*, 2006; Song *et al.*, 2006; Sung *et al.*, 2007).

Por ello, el estudio del rol de las HSPs sobre la respuesta inmune del camarón podría promover el diseño de alternativas más eficientes para que el hospedero pueda afrontar mejor el impacto de los agentes patógenos presentes en el medio, particularmente el WSSV.

El objetivo de este trabajo es establecer si la expresión de HSP70, determinada mediante inmunoensayos (Western blot y/o Enzyme-linked ImmunoSorbent Assay - ELISA) durante una situación de estrés generada por hipertermia (32°C) está asociada con la conservación de la capacidad inmunitaria de los hemocitos (fagocitosis y generación de anión superóxido) y con la resistencia a WSSV en condiciones de hipertermia.

2. ANTECEDENTES

2.1. Heat shock proteins (HSPs): Generalidades

Las HSPs actúan como chaperonas moleculares que regulan la homeostasis de proteínas y el doblaje y desdoble de las proteínas después de una desnaturalización parcial (McLennan & Millar, 1990). Adicionalmente, bajo condiciones de estrés, las HSPs son sintetizadas en respuesta a una gran variedad de agresiones celulares (Freeman *et al.*, 1999; Neuer *et al.*, 1999).

Las chaperonas son inducidas a temperaturas altas en organismos diferentes, pero en cada caso, la inducción ocurre a temperaturas de estrés para cada organismo en particular. La rapidez e intensidad de las respuestas también son variables. Una variedad amplia de mecanismos reguladores a niveles de postranscripción, se emplean para que las HSPs sean inducidas dentro de algunos minutos de exposición a temperaturas altas (Parsell & Linnik, 1994).

De acuerdo a su estructura, secuencia de aminoácidos, peso molecular y su grado de homología, las HSPs se han clasificado en cinco familias denominadas HSP100, HSP90, HSP70, HSP60 y HSPs de bajo peso molecular (Schlesinger, 1990). Pockley (2003) ha presentado una recopilación sobre familias de HSPs (Tabla 1).

Tabla 1. Familias de HSPs, su localización y función celular.

FAMILIA	LOCALIZACIÓN CELULAR	FUNCIÓN CELULAR
HSP100	Citoplasma	Replegamiento de proteínas. Termotolerancia.
HSP90	Citoplasma. Retículo endoplasmático	Previene la agregación de péptidos replegados. Correcto ensamblaje y plegamiento de proteínas nuevamente sintetizadas.
HSP70	Núcleo. Citoplasma. Mitocondria. Retículo endoplasmático	Previene la agregación de péptidos desplegados.
HSP60	Mitocondria	Correcto plegamiento.
HSP DE BAJO PESO MOLECULAR	Citoplasma. Núcleo	Impide la agregación de proteínas. Protección frente a la polimerización.

La familia HSP70, representa una de las proteínas de estrés más ampliamente estudiadas (Boorstein *et al.*, 1994) y es una de las más conservadas en los seres vivos.

2.2. HSP70: Generalidades

La familia HSP70 tiene funciones esenciales en el metabolismo de las proteínas bajo condiciones normales y de estrés, incluyendo el doblaje de proteínas, la degradación de proteínas mal dobladas y otros procesos regulatorios (Basu *et al.*, 2002; Hartl & Hayer-

Hartl, 2002). Su expresión está regulada por condiciones fisiológicas y ambientales tales como el crecimiento celular, desarrollo y condiciones patofisiológicas (Santacruz *et al.*, 1997; Morimoto, 1998).

Son expresadas a niveles extremadamente bajos en condiciones normales pero se incrementan significativamente en respuesta a fuentes de estrés tales como: fluctuaciones de temperatura, metales pesados o hipoxia (Baler *et al.*, 1993; Hartl, 1996; Yamuna *et al.*, 2000; Cheng *et al.*, 2003; Coles *et al.*, 1995). Las HSP70 también pueden ser inducidas por la luz Ultravioleta (UV), el parasitismo, el hacinamiento y la inflamación (Hartl, 1996; Sierra-River *et al.*, 1993; Gething & Sambrook, 1992; Sørensen *et al.*, 2001).

Al respecto, existe evidencia que sostiene que las HSP70 actúan en organismos infectados alertando al sistema inmune sobre la presencia de un invasor extranjero y accionando una respuesta pronta y potente (Murray & Young, 1992).

Investigaciones recientes apoyan el papel de las HSP70 como blanco primario para la vigilancia inmune no solamente contra la infección, sino también contra otras situaciones anormales, dañinas, tales como la presencia de las células cancerosas. De hecho, las HSP70 se reconocen como "señales de peligro universales" en un cuerpo, señalando al sistema inmune la presencia de tejido dañado o enfermo (Gallucci & Matzinger, 2001).

Otras proteínas, semejantes a las HSP70 y denominadas como HS cognatos 70 (HSC70) son constitutivamente expresadas bajo condiciones normales y cambian moderadamente luego de ser expuestas al estrés (Park *et al.*, 2001; Kregel, 2002, Kiang & Tsokos, 1998).

Algunos genes de HSP70 y HSC70 han sido identificados en organismos acuáticos tan diversos como colonias de corales (Tom *et al.*, 1999), ostras (Boutet *et al.*, 2003; Isabelle *et al.*, 2003), carpa (Ali *et al.*, 2003), tilapia (Molina *et al.*, 2000; Delaney & Klesius, 2004) y en camarón *Penaeus monodon* (Lo *et al.*, 2004).

2.3. HSP70: modelo de función

Las HSP70s poseen un modelo de estructura. Todos los miembros de la familia presentan una secuencia amino terminal ATPasa altamente conservada, y una porción carboxi-terminal menos conservada que se cree contiene un sitio de unión peptídica, capaz de

unirse a péptidos y proteínas dañadas por diversos tipos de agresiones, facilitando su reparación o degradación (Forreiter & Nover, 1998).

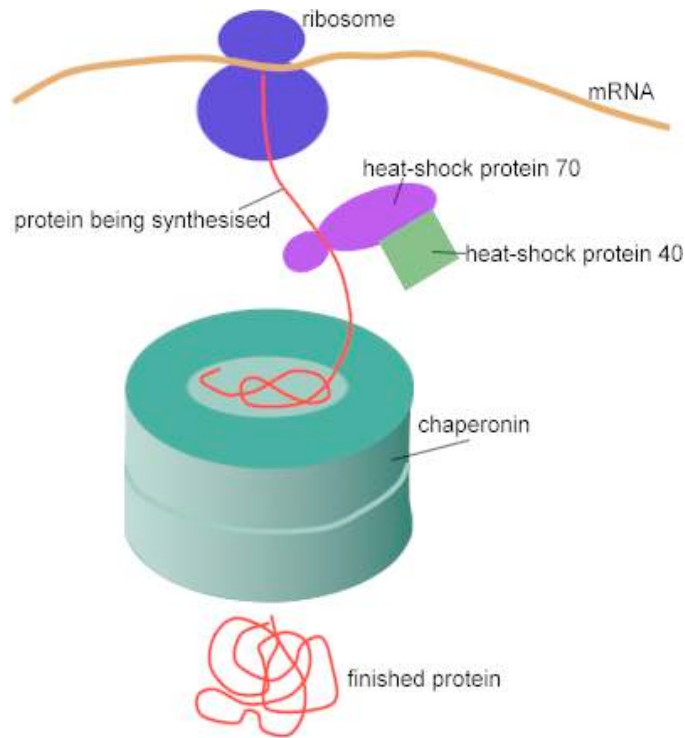


Figura 1. Diagrama sobre la función de una HSP y una chaperonina durante el plegamiento de una proteína (Hartl, F. U., 1996).

2.4. Estrés y su efecto sobre camarón marino

La influencia del estrés en la manifestación de las enfermedades de origen infeccioso sobre organismos acuáticos ha sido ampliamente documentada (Overstreet, 1978; Sindermann, 1979; Lightner & Redman, 1981; Johnson, 1983).

La presencia de fluctuaciones climáticas (variación de temperatura del agua, de salinidad o de concentración de oxígeno disuelto) en los estanques de cultivo de camarón marino, siguen siendo un aspecto crucial para la aparición de patógenos en los sistemas de producción (Peinado-Guevara & López-Meyer, 2006).

Es un hecho documentado que bajo cultivo intensivo, las condiciones ambientales pueden degradarse rápidamente causando estrés significativo al camarón y reduciendo su bienestar

(Capy *et al.*, 2000). Esto puede volverlos más susceptibles a las enfermedades (Lee & Wickins, 1992).

Alternativamente, los cambios ambientales pueden resultar en la activación de genes patogénicos de tal forma que un patógeno latente cause enfermedad (Miller *et al.*, 2005). En tal caso, las condiciones ambientales causantes de estrés pueden ser decisivas en la transformación de la infección a enfermedad (Overstreet, 1978).

Se sostiene que la inducción de una “cascada de estrés” puede permitir que infecciones latentes se manifiesten como una enfermedad mediante la inmunosupresión generalizada en el hospedero causada por las condiciones ambientales presentes (Johnson, 1983).

En efecto, varios estudios sugieren que la diferencia en la prevalencia e intensidad de las infecciones puede ser causada al menos parcialmente por diferencias en las fuentes de estrés presentes en el medio. Tal afirmación es reforzada por investigaciones sobre infecciones causadas por baculovirus que han indicado que los agentes causales de estrés ambiental pueden intensificar su prevalencia y severidad. Por ejemplo, el hacinamiento o exposición a cantidades subletales de Bifeniles policlorinados (PCBs) incrementan la prevalencia de *Baculovirus penaei* en camarones penaeidos (Couch, 1974; Couch & Courtney, 1977), mientras que condiciones ambientales deficientes, fouling e infecciones bacterianas han sido asociadas con una mayor prevalencia de *Baculovirus monodon* (MBV) en *Penaeus monodon* (Lightner & Redman, 1981).

Particularmente, existen estudios en camarón marino que han aportado importantes evidencias respecto al rol del estrés sobre el estado de salud del hospedero y su respuesta ante determinados agentes patógenos. Así por ejemplo, la manipulación y el choque térmico (33°C) incrementaron la mortalidad de camarones *Penaeus japonicus* previamente desafiados con WSSV (Chou *et al.*, 1995); la hipoxia (1 ppm por 24 h) ha comprometido la respuesta inmune de *Penaeus stylirostris* incrementando su susceptibilidad a una cepa virulenta de *Vibrio alginolyticus* durante una infección experimental (Le Moullac *et al.*, 1998). La mutilación parcial de pleópodos promovió la evolución del proceso infeccioso de WSSV en *P. japonicus*, pasando de una infección sin síntomas (pre-patente) a una infección aguda (patente) (Peng *et al.*, 1998); la reducción de la salinidad (de 24 ppt a 3-6 ppt) ocasionó que *P. vannamei* infectado crónicamente con TSV tenga menor supervivencia que camarón no infectado (Lotz *et al.*, 2005). Similares cambios de salinidad

(de 22 ppt a 14 ppt) han sido asociados con una reducción de la inmunocompetencia de camarones *Fenneropenaeus chinensis* crónicamente infectados con WSSV, conduciendo a una rápida proliferación del virus y al cambio de la infección crónica en aguda (Liu *et al.*, 2006). Finalmente, dos estudios han reportado que la manipulación, la reducción de la salinidad o la baja concentración de oxígeno, incrementaron la replicación del Virus asociado a branquias (Gill associated virus - GAV) en *P. monodon* (de la Vega *et al.*, 2004; de la Vega *et al.*, 2006), siendo GAV un patógeno de camarón muy común en Australia.

2.5. Influencia del estrés sobre la respuesta inmune en crustáceos

Varios estudios indican que las proteínas de estrés tienen la habilidad de modular la respuesta inmune celular y juegan un rol importante en la protección de los hospederos ante el ataque de patógenos (Brown *et al.*, 1993; Forsyth *et al.*, 1997; Iwama *et al.*, 1998; Moseley, 2000; Encomio & Chu, 2005).

Por ello, la respuesta inmunitaria y su relación con el estrés en organismos acuáticos está convirtiéndose en un importante campo de investigación (Coles *et al.*, 1995; Isabelle *et al.*, 2003; Piano *et al.*, 2004).

La inducción experimental de HSPs por estrés ya ha sido documentada en camarón (Downs *et al.*, 2001; Cimino *et al.*, 2003). Sin embargo, existe poca información respecto a HSP70 expresada en crustáceos bajo condiciones de estrés ambiental.

El estrés por calor, la exposición a metales pesados y otros contaminantes han sido asociadas con cambios en la expresión de HSP70 (Clegg *et al.*, 1998; Snyder *et al.*, 2001). Por ejemplo, su expresión ha sido inducida por metales pesados (Hg y Cu) en tejidos específicos del camarón de agua dulce *Macrobrachium malcomsonii* (Yamuna *et al.*, 2000); ARN mensajeros (ARNm) de HSP70 fueron detectados mediante Hibridación *in situ* (HIS) en langosta americana *Homarus americanus* durante estrés hipo e hiperosmótico (Spees *et al.*, 2002); en larvas de barnacle en condiciones hipóxicas (Cheng *et al.*, 2003), y bajo estrés térmico tanto en camarón de agua profunda *Rimicaris exoculata* (Ravaux *et al.*, 2003) como en *Macrobrachium rosenbergii* (Liu *et al.*, 2004).

Finalmente, limitada información existe sobre el efecto de contaminantes sobre la respuesta inmune de invertebrados. Por ejemplo, ciertos compuestos han sido investigados respecto a su capacidad para suprimir la respuesta inmune, tales como los metales pesados (Pipe *et al.*, 1995; Pipe *et al.*, 1999) y los pesticidas (Alvarez *et al.*, 1992; Auffret & Oubella, 1997; Baier-Anderson & Anderson, 2000).

2.6. Efecto de Hipertermia sobre camarón marino *P. vannamei*

La aplicación de hipertermia ($T \geq 32^{\circ}\text{C}$) sobre camarón marino ha mostrado su efecto protector contra infecciones virales, lo cual ha sido estudiado tanto en condiciones experimentales como en cultivo. Por ejemplo, a 32°C la mortalidad en *P. vannamei* causada por la enfermedad de la mancha blanca (WSD) se reduce considerablemente (Vidal *et al.*, 2001; Sonnenholzner *et al.*, 2002; Granja *et al.*, 2003; Rahman *et al.*, 2006), asimismo un proceso similar ha sido reportado a 32°C con la infección por Taura Syndrome virus (TSV) en *P. vannamei* bajo condiciones de laboratorio (Montgomery-Brock *et al.*, 2004).

Estudios divulgados recientemente respecto al efecto de la hipertermia ante infecciones virales en *P. vannamei* han evidenciado un profundo efecto de la hipertermia sobre la capacidad de proliferación del agente viral en el hospedero, tanto en la infección con WSSV (Granja *et al.*, 2006) como en la infección con el Infectious haematopoietic and hypodermal necrosis virus (IHHNV) (Montgomery-Brock *et al.*, 2007).

2.7. Hipertermia y expresión de HSPs en crustáceos

La búsqueda de una posible explicación al efecto protector de la hipertermia en camarón condujo a asociar tal efecto con la expresión de HSPs, tomando en consideración que el choque térmico induce su expresión y que estas proteínas han sido capaces de inducir fuertes respuestas inmunes en otros hospederos (Robert, 2003; Pockley, 2003; Stewart & Young, 2004).

Al respecto, una función adicional notablemente interesante asociada a las HSPs es la inhibición de la replicación de agentes patógenos (Santoro, 1997; Virgilio *et al.*, 1997; Conti *et al.*, 1999).

Sin embargo, existe escasa información publicada en crustáceos referente a esta característica. Así, de la Vega *et al.* (2006) han mostrado que un tratamiento de corta duración con hipertermia y el incremento asociado de la expresión de HSP70 desempeñaron un papel crucial en la reducción de la replicación de GAV en *P. monodon*, proponiendo que las HSPs juegan un rol vital en la respuesta inmune del organismo. Por su parte, Sung *et al.* (2007) han revelado que la aplicación de hipertermia asociada a la expresión de HSP70 en *Artemia franciscana* le confirió protección contra 2 especies de *Vibrios* patógenos (*V. campbellii* y *V. proteolyticus*).

Un estudio local basado en la dinámica de la epidemia de la enfermedad de la mancha blanca en función de la temperatura, carga viral y ruta de transmisión viral, mostró que camarones desafiados con WSSV vía inmersión, mantenidos a tres temperaturas: 29°C, 31°C y 33°C, presentaron mayor número de camarones infectados (positivos por PCR) y enfermos (positivos por Histología) a 33°C que a 31°C, mientras la mortalidad fue menor que a las dos temperaturas restantes (Gainza, 2005).

2.8. Cultivo de camarón marino en Ecuador

En Ecuador, la industria del camarón cultivado *P. vannamei* se inició hace 4 décadas en forma de cultivos extensivos en la provincia del Oro (McPadden, 1985). En 1987, Ecuador pasó del cuarto al tercer lugar de países productores de camarón cultivado, donde se mantuvo durante dos años, ascendiendo en 1993 al segundo puesto, ubicación que mantuvo hasta 1998 cuando fue considerado como el primer productor de camarón del hemisferio occidental y el segundo a nivel mundial, exportando 252'985.907 lbs. por un valor de 875 millones de dólares (Cámara Nacional de Acuacultura, 1999).

Sin embargo, la producción local fue enormemente afectada por la aparición del WSSV en 1999 (Calderón *et al.*, 1999), el cual fue responsable de mortalidades elevadas en numerosas camaroneras provocando pérdidas por 1.200 millones de dólares y 130.000 empleos perdidos (Cámara Nacional de Acuacultura, 2001).

A pesar de haber transcurrido más de 8 años desde la detección inicial del WSSV en Ecuador, la recuperación del sector camaronero ha sido bastante lenta. Prueba de ello es que en 2006, año record en la producción de camarón cultivado, se obtuvieron 241'501.393 lbs., la cual es una cifra inferior a la registrada en 1998 (Cámara Nacional de Acuacultura, 2006).

2.9. El Virus del Síndrome de la mancha blanca (WSSV): Generalidades

En paralelo al desarrollo del cultivo de camarón marino, las enfermedades de origen infeccioso, han afectado considerablemente la industria de camarón cultivado a nivel mundial desde 1980 (Flegel, 2006).

La enfermedad de la mancha blanca causada por WSSV, es una de las patologías más severas que han afectado a la industria del camarón cultivado a nivel mundial (Lightner, 1999).

El WSSV es un virus baciliforme, envuelto, de ADN bicatenario (Durand *et al.*, 1997), perteneciente a una nueva familia denominada Nimaviridae (Género Whispovirus) (Marks *et al.*, 2003). Su genoma es de 305 Kb (Yang *et al.*, 2001; van Hulten *et al.*, 2001). Fue detectado inicialmente en el este asiático entre 1992 y 1993 (Zhang *et al.*, 1994), afectando principalmente a Tailandia (Wongteerasupaya *et al.*, 1995), Corea, Vietnam, Malasia e India (Wang *et al.*, 1995).

2.9.1. Principales hospederos

El WSSV es altamente patógeno no solo para la mayoría de especies de camarón marino, sino también para dos especies de camarones de agua dulce, *Macrobrachium idella* y *M. lamerrae* (Sahul Hameed *et al.*, 2000), cangrejos de agua dulce (Sahul Hameed *et al.*, 2001) y alguna especie de cangrejos marinos (Chang *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 2000; Sahul Hameed *et al.*, 2003). Algunos copépodos y otros organismos colectados de piscinas con camarones infectados con WSSV han sido diagnosticados como positivos para WSSV por PCR, pero la susceptibilidad de estos animales es aún incierta (Wang *et al.*, 1998; Corbel *et al.*, 2001; Vijayan *et al.*, 2005). Del mismo modo, existen estudios que sugieren la

existencia de algún grado de resistencia innata al WSSV en crustáceos tales como *M. rosenbergii* (Sahul Hameed *et al.*, 2000), el camarón *Palaemon sp.* (Di Leonardo *et al.*, 2005), y las langostas marinas *Panulirus homarus* y *P. ornatus* (Syed Musthaq *et al.*, 2006).

2.9.2. Signos clínicos

Los animales afectados por este virus exhiben depósitos blancos de calcio en la cutícula, presentan una coloración desde rosada a café debido a la expansión de sus cromatóforos, letargia, disminución del consumo de alimento, nado lento y permanencia en las orillas de los estanques. Frecuentemente, se alcanzan mortalidades del 100% entre 3 - 10 días después de presentarse los primeros signos de enfermedad (Lightner 1996; Flegel, 1997).

2.9.3. Formas de transmisión

EL WSSV es extremadamente contagioso. Puede infectar por transmisión horizontal, sea por cohabitación con crustáceos infectados (Kanchanaphum *et al.*, 1998), canibalismo (Wu *et al.*, 2001), ingestión de tejidos infectados e inmersión en agua contaminada (Chou *et al.*, 1995; Durand *et al.*, 1997; Corbel *et al.*, 2001). Adicionalmente, existe evidencia de transmisión vertical por infección del virus en las gónadas de camarones reproductores (Lo & Kou, 1998; Hossain *et al.*, 2001).

2.9.4. Diagnóstico

Entre las técnicas más utilizadas para la detección del WSSV se encuentran: la Histopatología, Hibridación *In situ* (HIS), Inmunohistoquímica y la PCR.

2.9.4.1. Histopatología

Es una técnica que se basa en el estudio de tejidos de organismos afectados por problemas patológicos. Solo animales con signos clínicos de enfermedad son utilizados para el análisis. Los animales (vivos) se inyectan con el fijador llamado solución de Davidson, aplicado directamente en el hepatopáncreas, en la cabeza y en la cola. Después de 24 h -72 h, dependiendo del tamaño del camarón, se transfiere la muestra a etanol al 70%, en el cual puede mantenerse hasta que se efectúe el análisis. Las células infectadas con el WSSV tienen inclusiones intranucleares eosinófilas al inicio de la infección y evolucionando a basófilas en los tejidos epiteliales (estómago y subcutícula), tejido conectivo, glándula antenal, órgano linfoide y tejido hematopoyético (Lightner, 1996).

2.9.4.2. Reacción de polimerización en cadena (PCR)

La Reacción de polimerización en cadena (PCR) es una técnica de biología molecular desarrollada a mediados de 1980 (Mullis & Faloona, 1987) y popularizada en 1985. La PCR es una técnica utilizada para amplificar el número de copias de una región específica del ADN y puede aplicarse para detectar virus y/o bacterias causantes de enfermedades (Lightner & Redman, 1998).

Por su alta sensibilidad, la PCR es una de las técnicas más utilizadas para la detección del WSSV (Kimura *et al.*, 1996) y otros patógenos virales de camarón marino.

2.9.4.3. Otras técnicas de diagnóstico

La Hibridación *In situ* (HIS) es una técnica que permite la detección de ácidos nucleicos en base a la utilización de fragmentos de ácidos nucleicos monocatenarios complementarios a una región genómica de interés. Esta búsqueda se efectúa a nivel de tejidos del organismo hospedero. Los fragmentos monocatenarios pueden ser de ácido desoxirribonucleico (ADN) ó ácido ribonucleico (ARN) y se denominan sondas nucleicas. Los tejidos previamente deben ser conservados y procesados mediante un protocolo de Histología, tal como el referido por Bell & Lightner (1988).

Para la detección de WSSV se han reportado varios protocolos de HIS, utilizando diferentes regiones genómicas como objetivo para las sondas nucleicas (Durand *et al.*, 1996; Nunan & Lightner, 1997; Lu *et al.*, 2000).

Por otra parte, varios métodos serológicos han sido desarrollados para la detección de WSSV. Estos métodos se basan en el complejo antígeno – anticuerpo y consisten en utilizar un anticuerpo monoclonal o policlonal que sea capaz de reconocer epítopes (regiones superficiales de componentes estructurales de antígenos) sobre la superficie del virus, uniéndose a él y haciéndolo reconocible por la precipitación de un sustrato de color. Varios reportes describiendo el uso de Inmunohistoquímica para la detección de WSSV en camarón han sido publicados (Sahul-Hameed *et al.*, 1998; Zhan *et al.*, 1999; Poulos *et al.*, 2001), los cuales coinciden en señalar que el problema inicial asociado a la aplicación de métodos serológicos para la detección rutinaria de WSSV en laboratorios de diagnóstico fue la falta de anticuerpos para WSSV comercialmente disponibles.

2.9.5. Inmunidad en camarón marino

La sostenibilidad del cultivo del camarón, depende en gran medida de la prevención y el control de enfermedades. Desde este punto de vista el sistema inmune constituye un factor de radical importancia a tomarse en consideración. La estrategia seguida por algunos productores de camarón es la elaboración de una metodología que permita evaluar el estado sanitario de los camarones cultivados y eventualmente aplicar medidas profilácticas inmunomodulatorias que ayuden a atenuar el impacto de las patologías.

2.9.6. Estudios inmunitarios en Ecuador

El estudio de la respuesta inmune del camarón *P. vannamei* en Ecuador ha merecido un gran interés de parte del Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas (CENAIM), lo cual ha significado la elaboración y publicación de varios estudios, siendo los más importantes: el desarrollo de una herramienta para medir la concentración de anión superóxido (O_2^-) por medio de la técnica de reducción por nitro blue tetrazolium (NBT) en microplacas (Muñoz *et al.*, 2000); una revisión del estado del arte de las herramientas

inmunitarias de mayor importancia en estudios relacionados, donde se describe su fundamento, el tipo de resultado que proveen y las especies de crustáceos en las cuales han sido utilizados (Rodríguez & Le Moullac, 2000); la selección de bacterias tipo probióticas, utilizando las cepas *Bacillus* P64 y *Vibrio hepatarius* (P62), y el estudio de su efecto inmunoestimulador en *P. vannamei* (Gullian *et al.*, 2004), y la evaluación del efecto de la inclusión de probióticos (*V. alginolyticus*) y β -1,3/1,6 glucanos en larviculturas de *P. vannamei*, mediante la medición de la respuesta inmune y la supervivencia de camarones juveniles sometidos a pruebas de desafío con WSSV ó cultivados en campo (Rodríguez *et al.*, 2007).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

A fin de verificar la hipótesis planteada en este estudio se realizaron 3 bioensayos. El primer bioensayo se diseñó para verificar si la expresión de la proteína HSP70 confería protección contra la infección por WSSV en camarones pre- expuestos a hipertermia. El segundo bioensayo se realizó para determinar la asociación entre la expresión de la proteína HSP70 detectada por Western blot y la infección con WSSV. El tercer bioensayo se realizó para cuantificar por ELISA la HSP70 en animales sometidos a 3 temperaturas.

Los bioensayos se realizaron en las salas experimentales 1 y 2 del CENAIM (San Pedro de Manglaralto, Provincia de Santa Elena).

Las técnicas utilizadas en este estudio incluyeron: Histopatología, PCR, hemogramas, detección de la fenoloxidasa, cuantificación de proteínas por el método de Lowry, detección del O_2^- y detección de HSP70 mediante Western blot.

3.1. BIOENSAYO 1: EFECTO DE LA PRE-EXPOSICIÓN A LA HIPERTERMIA SOBRE LA RESPUESTA INMUNE Y LA SUPERVIVENCIA AL DESAFÍO CON WSSV.

Se utilizaron camarones juveniles de aproximadamente 8 g provenientes de la Estación Experimental Palmar (Provincia de Sta. Elena) perteneciente a CENAIM – ESPOL. Los camarones fueron sembrados temporalmente en una sala experimental y se efectuó un análisis por PCR para la detección de WSSV, a partir de un grupo (pool) de tejidos de camarones correspondientes al 10% de la población. El resultado negativo indicó que la población fue idónea para el bioensayo.

La aclimatación se realizó durante tres días a 29°C. Posteriormente, se realizó la siembra distribuyendo los animales en 10 bandejas María, donde cada bandeja contuvo 13 carameleras de 3 L, las cuales se llenaron con 2 L (volumen operacional) cada una, con agua de mar filtrada y provista de aireación constante (Figura 2).

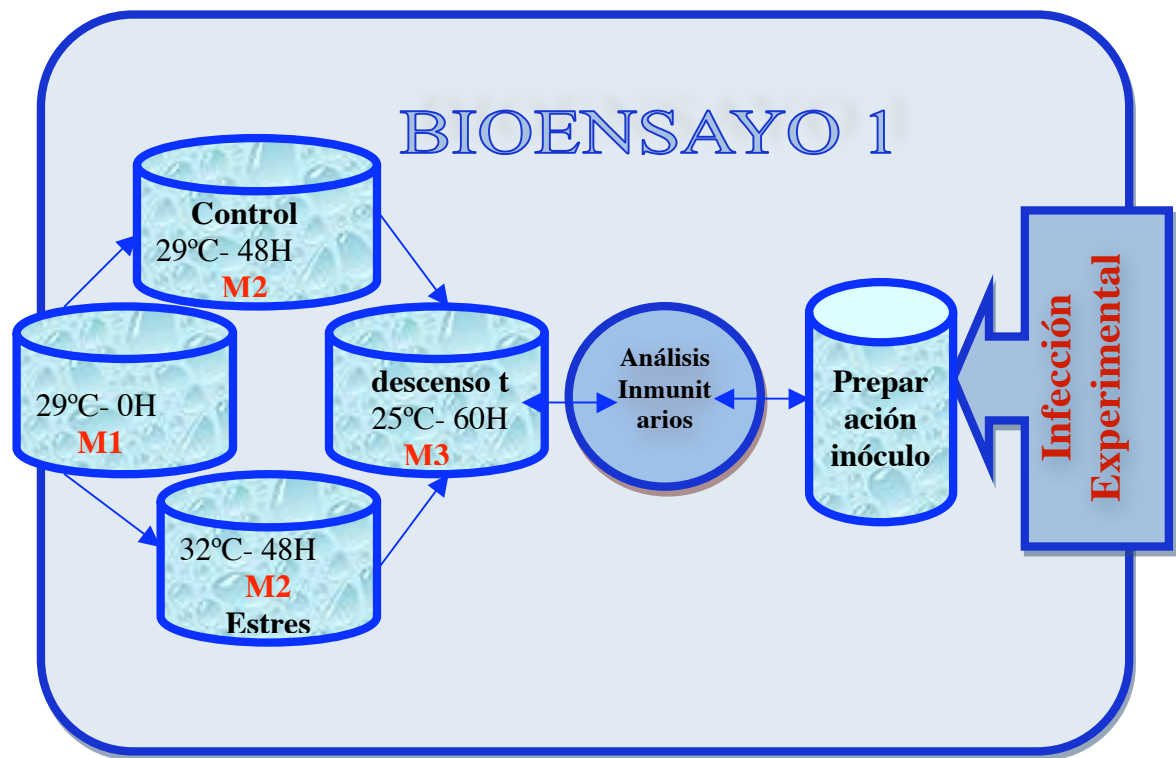


Figura 2. Sala experimental con bandejas maría de fibra de vidrio, conteniendo carameleras para la siembra y prueba de los camarones durante el bioensayo.

La temperatura se mantuvo a 29°C, la cual fue regulada por un calefón con recirculación continua. Se sembró 1 camarón por caramelera. En este experimento se consideró cada bandeja como unidad experimental.

A los camarones se les suministró alimento balanceado comercial a una tasa diaria equivalente al 10% de la biomasa presente por unidad experimental.

Se estableció: un control con 5 réplicas ($n = 5$) a 29°C durante 48 h y un tratamiento de 5 réplicas ($n = 5$), sometido a estrés térmico (32°C durante 48 h), para inducir la expresión de HSP70. Se tomaron muestras de hemolinfa de 3 camarones por caramelera sin reposición en 3 ocasiones. Los restantes camarones se sometieron a desafío con WSSV por baño (Figura 3).



M=muestras
t= temperatura

Figura 3. Esquema del bioensayo 1.

Un esquema de la sala de bioensayos donde se realizó el estudio se muestra en la figura 4.

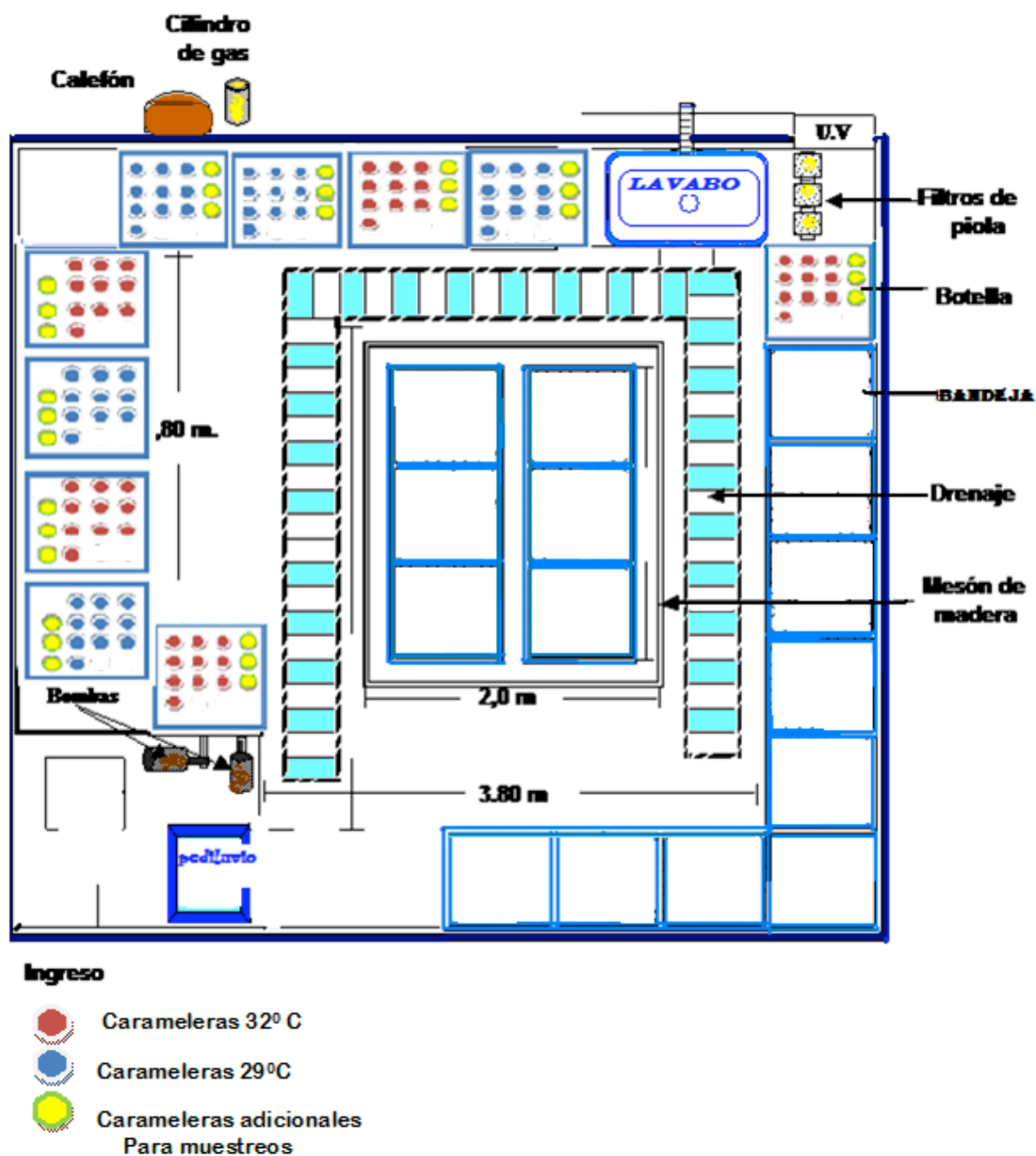


Figura 4. Esquema de la sala experimental de CENAIM y distribución de las unidades experimentales durante los bioensayos.

3.1.1. Manejo del Experimento

Muestras de hemolinfa

Las unidades experimentales se muestrearon aleatoriamente en 3 ocasiones (un camarón por bandeja por muestreo). El muestreo consistió en tomar camarones al azar y coleccionar muestras de hemolinfa por punción en la región ventral. Las carameleras muestreadas se detallan en la tabla 2.

Tabla 2. Muestreos aleatorios para el análisis de la expresión de la proteína HSP70 en bandejas* de tratamiento estrés y control.

Estrés (32°C) Carameleras				Control (29°C) Carameleras			
Réplicas	M #1	M #2	M #3	Réplicas	M #1	M #2	M #3
1	13	12	5	2	9	11	3
3	4	13	7	4	11	4	7
5	10	12	8	6	9	11	3
8	10	4	12	7	1	3	12
10	3	8	10	9	1	3	12

*13 carameleras por bandeja

M #1= 0 h

M #2= 48 h

M #3= 60 h

El primer muestreo de extracción de hemolinfa se realizó antes que los animales fuesen sometidos a hipertermia; el segundo muestreo se efectuó 48 h después del inicio de los tratamientos térmicos (29 y 32°C), y el tercero cuando se descendió la temperatura a 25°C antes del desafío con WSSV.

Las muestras de hemolinfa fueron extraídas con jeringuillas de 1 mL, cargadas con Citrato de Sodio al 10% como anticoagulante a un volumen de 50 a 100 µL (dependiendo del tamaño del animal) para luego igualar la hemolinfa con el anticoagulante volumen a

volumen (v/v). Una vez igualadas, las muestras se dividieron en 4 alícuotas diferentes, para las pruebas inmunitarias.

Para la primera alícuota, se tomó un volumen de 10 μL . A ésta, se le adicionó 10 μL de formaldehído al 3% y se guardó a temperatura ambiente. Esta suspensión celular se utilizó para análisis de hemogramas.

La segunda alícuota se utilizó en la prueba de detección del anión Superóxido O_2^- por la Técnica de Reducción del NBT (Muñoz *et al.*, 2000).

La tercer alícuota (volumen restante) fue centrifugada a razón de 800 g durante 10 min y se utilizó el plasma (sobrenadante) para Cuantificación de proteínas plasmáticas. El precipitado se resuspendió en Tampón Cacodilato de Sodio 10 mM de baja osmolaridad, a fin de lisar los hemocitos. Una vez resuspendido se sometió a una fuerte centrifugación (10000 g por 5 min). El sobrenadante se utilizó para la detección de la actividad PO.

La cuarta alícuota fue centrifugada a 800 g por 10 min, para retirar el plasma y el sedimento de los hemocitos se resuspendió con el mayor volumen posible (1.5 mL de solución Alsever, pH 4.6 a 4°C). Posteriormente, se centrifugó a 800 g por 10 min, se retiró el sobrenadante y se repitió la operación (resuspender y lavar). Finalmente, el sedimento celular se resuspendió en un tampón de lisis, a una concentración igual a 1 mL de solución por cada 10^6 células. La solución se agitó con un vortex. Se dejó a 4°C durante 20 min, luego se descongeló y finalmente se centrifugó durante 10 min a 12.000 g a 4°C. Se recuperó el sobrenadante, el cual contenía el extracto de proteínas de los hemocitos. Estas muestras se utilizaron para la detección de HSP70 mediante Western blot.

3.1.2. Preparación del Inóculo Viral

Los camarones fueron desafiados con WSSV vía inmersión. El inóculo de WSSV fue preparado siguiendo parcialmente el procedimiento reportado por Melena *et al.* (2006). Básicamente se colectó tejido infectado (branquias) con WSSV procedentes de camarones *P. vannamei* infectados experimentalmente y examinados por una prueba de PCR de dos pasos utilizando los iniciadores sugeridos por Kimura *et al.* (1996) para la detección de WSSV.

El tejido infectado fue macerado y homogenizado por 45 segundos utilizando una proporción de 1 parte de tejido infectado y 4 partes de tampón TN (0.02M de Tris-HCl; 0.4M de NaCl, pH 7.4) mediante una licuadora, en dos intervalos de 45 segundos cada uno, colocando la solución homogenizada en hielo durante 15 – 20 segundos entre los intervalos.

Se centrifugó a 4500 g por 5 min a 4°C y se recuperó el sobrenadante para clarificarlo a 20000 g por 15 min a 4°C. El sobrenadante fue recuperado y aplicado de inmediato.

3.1.3. Infección experimental con WSSV

Para proceder con la infección se realizó un recambio de agua a todas las carameleras de ambos tratamientos, llenándolas con 2 L de agua de mar filtrada.

Se aplicó la solución de WSSV previamente preparada, utilizando un factor de dilución de 1:1000, es decir, 2 mL de inóculo por caramelera vía inmersión manteniendo los animales en este medio por 6 h. Luego, se procedió a realizar un recambio de agua del 100%. La mortalidad se registró cada 6 h.

A las 60 h post-desafío, se procedió a la cosecha de todos los animales. Se escogieron al azar 3 animales por tratamiento para pruebas de histología. De los restantes se utilizaron las cabezas (cefalotórax) para ser preservadas en etanol al 95% previo a su análisis para WSSV por PCR.

3.1.4. Análisis Histológico

Camarones sobrevivientes de la prueba de desafío con WSSV por inmersión fueron fijados en Solución de Davidson y analizados individualmente para la detección de lesiones de la enfermedad de la mancha blanca en cortes histológicos utilizando la tinción de Hematoxilina-Eosina (H&E) según Bell & Lightner (1988).

Para efectuar el examen de Histopatología los camarones fueron cortados sagitalmente inyectados y sumergidos en solución de Davidson (330 mL de alcohol etílico, 220 mL de formol, 115 mL de ácido acético glacial y 335 mL de agua destilada).

Luego de la fijación, los tejidos fueron deshidratados y posteriormente impregnados en parafina. En este estado los tejidos fueron cortados utilizando un equipo microtomo Shandon, con el cual se generaron cortes que fueron colocados en portaobjetos y secados en plancha térmica.

Luego de desparafinar, hidratar y teñir, se efectuó el montaje de los cortes y se procedió a su observación al microscopio.

3.1.5. Detección de WSSV mediante PCR

3.1.5.1. Extracción del ADN

Para extraer el ADN del camarón se utilizaron branquias individuales previamente lavadas con agua destilada. Se les adicionó 400 µL de una solución de Isotiocianato de Guanidina. Las muestras fueron maceradas hasta destruir por completo el tejido. A continuación se la dejó incubar a 60°C por 30 min y luego se las dejó a temperatura ambiente por 5 minutos. Las muestras se centrifugaron a 8000 rpm por 5 min y se recuperó el sobrenadante. Se adicionó un volumen equivalente de Isopropanol frío y se centrifugaron por 15 min a 14000 rpm. Se eliminó el sobrenadante y se agregó un volumen de Etanol al 70% para luego centrifugar a 13000 rpm por 5 min. Posteriormente, se eliminó el sobrenadante, dejándose secar a 40°C por 30 min y se agregó 50 µL de agua estéril para resuspender el pellet de ADN. Finalmente, el material genético fue almacenado a -20 °C.

3.1.5.2. Amplificación del material genético de WSSV

Para la detección de WSSV se requirió el protocolo de PCR de dos pasos descrito en Melena *et al.* (2006). Los iniciadores, diseñados según Kimura *et al.* (1996), permiten amplificar 2 fragmentos, uno externo de 982 pb (982F, 5'-ATCATGGCTGCTTCACAGAC-3'; 982R, 5'-GGCTGGAGAGGACAAGACAT-3') y uno interno de 570 pb (570F, 5'-TCTTCATCAGATGCTACTGC-3'; 570R, 5'-TAACGCTATCCAGTATCACG-3'). Siendo un protocolo de dos pasos, el segundo par de iniciadores (570F/570R) utilizó el producto amplificado del primer par (982F/982R) para efectuar la segunda amplificación. En ambas PCR se trabajó con 25 µL de volumen de

reacción, conteniendo tampón de PCR 1X, 1.5 mM de MgCL₂, 0.5 µM de cada iniciador, 200 µM de cada dNTP y 1.25 U de Taq ADN polimerasa. La reacción de PCR fue realizada en 35 ciclos, a 94°C por 30 s, 55°C por 30 s y 72°C por 1 min por ciclo, seguidos de una extensión final de 72°C por 5 min.

El resultado de la amplificación se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, se tiñó con bromuro de etidio (0.5 mg mL⁻¹) y luego fue visualizado por transiluminación con luz U.V.

3.1.6. Análisis inmunitarios

3.1.6.1. Hemograma

Se determinó el número total de hemocitos (NTH) y la proporción de subpoblaciones presentes por conteo con cámara de Neubauer, utilizando un microscopio de contraste de fases. El número de hemocitos fue expresado en millones de células por mL y la fórmula hemocitaria en porcentajes de tipos hemocitarios.

3.1.6.2. Concentración de Proteínas Plasmáticas

Se cuantificó la concentración de proteínas plasmáticas totales, por medio del método de Lowry *et al.* (1951). El método de Lowry es un método colorimétrico de valoración cuantitativa de las proteínas. A la muestra se añade un reactivo (Reactivo de Folin) que forma un complejo coloreado con las proteínas, siendo la intensidad de color de la disolución resultante, proporcional a la concentración de proteínas. La concentración de proteínas fue expresada en µg/µL.

3.1.6.3. Cuantificación de la actividad Fenoloxidasa (PO)

Para realizar esta prueba se empleó el protocolo descrito por Hernández-López *et al.* (1996). Mediante espectrofotometría, se detectó la actividad PO a través de la formación de un pigmento rojo DOPA cromo, proveniente de la oxidación del substrato enzimático

L-dihidroxifenilalanina (L-DOPA). Los resultados se expresaron en unidades de D.O., medidos en lector de microplacas Multiskan Bichromatic• a 490 nm.

3.1.6.4. Cuantificación del anión superóxido (O_2^-) por reducción del NBT

Este radical de oxígeno se cuantificó por medio de la técnica de reducción del NBT, siguiendo un protocolo optimizado por Muñoz *et al.* (2000).

En una microplaca de tipo ELISA (96 pozos), se depositaron 50 μ L de hemolinfa por pozo, se llenaron por triplicado para la actividad de base (AB) y por triplicado para la Estimulación (St), dando un total de 6 pozos, es decir un volumen de 300 μ L por muestra. Luego se realizó un cultivo primario adicionando 50 μ L de Solución de Hank's (Gibco) 3X a todos los pozos, a 25°C por 45 min. Transcurrido el tiempo de incubación, las células se fijaron en el fondo de los pozos y se retiró suavemente el sobrenadante mediante una pipeta multicanal.

Se adicionaron 50 μ L de Solución de Hank's 2X a todos los pozos del primocultivo. Al triplicado para AB se le agregó 50 μ L de Solución de Hank's 3X. Al triplicado para St se le agregó 50 μ L de una Solución de Phorbol Myristate Acetate (PMA) (30 μ g/ μ L) en Hank's 3X. El PMA es utilizado como desencadenante de fagocitosis.

A todos los pozos se les adicionó una solución de NBT al 0,26% en Hank's 1X, y se dejó incubar por 2 h, lejos del alcance de la luz. Transcurrido este tiempo, se retiró el sobrenadante y se procedió a realizar 3 lavados, el primero con metanol al 100% y los dos restantes con metanol al 70%, por 2 y 3 min respectivamente. En la microplaca seca se adicionó KOH 2M, a razón de 120 μ L por pozo y se procedió a la disolución del formazán con 140 μ L de Dimetil Sulfoxide (DMSO) por pozo y KOH. Finalmente, la placa fue llevada al lector de microplacas y se leyó a $\lambda = 620$ nm.

La producción de O_2^- es expresada en tasas. La tasa se obtuvo dividiendo el valor promedio de la absorbancia de la muestra estimulada para el valor promedio de la absorbancia de la misma muestra sin estimulación.

Las soluciones de Hank's 3X, 2X y 1X se refieren a las concentraciones de Mg y Ca_2 , respectivamente (adición de Mg 5mM y Ca_2 10 mM).

3.1.6.5. Western blot

Las muestras de proteínas extraídas a partir de los hemocitos utilizando el tampón de lisis simple (Sambrook *et al.*, 1988) fueron disueltas en tampón de carga (0,5 M Tris-HCl, pH 6.8, 10% SDS, glicerol, β -mercaptoetanol y 0,05% (w/v), bromofenol blue), desnaturalizadas por 5 min a 100°C. Las proteínas fueron separadas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 12%, cargando 20 μ g de proteína en cada pozo. La migración fue a 140V a temperatura ambiente hasta que el frente de migración llegó al final del gel. Las proteínas separadas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa a 30 V por 14 h utilizando un sistema de transferencia Biorad de acuerdo al protocolo del fabricante. La membrana fue bloqueada en leche descremada al 5% (w/v) en TBS (50 mM Tris, 150 mM NaCl pH 7.5) por 2 h a temperatura ambiente. Después de enjuagarlas en TBS-Tween (0.1% tween 20 v/v), las membranas fueron incubadas con un anticuerpo policlonal anti-HSP70 a 1:10000 en leche descremada al 1% en TBS-tween. Después de enjuagar 3 veces por 5 min en TBS-tween, las membranas fueron incubadas con el anticuerpo secundario (1:20000 en leche descremada al 1% en TBS-tween) anti Ig-G de conejo conjugado con fosfatasa alcalina. Las bandas fueron detectadas por revelado con tampón NBT-BCIP. Luego de aparecer las bandas, se detuvo la reacción con la solución stop (EDTA 20 mM). La membrana fue fotografiada y se comparó con el gel de electroforesis.

3.1.7. Análisis estadístico

A partir de los datos de supervivencia obtenidos en el tratamiento y el control luego de la prueba de desafío con WSSV, se realizó el análisis no paramétrico de supervivencia de Kaplan-Meier (1958), la evaluación de la supervivencia final entre tratamientos se realizó mediante Análisis de varianza (ANOVA) (SuperANOVA®).

Cuando el ANOVA detectó diferencias significativas en los datos de las pruebas inmunitarias y de prevalencia, se procedió a realizar el test post-hoc de Tukey's HSD (Honestly Significant Differences) para determinar los tratamientos que han sido diferentes entre sí.

Los datos de presencia y/o ausencia de bandas correspondientes a HSP70 en Western blot fueron utilizados para elaborar Tablas de contingencia, las mismas que fueron sometidas a χ^2 y prueba de Fisher al 95% de confianza.

3.2. BIOENSAYO 2: ASOCIACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA HSP70, DETECTADA MEDIANTE WESTERN BLOT, E INFECCIÓN CON WSSV.

3.2.1. Diseño experimental

Se utilizaron 60 camarones juveniles Specific pathogen free (SPF por sus siglas en inglés), es decir, libres de patógenos específicos, entre ellos WSSV.

En este bioensayo se trabajó con tres tratamientos conducidos durante 48 horas en la sala experimental # 1. Se utilizaron bandejas, dos por temperatura. Cada bandeja con 10 botellas carameleras, un camarón por caramelera, siendo la unidad experimental la caramelera (n = 20) (Figura 5).

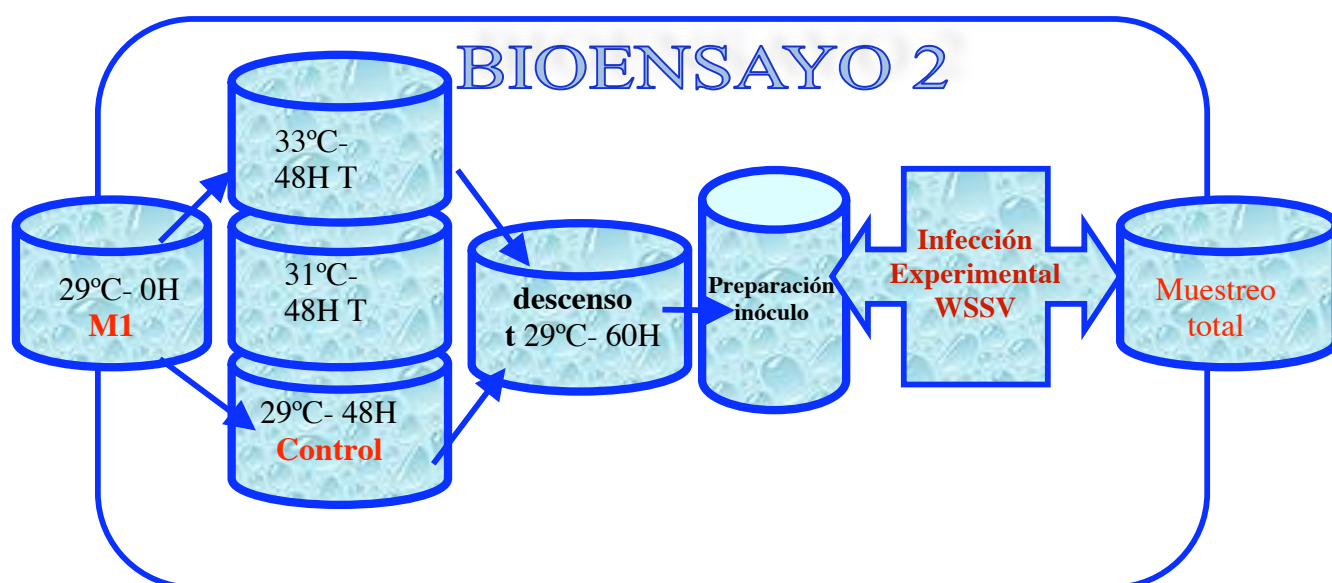


Figura 5. Esquema del Bioensayo 2.

3.2.2. Manejo del experimento

Cada caramelera (3 L) se llenó con 2 L de agua de mar filtrada, esterilizada con UV y provista de aireación. El tratamiento 1 estuvo formado de 2 bandejas María sometidas a 33°C, el tratamiento 2 dispuso de 2 bandejas María a $31 \pm 0.5^\circ\text{C}$, y el tratamiento 3 tuvo 2 bandejas María con una temperatura de 29°C. Se suministró alimento comercial a una tasa diaria equivalente a 10% de la biomasa.

3.2.3. Infección Experimental

Luego de 48 horas la temperatura fue homogenizada a 29°C en todos los tratamientos y todos los camarones fueron sometidos a una infección experimental con WSSV vía inmersión (baño) por 6 horas siguiendo el protocolo descrito anteriormente. Terminada esta etapa se procedió al recambio total del agua de cada caramelera.

Después de 24 h post-desafío se procedió a tomar las muestras de cabezas y hemolinfa para detección de WSSV mediante PCR, y HSP70 por western blot, siguiendo el procedimiento ya descrito.

Cada muestra de hemolinfa y de cabeza fue referenciada individualmente a fin de cumplir con el objetivo 1.

3.2.4. Análisis estadístico

Se realizaron tablas de contingencia, análisis de χ^2 y pruebas de Fisher utilizando el programa estadístico SSPS para determinar la asociación entre la expresión de HSP70 y la infección con WSSV (datos Western Blot versus datos PCR).

3.3. BIOENSAYO 3: EFECTO DE LA HIPERTERMIA SOBRE CONCENTRACIÓN DE HSP70 EN HEMOCITOS COMPLETOS Y EXTRACTOS CELULARES Y SOBRE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA EN HEMOCITOS.

El principal limitante para este ensayo fue el escaso número de animales SPF disponibles para el efecto (13 en total). Ocho fueron sometidos a 33°C, 3 a 31°C y 2 a 29°C. A las 48 horas se tomaron muestras de hemolinfa de 5 animales a 33°C, 3 a 31°C, y 2 a 29°C. A las 72 horas se tomaron muestras de los restantes animales sometidos a 33°C. Cada muestra se dividió en dos, 500.000 células para hacer cultivos primarios de 1 hora. Estos cultivos fueron fijados y permeabilizados por un baño con metanol y utilizados en un ELISA para HSP70. La segunda parte se utilizó para preparar un extracto de hemocitos (por resuspensión en una solución hipotónica, tampón TE (Tris 10 mM pH 7.4; EDTA 1 mM pH 8.0) y congelación-descongelación). Las proteínas celulares fueron cuantificadas por el método de Lowry.

3.3.1. Enzyme-linked ImmunoSorbent Assay (ELISA)

Luego de evaporar el metanol se bloqueó con leche descremada al 5% en Tampón de fosfato salino (PBS) durante 1 h. Luego de 3 lavados con PBS-tween 20 (0.1%) se aplicó el primer anticuerpo a una dilución 1:1000. Luego de 1 h de incubación se lavó 3 veces con PBS-tween y se aplicó el segundo anticuerpo conjugado a la fosfatasa alcalina a una dilución 1:30000 incubando por 1 h y realizando posteriormente 3 lavados con PBS-tween.

La reacción se realizó con p-NPP (p-Nitrophenyl Phosphate a 1 mg/mL) en tampón Dietanolamina al 5%, realizando la lectura en el lector de microplacas a 414 nm, luego de 2 h de incubación.

4. RESULTADOS

4.1. Bioensayo 1: Efecto de la pre-exposición a la hipertermia sobre la respuesta inmune y la supervivencia al desafío con WSSV.

En el bioensayo 1 se hicieron 3 tipos de análisis para evaluar el efecto de una exposición corta a la hipertermia:

- 1) Supervivencia e incidencia de WSSV,
- 2) Respuesta inmune,
- 3) Expresión de HSP70.

4.1.1 Supervivencia e incidencia del WSSV

Numéricamente hubo mayor mortalidad en los camarones pre-expuestos a hipertermia. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en las curvas de supervivencia ni en la supervivencia final. Al octavo día post-desafío con WSSV vía inmersión, los tratamientos a 29°C y 32°C presentaron 80% y 77% de supervivencia, respectivamente (Figura 6).

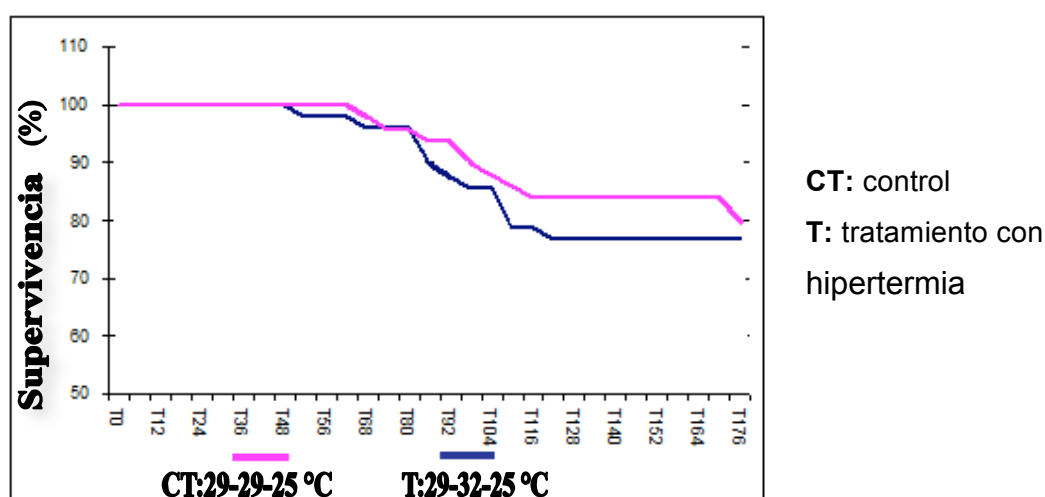


Figura 6. Supervivencia de camarones expuestos a WSSV vía inmersión (expresada en porcentaje) durante 8 días post-desafío, luego de ser tratados a dos temperaturas.

El análisis de PCR para detección de WSSV en los sobrevivientes mostró en los camarones pre-expuestos a hipertermia (32°C) y desafiados con WSSV una prevalencia (92%) significativamente mayor ($P < 0.05$) que en los camarones pre-expuestos a 29°C (66%) (Figura 7).

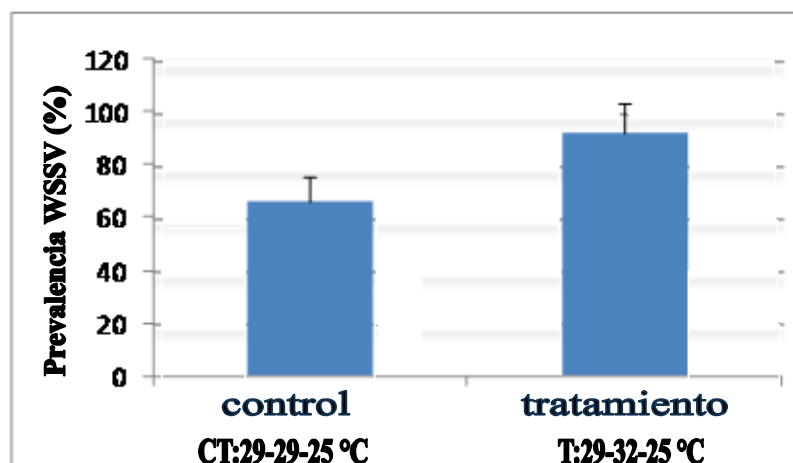


Figura 7. Prevalencia para WSSV (determinada por PCR) en los camarones sobrevivientes del desafío con WSSV, pre-expuestos a dos temperaturas 29 y 32°C antes del desafío.

4.1.2 Respuesta Inmune

Hemograma

En la tablas 3 y 4 se presentan los valores obtenidos para el conteo del Número total de hemocitos (NTH) en los camarones pre-expuestos a hipertermia y del control (29°C). En el caso del control, se observaron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los valores de NTH a las 48 h y los obtenidos a las 60 h (25°C). En el caso de los camarones pre-expuestos a hipertermia, se observó el descenso del NTH con el incremento de la temperatura a 32°C, mostrando diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los valores de NTH a las 0 h (29°C) y los obtenidos a las 60 h (25°C).

Tabla 3. Conteo de hemocitos del grupo control: Camarones sin Hipertermia.

TIEMPO (h)	NTH	H.G (%)	H.SG (%)	H.HI (%)	H.AM (%)
T (0h) 29°C	$11,2 \pm 2,55 \times 10^{6a}$	$10,72 \pm 6,28$	$43,20 \pm 23,05$	$16,27 \pm 1,86$	$29,80 \pm 19,13$
T (48h) 29°C	$13,3 \pm 3,85 \times 10^{6a}$	$14,7 \pm 5,85$	$36,74 \pm 10,86$	$19,53 \pm 4,89$	$29,03 \pm 14,37$
T (60h) 25°C	$7,00 \pm 4,14 \times 10^{6b}$	$11,23 \pm 8,43$	$35,88 \pm 16,34$	$23,85 \pm 9,40$	$29,04 \pm 6,32$

Valores con diferente letra superíndice son significativamente diferentes ($P < 0.05$)

Tabla 4. Conteo de hemocitos del tratamiento: Camarones sometidos a Hipertermia.

TIEMPO (h)	NTH	H.G (%)	H.SG (%)	H.HI (%)	H.AM (%)
T (0h) 29°C	13,6 ± 5,7×10 ^{6a}	24,01 ± 7,64	33,84 ± 10,51	30,41 ± 13,29	11,73±11,50 ^a
T (48h) 32°C	10,7 ± 6,7×10 ^{6a}	13,43 ± 8,26	35,05 ± 10,07	26,78 ± 11,54	24,75±7,96
T (60h) 25°C	8,08 ± 5,9×10 ^{6b}	20,27± 11,55	26,59 ± 3,01	24,78 ± 7,50	28,37±9,99 ^b

Valores con diferente letra superíndice son significativamente diferentes (P < 0.05)

NTH: Número total de hemocitos.

H.G: hemocitos granulosos.

H.SG: hemocitos semigranulosos.

H.HI: hemocitos hialinos.

H.AM: hemocitos amorfos.

Los valores de superóxido (O_2^-) para el tratamiento con hipertermia fueron los mayores (P < 0.05) cuando los camarones se encontraban a 32°C, mientras que a 25°C se observó una caída en la tasa de generación de superóxido (Figura 8).

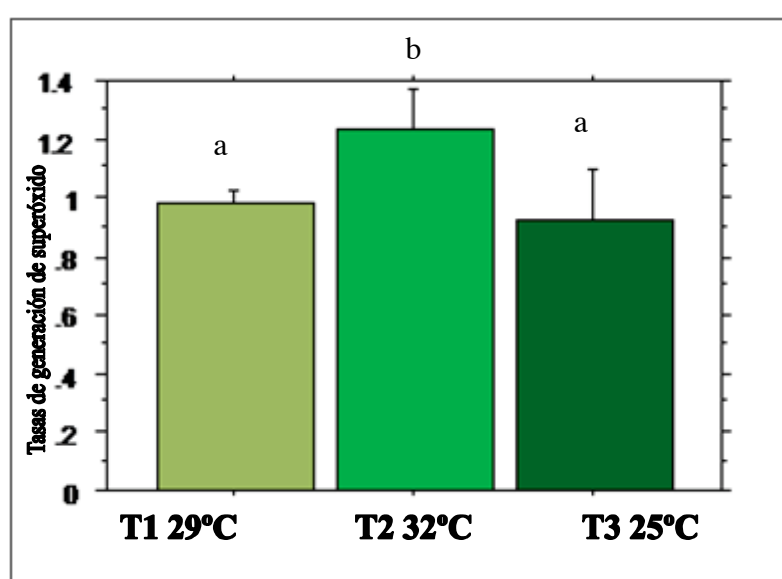


Figura 8. Tasas de generación de Superóxido (O_2^-) obtenidas a partir de muestras tomadas de los camarones pre-tratados con hipertermia.

El efecto positivo sobre los valores de generación de superóxido (O_2^-) en los camarones pre-expuestos a hipertermia se observó únicamente sobre la actividad estimulada (ST) (Figura 9).

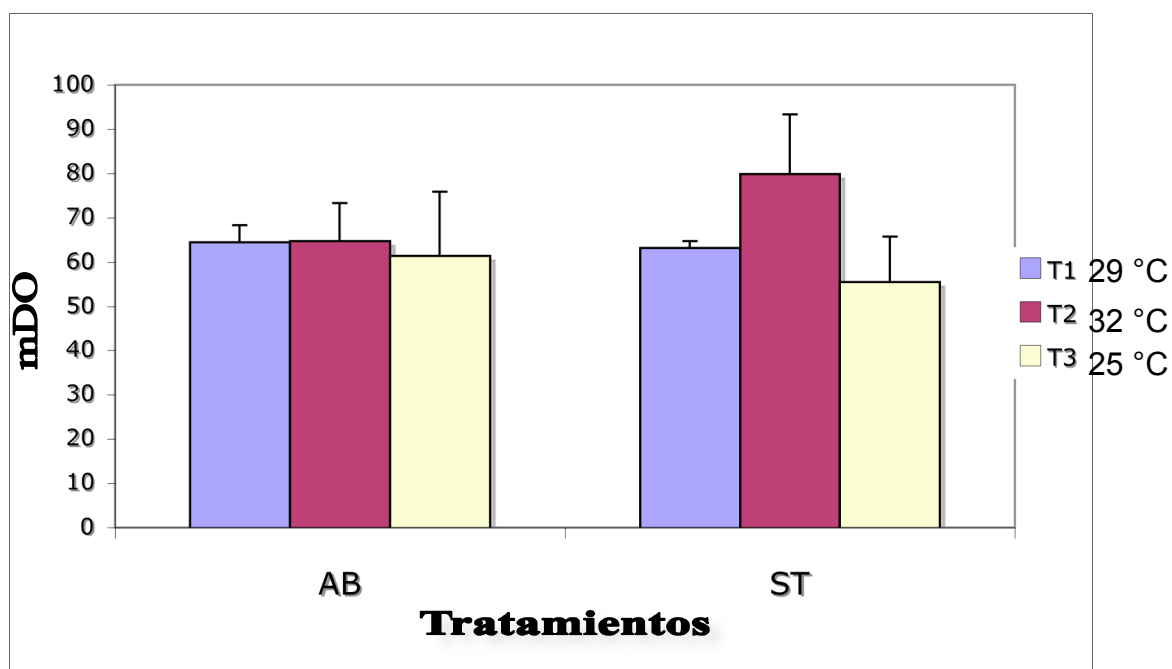


Figura 9. Valores de generación de superóxido para la actividad base (AB) y estimulada (ST) en los camarones pre-tratados con hipertermia.

En el grupo control los valores de las tasas de generación de superóxido (O_2^-) de los camarones del tiempo 1 (T1) (29°C) fueron significativamente mayores ($P < 0.05$) al compararlos con los valores del tiempo 2 (T2) (29°C) y del tiempo 3 (T3) (25°C), respectivamente (Figura 10).

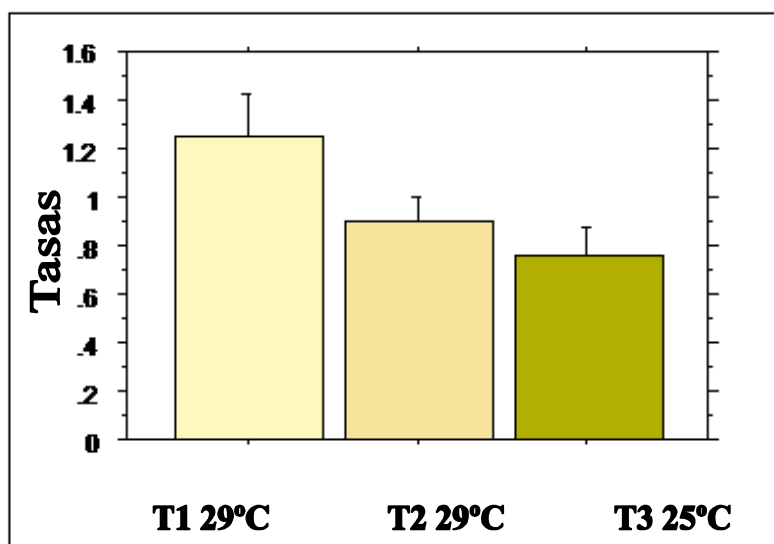


Figura 10. Tasas de generación de superóxido (O_2^-), en las muestras tomadas del control.

El efecto negativo sobre los valores de generación de superóxido (O_2^-) a 25°C se presentó también en el control (Figura 11).

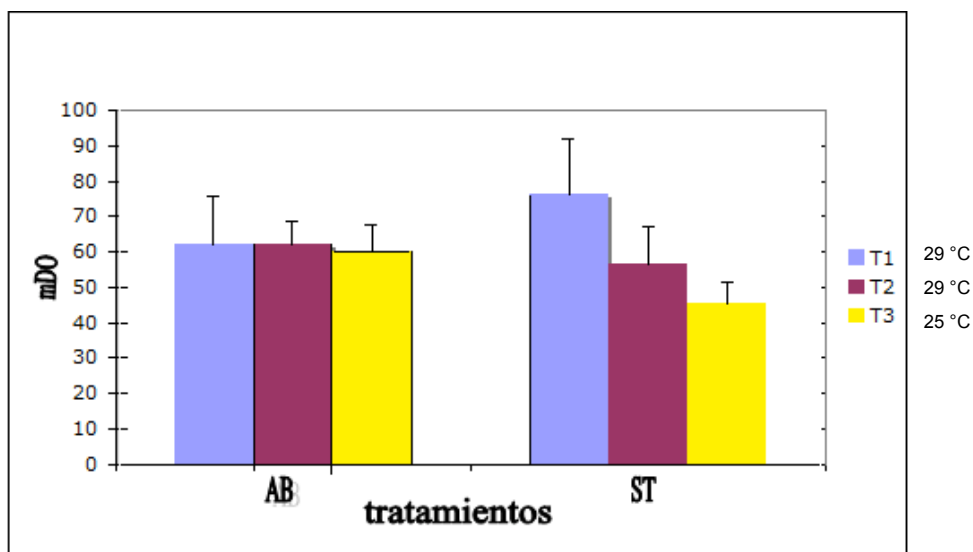


Figura 11. Valores de generación de superóxido (O_2^-) para la actividad base (AB) y estimulada (ST) en los camarones del control.

Para el análisis de PO el número de muestras por tratamiento fue insuficiente para sacar conclusiones.

Concentración de proteínas plasmáticas

Por otra parte, los camarones pre-tratados con hipertermia mostraron una concentración inferior de proteínas plasmáticas cuando se incrementó la temperatura a 32°C, la cual fue significativamente diferente ($P < 0.05$) al compararse con los valores del tiempo T1 (29°C) y T3 (25°C), respectivamente (Figura 12).

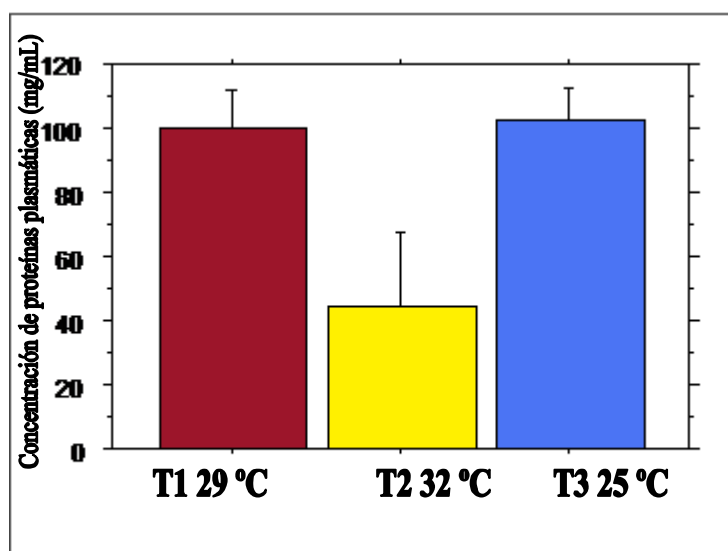


Figura 12. Concentración de proteínas plasmáticas en los camarones pre-expuestos a hipertermia.

Por el contrario, no se encontraron diferencias significativas ($P > 0.05$) entre los valores de concentración de proteínas plasmáticas obtenidas en los tres muestreos de los camarones del control (Figura 13).

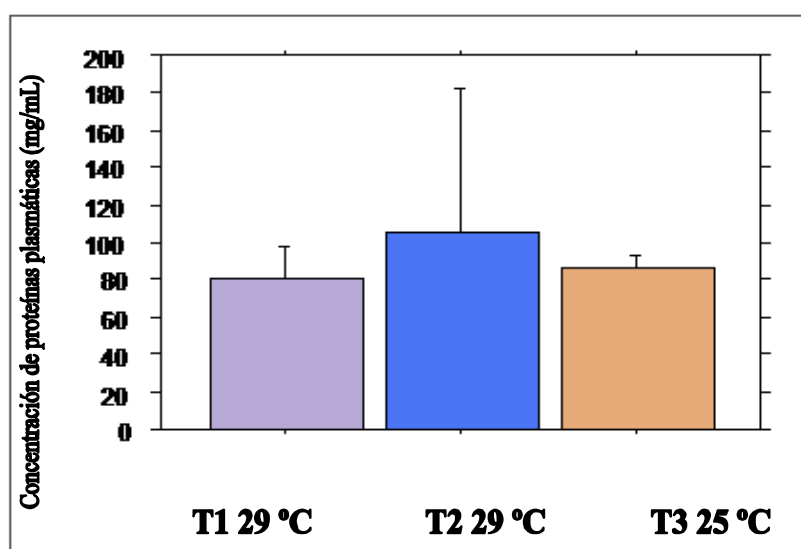


Figura 13. Concentración de proteínas plasmáticas en los camarones del control.

A pesar de presentar una alta variabilidad, la concentración de proteínas presentes en hemocitos fue aparentemente mayor en los camarones pre-tratados con hipertermia que en los del control (Figura 14).

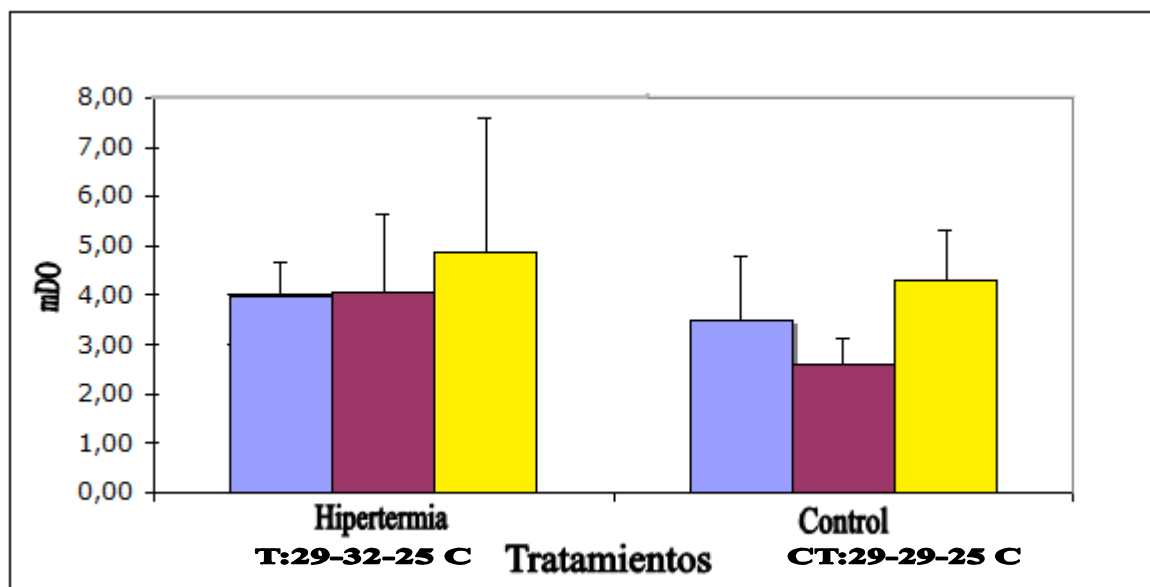


Figura 14. Concentración de proteínas de hemocitos obtenidas de los camarones pre-tratados con hipertermia y del control.

4.1.3 Expresión de HSP70

Las bandas correspondientes a HSP70 fueron observadas en membranas de nitrocelulosa por el procedimiento de Western blot (WB) (Figuras 15 y 16).



Figura 15. Detección de la proteína HSP70 en *P. vannamei* mediante Western blot en camarones sometidos a hipertermia.

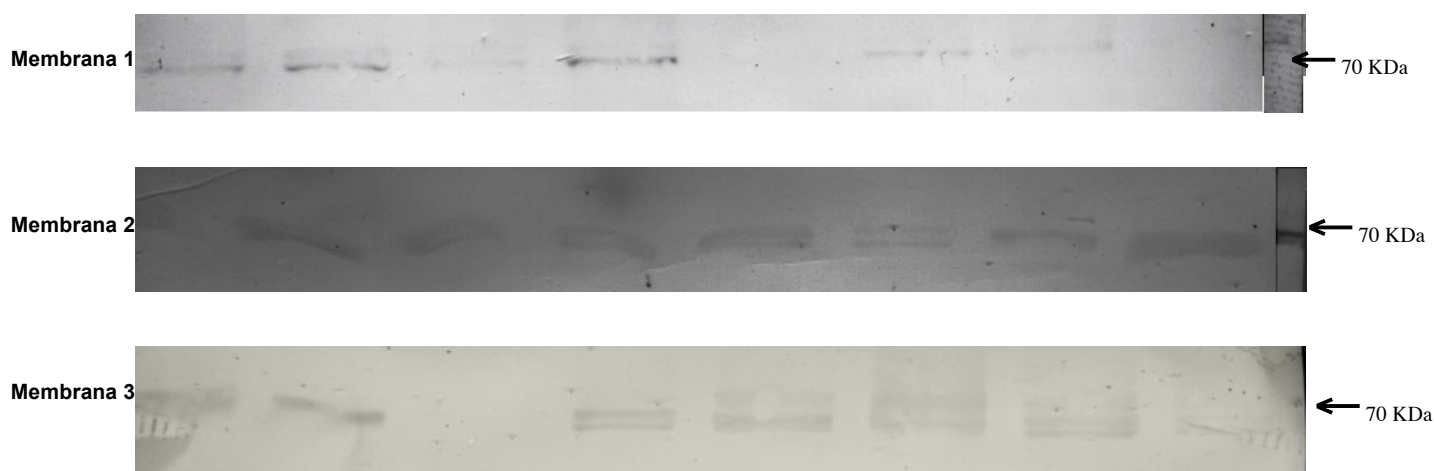


Figura 16. Detección de HSP70 en *P. vannamei* mediante Western blot en camarones expuestos a 33°C. Observar banda doble en algunas muestras.

El western blot mostró bandas simples o dobles en la talla 70 KDa. A pesar de que la frecuencia de bandas fue mayor en los camarones expuestos a hipertermia no se encontró diferencias significativas ($P > 0.05$) (Tabla 5).

Tabla 5. Número de bandas correspondientes a la presencia de HSP70 en camarones sometidos a hipertermia y desafiados con WSSV posteriormente. Las muestras de hemolinfa fueron tomadas en diferentes periodos de tiempo.

	Número de BANDAS	t 0h (No. de camarones)	t 48h (No. de camarones)	t 60h (No. de camarones)
TRATAMIENTO 29 – 32 – 25 °C.	1		1	1
	2	5	2	2
CONTROL 29-29-32 °C.	1			
	2	4		2

4.2. Bioensayo 2: Asociación de la expresión de la proteína HSP70, detectada mediante western blot, e infección con WSSV.

En el segundo bioensayo se realizó una tabla de contingencia para determinar una posible asociación entre la expresión de la proteína HSP70 y la prevalencia de WSSV. Los resultados obtenidos indicaron que a 33°C se detectó el mayor número de camarones que expresaron HSP70, encontrándose que a esta temperatura la expresión de HSP70 estuvo asociada de forma directa y significativa (Fisher Test, $P < 0.05$) con los casos positivos para WSSV (Tabla 6).

Tabla 6. Tabla de contingencia entre expresión de HSP70 y casos positivos para WSSV en grupos de camarones sometidos a tres temperaturas; 29, 31 y 33°C.

hsp70 * wssv * temp Crosstabulation						
temp				wssv		Total
				.00	1.00	
29,00	hsp70	,00	Count	0	5	5
			Expected Count	,8	4,2	5,0
			Adjusted Residual	-1,1	1,1	
		1,00	Count	3	11	14
			Expected Count	2,2	11,8	14,0
			Adjusted Residual	1,1	-1,1	
	Total		Count	3	16	19
			Expected Count	3,0	16,0	19,0
31,00	hsp70	,00	Count	4	6	10
			Expected Count	3,5	6,5	10,0
			Adjusted Residual	,5	-,5	
		1,00	Count	2	5	7
			Expected Count	2,5	4,5	7,0
			Adjusted Residual	-,5	,5	
	Total		Count	6	11	17
			Expected Count	6,0	11,0	17,0
33,00	hsp70	,00	Count	4	1	5
			Expected Count	1,5	3,5	5,0
			Adjusted Residual	2,8	-2,8	
		1,00	Count	2	13	15
			Expected Count	4,5	10,5	15,0
			Adjusted Residual	-2,8	2,8	
	Total		Count	6	14	20
			Expected Count	6,0	14,0	20,0

4.3. Bioensayo 3: Efecto de la hipertermia sobre concentración de HSP70 en hemocitos completos y extractos celulares y sobre la concentración de proteína en hemocitos.

Finalmente, los análisis de ELISA para HSP70 realizados sobre hemocitos en cultivo primario de camarones sometidos a tres temperaturas (31, 33 y 29°C), mostraron una mayor concentración de proteína HSP70 a 33°C (Figura 17), en tanto la concentración de proteínas celulares fue mayor a 31°C que a 33°C (Figura 18).

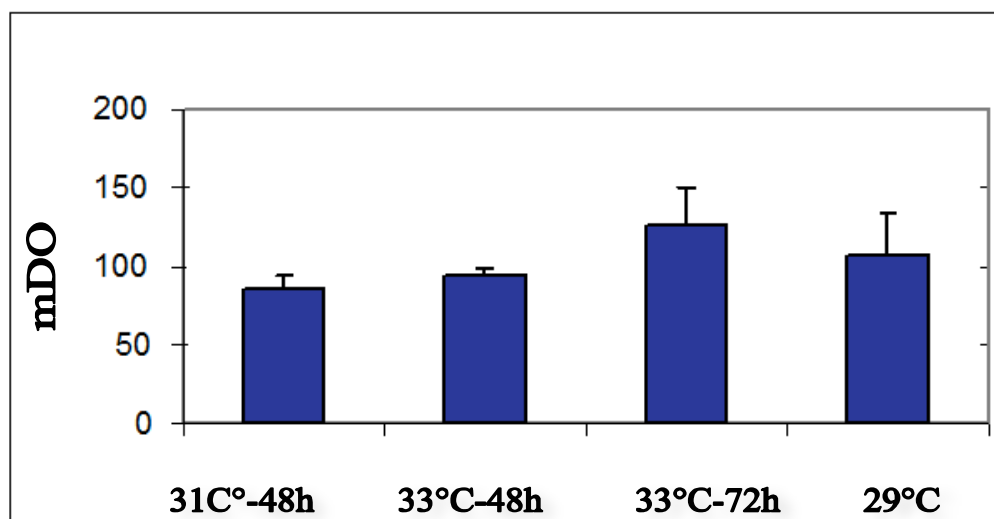


Figura 17. ELISA anti HSP70 sobre cultivos primarios de hemocitos de camarones sometidos a tres temperaturas.

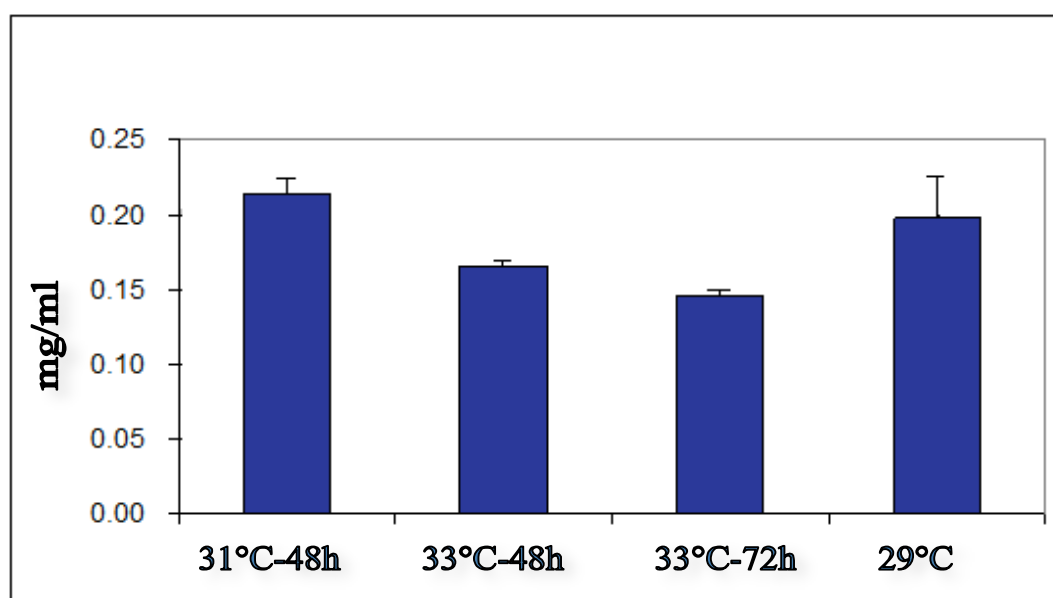


Figura 18. Concentración de proteínas hemocitarias de camarones sometidos a tres temperaturas.

5. DISCUSIÓN

El efecto de la temperatura sobre la inmunidad de los invertebrados acuáticos ha sido estudiado en forma limitada (Fisher *et al.*, 1987; Le Moullac & Haffner, 2000; Cheng & Chen, 2000). Sin embargo, ciertas evidencias sugieren su efecto sobre la respuesta inmune del hospedero (Jiravanichpaisal *et al.*, 2004). Complementariamente, se conoce que la temperatura del agua es uno de los más importantes factores ambientales porque puede afectar el metabolismo del animal, el consumo de oxígeno, la tasa de crecimiento y la tasa de supervivencia (Guan *et al.*, 2003).

Varios estudios han mostrado que la aplicación de hipotermia (32 – 33°C) en *P. vannamei*, puede reducir la mortalidad causada por el WSSV (Vidal *et al.*, 2001; Sonnenholzner *et al.*, 2002; Granja *et al.*, 2003; Rahman *et al.*, 2006; Rahman *et al.*, 2007). Esencialmente, la aplicación preventiva de la hipotermia antes de que los signos clínicos de la infección por WSSV sean observados, es capaz de reducir la replicación viral y puede impedir la manifestación de la mortalidad en *P. vannamei* (Granja *et al.*, 2006; Rahman *et al.*, 2007), en *Marsupenaeus japonicus* (Guan *et al.*, 2003) y en los cangrejos de río *Procambarus clarkii* (Du *et al.*, 2006) y *Pacifastacus leniusculus* (Jiravanichpaisal *et al.*, 2004).

Por otra parte, la producción de HSPs es una respuesta celular común al estrés. Estas proteínas son conocidas por proteger al hospedero contra el estrés térmico ayudando a replegar correctamente las proteínas desnaturalizadas e impidiendo la agregación de proteínas (von Janowsky *et al.*, 2006).

La hipótesis de trabajo de esta investigación propuso que la menor letalidad al WSSV observada en camarón *P. vannamei* expuesto a hipotermia era consecuencia de una mayor resistencia del hospedero al patógeno, relacionada con la expresión de la proteína de estrés térmico HSP70.

Nuestra investigación constó de 3 bioensayos. Los dos primeros fueron tipo prueba de desafío con WSSV en *P. vannamei*. En el primer bioensayo se observó, que los camarones pre-expuestos a hipotermia mostraron descensos del NTH con respecto a los valores obtenidos a las 0 h (29°C), lo cual sugiere que la hipotermia afecta negativamente a la concentración de hemocitos. Por otro lado, los camarones expuestos a hipotermia (T2) mostraron los más altos valores de superóxido (O_2^-) ($P < 0.05$) (Figura 8) y una concentración inferior de proteínas plasmáticas (Figura 12). Tales resultados indican que la

hipertermia tiene un efecto positivo sobre la generación de anión superóxido y que produce un descenso de la concentración de proteínas plasmáticas en el hospedero.

El anión superóxido se genera durante el *respiratory burst*, un sistema microbicida asociado a la fagocitosis celular del hospedero (Muñoz *et al.*, 2000). El incremento en la tasa de generación de superóxido durante la hipertermia indicaría la existencia de un proceso inflamatorio en el hospedero, en respuesta a una anomalía ambiental (Le Moullac & Haffner, 2000). No se puede descartar sin embargo, que este incremento se encuentre asociado a mayor metabolismo por efecto de la hipertermia. En cuanto al descenso de la concentración de proteínas plasmáticas en los camarones sometidos a hipertermia, previamente se ha reportado una relación entre la concentración de proteínas plasmáticas y la temperatura del agua. Al respecto, en el caso del cangrejo *Carcinus maenas* se han observado bajas concentraciones de proteínas plasmáticas cuando la temperatura alcanzó su valor más alto o más bajo (Chisholm & Smith, 1994). Se debe recordar que el estrés térmico afecta la síntesis de proteína.

Complementariamente, en el segundo bioensayo se estudió el efecto de la temperatura sobre la prevalencia de WSSV, encontrando que a 33°C se detectó el mayor número de camarones que expresaron proteínas HSP70. Tal expresión estuvo asociada de forma directa con los casos positivos para WSSV (Tabla 6), es decir, los camarones sometidos previamente a hipertermia serían más susceptibles a la infección con WSSV (mayor prevalencia), mientras que la virulencia, es decir, la capacidad del virus para hacer daño o matar, es muy baja.

En el caso específico de la infección con WSSV, se sostiene que la hipertermia podría afectar algunos pasos en la replicación viral, incluyendo la absorción, la síntesis de macromoléculas (proteínas o ácidos nucleicos) o la actividad enzimática (Guan *et al.*, 2003), conjuntamente con un incremento de las células afectadas por apoptosis o muerte celular programada (Granja *et al.*, 2003). Particularmente, las células del tejido epitelial subcuticular de *P. vannamei* sometidas a hipertermia han mostrado una reducción de la expresión de los genes de WSSV (Reyes *et al.*, 2007).

La idea que la aplicación de la hipertermia ($T \geq 32^{\circ}\text{C}$) sobre camarón marino tenga un efecto protector contra infecciones virales, provino tanto de lo observado con WSD como de la evidencia reportada con la infección por TSV (Montgomery-Brock *et al.*, 2004) e IHHNV (Montgomery-Brock *et al.*, 2007) en *P. vannamei* bajo condiciones de laboratorio.

Sin embargo, los resultados encontrados en nuestra investigación respecto a la posible pérdida de virulencia del WSSV durante la hipertermia indican que la evidente robustez de este fenómeno podría deberse a condiciones fisiológicas adversas para procesos virales en el hospedero, más que a una intervención crucial de su sistema inmune, excepto en el caso de la generación de O_2^- .

En el tercer bioensayo se realizó el estudio del efecto de la hipertermia sobre la concentración de proteínas hemocitarias y la síntesis de HSP70, determinándose mediante análisis de ELISA para HSP70 en camarones sometidos a tres temperaturas (31, 33 y 29°C), una mayor concentración de proteína HSP70 a 33°C, en tanto la concentración de proteínas celulares fue mayor a 31°C que a 33°C. Los resultados de la prueba *in vitro* mostraron que a 31°C no sólo menos camarones expresan HSP70, sino que el nivel de expresión también fue el más bajo (Figura 17) en tanto la concentración de proteínas celulares fue mayor que a 33°C (Figura 18). En base a estas observaciones se podría afirmar que 31°C es una temperatura de menor estrés para *P. vannamei*, caracterizada por una mayor eficiencia en la síntesis de proteínas.

Finalmente, nuestro estudio al mostrar que bajo condiciones de hipertermia, la expresión de HSP70 está directamente relacionada con la prevalencia de WSSV en *P. vannamei*, reforzaría la utilidad de esta proteína como marcador de estrés en camarón.

6. CONCLUSIONES

- A temperaturas mayores o iguales a 32°C, se observa un incremento en la prevalencia del WSSV en *P. vannamei*.
- La expresión de HSP70 es alta a 32°C, observándose una asociación directa y significativa con la susceptibilidad a la infección con WSSV.
- La hipertermia tiene un efecto negativo sobre la concentración de los hemocitos circulantes del camarón.
- La hipertermia tiene un efecto positivo sobre la generación de O_2^- .
- La hipertermia produce un descenso de la concentración de proteínas plasmáticas y hemocitarias del camarón, indicando que la virulencia del WSSV sería afectada por condiciones fisiológicas adversas para procesos de biosíntesis viral.
- La HSP70 representaría un marcador de estrés en camarón debido a que su expresión está directamente relacionada con la prevalencia de WSSV en *P. vannamei*.

7. RECOMENDACIONES

- Desarrollar un protocolo para la cuantificación de la expresión de HSP70 mediante la técnica de Real-time PCR, lo cual permitiría precisar la diferencia en nivel de expresión entre camarones expuestos a hipertermia y a temperaturas inferiores.
- Utilizar la proteína HSP70 como marcador de estrés en camarón marino, debido a que su expresión está directamente relacionada con la prevalencia de WSSV en *P. vannamei*.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Ali, K. S., Dorgai, L., Abraham, M. & Hermes, E. 2003. Tissue and stress or specific differential expresión of two hsc70 genes in carp. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 307: 503-509.
- Alvarez, M. R., Friedl, F. E., Hudson, C. M. & O'Neill, R. L. 1992. Effects of hypoxic and hyperoxic conditions on haemocyte activity and abiotic particle retention by the Eastern Oyster, *Crassostrea virginica*. *Journal of Shellfish Research* 11: 383-386.
- Auffret, M. & Oubella, R. 1997. Haemocyte aggregation in the oyster *Crassostrea gigas*: in vitro measurement and experimental modulation by xenobiotics. *Comparative and Biochemical Physiology* 118A: 705-712.
- Baier-Anderson, C. & Anderson, R. S. 2000. The effects of chlorothalonil on oyster haemocyte activation: phagocytosis, reduced pyridine nucleotides and reactive oxygen species production. *Environmental Research* 83: 72-78.
- Baler, R., Dahl, G. & Voellmy, R. 1993. Activation of human heat shock genes is accompanied by oligomerization, modification and rapid translocation of heat shock transcription factor HSF1. *Molecular Cell Biology* 13: 2486-2496.
- Basu, N., Todgham, A. E., Ackerman, P. A., Bibeau, M. R., Nakano, K., Schulte, P. M. & Iwama, G. K. 2002. Heat shock protein genes and their functional significance in fish. *Gene* 95: 173-183.
- Bell, T. A. & Lightner, D. V. 1988. A handbook of normal shrimp histology. Special publication No. 1. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, 114 pp.
- Boorstein, W. R., Ziegelhoffer, T. & Craig, E. A. 1994. Molecular evolution of the HSP70 multigene family. *Journal of Molecular Evolution* 38: 1-17.

- Boutet, I., Tanguy, A. & Moraga, D. 2003. Organization and nucleotide sequence of the European flat oyster *Ostrea edulis* heat shock cognate 70 (hsc70) and heat shock protein (hsp70) genes. *Aquatic Toxicology* 65: 221-225.
- Brown, C. R., Martin, R. L., Hansen, W. J., Beckman, R. P. & Welch, W. J. 1993. The constitutive and stress inducible forms of hsp70 exhibit functional similarities and interact with one another in an ATP- dependent fashion. *Journal of Cell Biology* 120: 1101-1112.
- Cámara Nacional de Acuacultura, 1999. Acuacultura del Ecuador. *Revista de la Cámara Nacional de Acuacultura* 30: 34-37.
- Cámara Nacional de Acuacultura, 2001. Acuacultura del Ecuador. *Revista de la Cámara Nacional de Acuacultura* 45: 60-63.
- Cámara Nacional de Acuacultura, 2006. 2006 año récord en volumen de exportación camaronera. *Aquacultura* 59: 6-9.
- Capy, P., Gasperi, G., Biemont, C. & Bazin, C. 2000. Stress and transposable elements: co-evolution or useful parasites?. *Heredity* 85: 101-106.
- Cimino, E. J., Owens, L. & Anderson, T. A. 2003. A newly developed ELISA showing the effect of environmental stress on levels of hsp86 in *Cherax quadricarinatus* and *Penaeus monodon*. *Comparative and Biochemical Physiology* 132: 591-598.
- Clegg, J. S., Cher, G. N., Rifkin, E. & Friedman, C. S. 1998. Induced thermotolerance and the heat shock protein-70 family in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 7: 21-30.
- Coles, J. A., Farley, S. R. & Pipe, R. K. 1995. Alteration of the immune response of the common marine mussel *Mytilus edulis* resulting from exposure to cadmium. *Diseases of Aquatic Organisms* 22: 59-65.

- Conti, C., de Marco, A., Mastromarino, P., Tomao, P. & Santero, M. G. 1999. Antiviral effect of hyperthermic treatment in rhinovirus infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 43: 822-829.
- Corbel, V., Zuprizal, Shi, Z., Huang, C., Sumartono, Arcier, J. M. & Bonami, J. R. 2001. Experimental infection of European crustaceans with white spot syndrome virus (WSSV). *Journal of Fish Diseases* 24: 377-382.
- Couch, J. A. 1974. Free and occluded virus, similar to Baculovirus, in hepatopancreas of pink shrimp. *Nature* 247: 229-231.
- Couch, J. A. & Courtney, L. 1977. Interaction of chemical pollutants and virus in a crustacean: a novel bioassay system. *Annual New York Academy Sciences* **298**: 497-504.
- Chang, P. S., Chen, H. C. & Wang, Y. C. 1998. Detection of white spot syndrome associated baculovirus in experimentally infected wild shrimp, crab and lobsters by *in situ* hybridization. *Aquaculture* 164: 233-242.
- Chen, L. L., Lo, C. F., Chiu, Y. L. Chang, C. F. & Kou, G. H. 2000. Natural and experimental infection of white spot syndrome virus WSSV in benthic larvae of mud crab *Scylla serrata*. *Diseases of Aquatic Organisms* 40: 157-161.
- Cheng, W. & Chen, J. C. 2000. Effects of pH, temperature and salinity on immune parameters of the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Fish and Shellfish Immunology* 10: 387-391.
- Cheng, S. H., So, C. H., Chan, P. K., Cheng, C. W. & Wu, R. S. 2003. Cloning of the HSP70 gene in barnacle larvae and its expression under hypoxic conditions. *Marine Pollution Bulletin* 46: 665-671.

- Chisholm, J. R. & Smith, V. 1994. Variation of antibacterial activity in the haemocytes of the shore crab, *Carcinus maenas*, with temperature. *Journal of Marine Biology Association of United Kingdom* 74: 979-982.
- Chou, H. Y., Huang, C. Y., Wang, C. H., Chiang, H. C. & Lo, C. F. 1995. Pathogenicity of a baculovirus infection causing white spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Taiwan. *Diseases of Aquatic Organisms* 23: 165-173.
- Delaney, M. & Klesius, Ph. 2004. Hypoxic conditions induce Hsp70 production in blood, brain and head kidney of juvenile Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.). *Aquaculture* 236: 633-644.
- Downs, C. A., Fauth, J. E. & Woodley, C. M. 2001. Assessing the health of grass shrimp (*Palaemonetes pugio*) exposed to natural and anthropogenic stressors: a molecular biomarker system. *Marine Biotechnology* 3: 380-397.
- Du, H. H., Li, W. F., Xu, Z. R. & Kil, Z. S. 2006. Effect of hyperthermia on the replication of white spot syndrome virus (WSSV) in *Procambarus clarkii*. *Diseases of Aquatic Organisms* 71: 175-178.
- Durand, S., Lightner, D. V., Nunan, L. M., Redman, R. M., Mari, J. & Bonami, J. R. 1996. Application of gene probes as diagnostic tools for white spot baculovirus (WSBV) of penaeid shrimp. *Diseases of Aquatic Organisms* 27: 59-66.
- Durand, S., Lightner, D. V., Redman, R. M. & Bonami, J. R. 1997. Ultrastructure and morphogenesis of white spot syndrome baculovirus (WSBV). *Diseases of Aquatic Organisms* 29: 205-211.
- Encomio, V. G. & Chu, F. L. 2005. Seasonal variation of heat shock protein (hsp70) in eastern oysters (*Crassostrea virginica*) infected with *Perkinsus marinus* (Dermo). *Journal of Shellfish Research* 24: 167-175.

- Echeverría, F. 1998. Desarrollo de un ensayo de cuantificación de la actividad Fenoloxidasa (PO) como una herramienta de inmunoevaluación del camarón *Penaeus vannamei*. Proyecto de redacción técnica. Universidad de Guayaquil. Facultad de Ciencias Naturales. Escuela de Biología.
- Fisher, W. S., Auffret, M. & Balouet, G. 1987. Response of european flat oyster (*Ostrea edulis*) hemocytes to acute salinity and temperature changes. *Aquaculture* 67: 179-190.
- Flegel, T. W. 1997. Special topic review: Major viral diseases of the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) in Thailand. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 13: 433-442.
- Flegel, T. W. 2006. Detection of major penaeid shrimp virus in Asia, a historical perspective with emphasis on Thailand. *Aquaculture* 258: 1-33.
- Forreiter, C. & Nover, L. 1998. Heat induced stress proteins and the concept of molecular chaperones. *Journal of Bioscience* 23: 287-302.
- Forsyth, R. B., Candido, E. P. M., Babich, S. L. & Iwama, G. K. 1997. Stress protein expression in coho salmon with bacterial kidney disease. *Journal Aquatic Animal Health* 9: 18-25.
- Freeman, M. L., Borreli, M. J., Meredith, M. J. & Lepock, J. R. 1999. On the path to the heat shock response: destabilization and formation of partially folded protein intermediates, a consequence of protein thiol modification. *Free Radical Biology & Medicine* 26: 737-745.
- Gainza, O. 2005. Dinámica de la epidemia de la Enfermedad de la Mancha Blanca (WSD) en función de la temperatura, carga viral y ruta de transmisión viral. Tesis de grado. Magister en Ciencias. Escuela Superior Politécnica del Litoral. Guayaquil - Ecuador. 180 pp.

- Gallucci, S. & Matzinger, P. 2001. Danger signals: SOS to the immune system. *Current Opinion in Immunology* 13: 114-119.
- Gething, M. & Sambrook, J. 1992. Protein holding in the cell. *Nature* 355: 33-45.
- Granja, C., Aranguren, L. Vidal, O., Aragón, L. & Salazar, M. 2003. Does hyperthermia increase apoptosis in white spot syndrome virus (WSSV)-infected *Litopenaeus vannamei*?. *Diseases of Aquatic Organisms* 54: 73-78.
- Granja, C., Vidal, O., Parra, G. & Salazar, M. 2006. Hyperthermia reduces viral load of white spot syndrome virus in *Penaeus vannamei*. *Diseases of Aquatic Organisms* 68: 175-180.
- Guan, Y., Yu, Z. & Li, C. 2003. The effects of temperature on white spot syndrome infections in *Marsupenaeus japonicus*. *Journal of Invertebrate Pathology* 83: 257-260.
- Gullian, M., Thompson, F. & Rodríguez, J. 2004. Selection of probiotic bacteria and study of their immunostimulatory effect in *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* 233: 1-14.
- Gupta, R. S. & Golding, G. B. 1993. Evolution of HSP70 gene and its implications regarding relationships between archaeobacteria, eubacteria and eukaryotes. *Journal of Molecular Evolution* 37: 573-582.
- Hartl, F. 1996. Molecular chaperones in cellular protein holding. *Nature* 381: 571-579.
- Hartl, F. U. & Hayer-Hartl, M. 2002. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent C_{ain} to folded protein. *Science* 295: 1852-1858.
- Hernández-Rodríguez, A., Alceste-Oliviero, C., Sanchez, R., Jory, D., Vidal, L. & Constain-Franco, L. 2001. Aquaculture development trends in Latin America and the Caribbean. In: Subasinghe, R. P., Bueno, P., Phillips, M. J., Hough, C., McGladdery, S. E. & Arthur, J. R. (Eds). *Aquaculture in the Third Millenium*.

Technical Proceedings of the Conference on Aquaculture in the Third Millenium, Bangkok, Thailand, 20-25 February 2000. pp. 317-340. NACA, Bangkok and FAO, Rome.

Hossain, M. S., Chakraborty, A., Joseph, B., Otta, S. K., Karunasagar, I. & Karunasagar, I. 2001. Detection of new hosts for white spot syndrome virus of shrimp using nested polymerase chain reaction. *Aquaculture* 198: 1-11.

Houghton, G. & Matthews, R. A. 1986. Immunosuppression of carp (*Cyprinus carpio* L.) to ichthyophthiriasis using corticosteroid triamcinolone acetonide. *Veterinarian Immunology and Immunopathology* 12: 413-419.

van Hulten, M. C. W., Witteveldt, J., Peters, S., Kloosterboer, N., Tarchini, R., Fiers, M., Sandbrink, H., Lankhorst, R. K. & Vlak, J. M. 2001 a. The white spot syndrome virus DNA genome sequence. *Virology* 286: 7-22.

Isabelle, B., Arnaud, T., Sabrina, R., Michel, A. & Dario, M. 2003. Molecular identification and expression of heat shock cognate 70 (HSC70) and the heat shock protein 70 (HSP70) genes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Cell Stress Chaperones* 8: 76-85.

Israngkura, A. & Sae-Hae, S. 2002. A review of the economic impacts of aquatic animal diseases, pp. 253-286. In: Arthur, J. R., Phillips, M. J., Subasinghe, R. P., Reantaso, M. B. & MacRae, I. H. (Eds.). *Primary Aquatic Animal Health Care in rural, small-scale, Aquaculture Development*. FAO Fish Tech. Pap. No. 406, Rome, FAO, 2002, 382 pp.

Iwama, G. K., Thomas, P. T., Forsyth, R. B. & Vijayan, M. M. 1998. Heat shock protein expression in fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 8: 35-56.

von Janowsky, B., Major, T., Knapp, K. & Voos, W. 2006. The disaggregation activity of the mitochondrial ClpB homolog HSP78 maintains HSP70 function during heat stress. *Journal of Molecular Biology* 357: 793-807.

- Jiravanichpaisal, P., Söderhäll, K. & Söderhäll, I. 2004. Effect of water temperature on the immune response and infectivity pattern of white spot syndrome virus (WSSV) in freshwater crayfish. *Fish & Shellfish Immunology* 17: 265-275.
- Johnson, P. T. 1983. Diseases caused by viruses, rickettsiae, bacteria and fungi in: Provenzano, Jr. A. J. (Ed.). *The Biology of Crustacea, vol 6, Pathobiology*. Academia Pres., New York, pp. 1-78.
- Kaplan E. & Meier P. 1958. Nonparametric estimation from incomplete observations. *Journal of American Statistics Association* 53: 457-481.
- Kanchanaphum, P., Wongteerasupaya, C., Sitidilokratana, N., Boonsaeng, V., Panyim, S., Tassanakajon, A., Withyachumnarnkul, B. & Flegel, T. W. 1998. Experimental transmission of white spot syndrome virus (WSSV) from crabs to shrimp *Penaeus monodon*. *Diseases of Aquatic Organisms* 34: 1-7.
- Kiang, J. G. & Tsokos, G. C. 1998. Heat shock protein 70 kDa: molecular biology, biochemistry and physiology. *Pharmacology Therapy* 80: 183-201.
- Kimura, T., Nakano, H., Momoyama, K., Yamano, K. & Inouye, K. 1996. Detection of penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV) by PCR. *Fish Pathology* 31: 93-98.
- Kregel, K.C. 2002. Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. *Journal of Applied Physiology* 92: 2177-2186.
- Di Leonardo, V. A., Bonnichon, V., Roch, Ph., Parrinello, N. & Bonami, J. R. 2005. Comparative WSSV infection routes in the shrimp genera *Marsupenaeus* and *Palaemon*. *Journal of Fish Diseases* 28: 565-569.
- Lightner, D. V. 1996. *A handbook of pathology and diagnostic procedures for diseases of penaeid shrimp*. Baton Rouge, LA.

- Lightner, D. V. 1999. The penaeid shrimp viruses TSV, IHHNV, WSSV and YHV: current status in the Americas, available diagnostic methods and management strategies. *Journal of Applied Aquaculture* 9: 27-52.
- Lightner, D. V. 2004. The penaeid shrimp viral pandemics due to IHHNV, WSSV, TSV and YHV: History in the Americas and current status. http://www.lib.noaa.gov/retiredsites/japan/aquaculture/proceedings/report32/lightner_corrected.pdf.
- Lightner, D. V. & Redman, R. M. 1981. A baculovirus-caused disease of the penaeid shrimp, *Penaeus monodon*. *Journal of Invertebrate Pathology* 38: 299-302.
- Lightner, D. V. & Redman, R. M. 1998. Shrimp diseases and current diagnostic methods. *Aquaculture* 164: 201-220.
- Liu, B., Yu, Z., Song, X., Guan, Y., Jian, X. & He, J. 2006. The effect of acute salinity change on white spot syndrome (WSS) outbreaks in *Fenneropenaeus chinensis*. *Aquaculture* 253: 163-170.
- Liu, J., Yang, W.J., Zhu, X.J., Karouna-Renier, N. & Rao, R.K. 2004. Molecular cloning and expression of two HSP70 genes in the prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Cell Stress & Chaperones* 9: 313-323.
- Lo, C. F. & Kou, G. H. 1998. Virus-associated white spot syndrome of shrimp in Taiwan: a review. *Fish Pathology* 33: 365-371.
- Lo, W. Y., Liu, K. F., Liao, I. Ch. & Song, Y. L. 2004. Cloning and molecular characterization of heat shock cognate 70 from tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Cell Stress & Chaperones* 9: 332-343.

- Lotz, J., Salazar-Anton, L. & Soto, M. A. 2005. Effect of chronic Taura syndrome virus infection on salinity tolerance of *Litopenaeus vannamei*. *Diseases of Aquatic Organisms* 65: 75-78.
- Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, L. & Randall, R. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193: 265-275.
- Lu, L., He, J. G., Deng, M., Weng, S. P. & Zuo, T. 2000. A study of tropism of white spot syndrome virus (WSSV) by *in situ* hybridization. *Tropical Oceanology* 19: 86-91.
- Marks, H., Mennens, M., Vlak, J. & van Hulten, M. C. W. 2003. Transcriptional analysis of the white spot syndrome virus major virion protein genes. *Journal of General Virology* 84: 1517-1523.
- McLennan, A. G. & Millar, D. 1990. A biological role for the heat shock response in crustaceans. *Journal of Thermal Biology* 15: 61-66.
- McPadden, C. A. 1985. A brief review of the Ecuadorian shrimp Industry. Typewritten report. Instituto Nacional de Pesca. Guayaquil, Ecuador. Pp. 42-66.
- Melena J., Bayot B., Betancourt I., Amano Y., Panchana F., Alday V., Calderón J., Stern S., Roch Ph. & Bonami J. R. 2006. Pre-exposure to infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus or to inactivated white spot syndrome virus (WSSV) confers protection against WSSV in *Penaeus vannamei* (Boone) post-larvae. *Journal of Fish Diseases* 29: 589-600.
- Miller, S. I., Ernst, R. K., Bader, M. W. 2005. LPS, TLR4 and infectious
- Molina, A., Biemar, F. & Muller, F. 2000. Cloning and expression analysis of an inducible HSP70 gene from tilapia fish. *FEBS Letters* 474: 5-10.
- Montgomery-Brock, D., Shimoho, R. Y., Cochrane, K., Bouthillette, L., Poulos, B. T., Navarro, S. A. & Lightner, D. V. 2004. Significant reduction in the replication rate

of Taura Syndrome Virus (TSV) in *Litopenaeus vannamei* held in hyperthermic conditions. Abstract Book Aquaculture 2004. World Aquaculture Society, Honolulu, Hawaii.

Montgomery-Brock, D., Tacon, A., Poulos, B. & Lightner, D. V. 2007. Reduced replication of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) in *Litopenaeus vannamei* held in warm water. *Aquaculture* 265: 41-48.

Morimoto, R.I. 1998. Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones and negative regulators. *Genes Development* 12: 3788-3796.

Morimoto, R.I., Kline, M.P., Bimston, D.N. & Cotto, J.J. 1997. The heat-shock response: regulation and function of heat-shock proteins and molecular chaperones. *Essays Biochemistry* 32: 17-29.

Moseley, P. 2000. Stress proteins and the immune response. *Immunopharmacology* 48: 299-302.

Le Moullac, G., Soyeux, 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 & Shellfish Immunology* 8: 621-629.

Le Moullac, G. & Haffner, Ph. 2000. Environmental factors affecting immune responses in Crustacea. *Aquaculture* 191: 121-131.

Mullis, K. B. & Faloona, F. 1987. In Methods in enzymology, Vol. 155 (ed.), p 335. Academic Press, New York.

Muñoz, M., Cedeño, R., Rodríguez, J., van der Knaap, W., Mialhe, E. & Bachere. 2000. Measurement of reactive oxygen intermediate production in haemocytes of the penaeid shrimp, *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* 191: 89-107.

- Murray, P. J. & Young, R. A. 1992. Stress and immunological recognition in host-pathogen interactions. *Journal of Bacteriology* 174: 4193-4196.
- Neuer, A., Spandorfer, S. D., Giraldo, P., Jeremias, J., Dieterle, S., Korneeva, I., Liu, H. C., Rosenwaks, Z. & Witkin, S. S. 1999. Heat shock protein expression during gametogenesis and embryogenesis. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology* 7: 10-16.
- Nunan, L. & Lightner, D. V. 1997. Development of a non-radioactive gene probe by PCR for detection of white spot syndrome virus (WSSV). *Journal of Virological Methods* 63: 193-201.
- Overstreet, R. M. 1978. Marine maladies?. worms, germs and other symbionts from the northern Gulf of Mexico. Mississippi – Alabama Consortium, Ocena Springs, Mississippi, pp. 1-140.
- Park, J. H., Lee, J. J. & Yoon, S. 2001. Genomic cloning of the Hsc71 gene in the hermaphroditic teleost *Rivulus marmoratus* and analysis of its expression in skeletal muscle: identification of a novel muscle-preferred regulatory element. *Nucleic Acids Research* 29: 3041-3050.
- Parsell, D. A. & Lindquist, S. 1993. The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. *Annual Review of Genetics* 27: 437-496.
- Parsell, D. A. & Lindquist, S. 1994. Heat-shock proteins and stress tolerance. In: Morimoto, R. I., Tissieres, A. and Georgopoulos, C. (Eds) *The Biology of Heat-shock Proteins and Molecular Chaperones*, pp. 457-494. Cold spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Peinado-Guevara, L. & Lopez-Meyer, M. 2006. Detailed monitoring of white spot syndrome virus (WSSV) in shrimp commercial ponds in Sinaloa, Mexico by nested PCR. *Aquaculture* 251: 33-45.

- Peng, S. E., Lo, C. F., Liu, K. F. & Kou G. H. 1998. The transition from pre-patent to patent infection of white spot syndrome virus (WSSV) in *Penaeus monodon* triggered by pereopod excision. *Fish Pathology* 33: 395-400.
- Piano, A., Valbonesi, P. & Fabbri, E. 2004. Expression of cytoprotective proteins, heat shock protein 70 and metallothioneins, in tissues of *Ostrea edulis* exposed to heat and heavy metals. *Cell Stress Chaperones* 9: 134-142.
- Pipe, R. K., Coles, J. A., Thomas, M. E., Fossato, V. U. & Pulsford, A. L. 1995. Evidence for environmentally derived immunomodulation in mussels from the Venice lagoon. *Aquatic Toxicology* 32: 59-73.
- Pipe, R. K., Coles, J. A., Carissan, F. M. M. & Ramanathan, K. 1999. Copper induced immunomodulation in the marine mussel *Mytilus edulis*. *Aquatic Toxicology* 46: 43-54.
- Pockley, A. G. 2003. Heat shock proteins as regulators of the immune response. *Lancet* 362: 469-476.
- Poulos, B. T., Pantoja, C. R., Bradley-Dunlop, D., Aguilar, J. & Lightner, D. V. 2001. Development and application of monoclonal antibodies for the detection of white spot syndrome virus of penaeid shrimp. *Diseases of Aquatic Organisms* 47: 13-23.
- 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. M., Corteel, M., Wille, M., Alday-Sanz, V., Pensaert, M. B., Sorgeloos, P. & Nauwynck, H. J. 2007. The effect of raising water temperature to 33°C in *Penaeus vannamei* juveniles at different stages of infection with white spot syndrome virus (WSSV). *Aquaculture* 272: 240-245.

- Ravaux, J., Gaill, F., Le Bris, N., Sarradin, P.M., Jollivet, D. & Shillito, B. 2003. Heat-shock response and temperature resistance in the deep-sea vent shrimp *Rimicaris exoculata*. *Journal of Experimental Biology* 206: 2345-2354.
- Reyes, A., Salazar, M. & Granja, C. 2007. Temperature modifies gene expression in subcuticular epithelial cells of white spot syndrome virus-infected *Litopenaeus vannamei*. *Developmental and Comparative Immunology* 31: 23-29.
- 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., Espinosa, Y., Echeverría, F., Cárdenas, G., Román, R. & Stern, S. 2007. Exposure to probiotics and β -1,3/1,6-glucans in larviculture modifies the immune response of *Penaeus vannamei* juveniles and both the survival to White Spot Syndrome Virus challenge and pond culture. *Aquaculture* 273: 405-415.
- Rosenberry, B. 2005. World Shrimp Farming 2005. Shrimp News International.
- Ross, P. S., De Swart, R. L., van Loveren, H., Osterhaus, A. D. & Vos, J. G. 1996. The immunotoxicity of environmental contaminants to marine wildlife: A review. *Annual Reviews of Fish Diseases* 6: 151-165.
- Sahul-Hameed, A. S., Anilkumar, M., Stephen-Raj, M. L & Jayaraman, K. 1998. Studies on the pathogenicity of systemic ectodermal and mesodermal baculovirus and its detection in shrimp by immunological methods. *Aquaculture* 160: 31-45.
- Sahul Hameed, A. S., Xavier Charles, M. & Anilkumar, M. 2000. Tolerance of *Macrobrachium rosenbergii* to white spot syndrome virus. *Aquaculture* 183: 207-213.
- Sahul Hameed, A. S., Yoganandhan, K., Sathish, S., Rasheed, M., Murugan, V. & Jayaraman, K. 2001. White spot syndrome virus (WSSV) in two species of

- freshwater crabs (*Paratelphusa hydrodomous* and *P. pulvinata*). *Aquaculture* 201: 179-186.
- Sahul Hameed, A. S., Balasubramanian, G., Syed Musthaq, S. & Yoganandhan, K. 2003. Experimental infection of twenty species of Indian marine crabs with white spot syndrome virus (WSSV). *Diseases of Aquatic Organisms* 57: 157-161.
- Sanchez, A., Pascual, C., Sanchez, A., Vargas-Albores, F., Le Moullac, G. & Rosas, C. 2001. Hemolymph metabolic variables and immune response in *Litopenaeus setiferus* adult males: the effect of acclimation. *Aquaculture* 198: 13-28.
- Santacruz, H., Vríz, S. & Angelier, N. 1997. Molecular characterization of a heat shock cognate cDNA of zebrafish, hsc70, and developmental expression of the corresponding transcripts. *Developmental Genetics* 21: 223-233.
- Santoro, M. G. 1997. Antiviral activity of cyclopentenone prostanoids. *Trends in Microbiology* 5: 276-281.
- Schlesinger, M. 1990. Heat shock proteins. *Journal of Biological Chemistry* 265: 12111-12114.
- Sierra-River, E., Voorhees, G. J. & Freeman, M. L. 1993. Gamma irradiation increases hsp-70 in chinese hamster ovary cells. *Radiation Research* 135: 40-45.
- Sindermann, C. J. 1979. Pollution-associated diseases and abnormalities of fish and shellfish: A review. *Fish Bulletin* 76: 717-749.
- Snyder, M.J., Girvetz, E. & Mulder, E.P. 2001. Stress protein induction by chemical exposures in molluscs. *Archives of Environmental and Contamination Toxicology* 41: 22-29.
- 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. *Boletín El Mundo Acuícola* 8: 50-56.

Song, L., Wu, L., Ni, D., Chang, Y., Xu, W. & Xing, K. The cDNA cloning and mRNA expression of heat shock protein 70 gene in the haemocytes of bay scallop (*Argopecten irradians*, Lamarck 1819) responding to bacteria challenge and naphthalin stress. *Fish & Shellfish Immunology* 21: 335-345.

Sørensen, J. G. & Loeschcke, V. 2001. Larval crowding in *Drosophila melanogaster* induces hsp70 expression and leads to increased adult longevity and adult thermal stress resistance. *Journal of Insect Physiology* 47: 1301-1307.

Spees, J. L., Chang, S. A., Snyder, M. J. & Chang, E. S. 2002. Osmotic induction of stress-responsive gene expression in the lobster *Homarus americanus*. *Biology Bulletin* 203: 331-337.

Stewart, G. & Young, D. 2004. Heat shock proteins and the host-pathogen interaction during bacterial infection. *Current Opinion Immunology* 16: 506-510.

Subasinghe, R. 2005. Epidemiological approach to aquatic animal health management: opportunities and challenges for developing countries to increase aquatic production through aquaculture. *Preventive Veterinary Medicine* 67: 117-124.

Syed Musthaq, S., Sudhakaran, R., Balasubramanian, G. & Sahul Hameed, A. S. 2006. Experimental transmisión and tissue tropism of white spot syndrome virus (WSSV) in two species of lobsters, *Panulirus homarus* and *Panulirus ornatus*. *Journal of Invertebrate Pathology* 93: 75-80.

Sung, Y. Y., Van Damme, E. J. M., Sorgeloos, P. & Bossier, P. 2007. Non-lethal heat shock protects gnotobiotic *Artemia franciscana* larvae against virulent *Vibrios*. *Fish & Shellfish Immunology* 22: 318-326.

- Tacon, A. 1989. Nutrición y alimentación de peces y camarones cultivados. *Manual de Capacitación. Proyecto AQUILA II*.
- Tom, M., Douek, J., Yankelevich, I., Bosch, T.C. & Rinkevich, B. 1999. Molecular characterization of the first heat shock protein 70 from a reef coral. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 262: 103-108.
- de la Vega, E., Degnan, B., Hall, M., Cowley, J. & Wilson, K. 2004. Quantitative real-time RT-PCR demonstrates that handling stress can lead to rapid increases of gill-associated virus (GAV) infection levels in *Penaeus monodon*. *Diseases of Aquatic Organisms* 59: 195-203.
- de la Vega, E., Hall, M., Degnan, B. & Wilson, K. 2006. Short-term hyperthermic treatment of heat shock protein 70 (HSP70) and reduces replication of gill associated virus (GAV). *Aquaculture* 253: 82-90.
- Vidal, O. M., Granja, C. B., Aranguren, F., Brock, J. A. & Salazar, M. 2001. A profound effect of hyperthermia upon the survival of *L. vannamei* juveniles infected with the WSSV. *Journal of World Aquaculture Society* 32: 364-372.
- Vijayan, K., Stalin Raj, V., Balasubramanian, C., Alavandi, S., & Santiago, T. 2005. Polychaete worms – a vector for white spot syndrome virus (WSSV). *Diseases of Aquatic Organisms* 63: 107-111.
- Virgilio, P. L., Motta, M. C. & da Gloria, M. 1997. Previous heat shock treatment inhibits Mayaro virus replication in human lung adenocarcinoma (A549) cells. *Research Virology* 148: 333-342.
- Volker, U., Mach, R., Schmid, R. & Hecker, M. 1992. Stress proteins and cross-protection by heat shock and salt stress in *Bacillus subtilis*. *Journal of General Microbiology* 138: 2125-2135.

- Wang, C. H., Lo, C. F., Leu, J. H., Chou, H. Y., Su, M. S. & Kou, G. H. 1995. Purification and genomic analysis of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) of *Penaeus monodon*. *Diseases of Aquatic Organisms* 23: 239-242.
- Wang, Y. C., Lo, C. F., Chang P. S. & Kou, G. H. 1998. Experimental infection of white spot baculovirus in some cultured and wild decapods in Taiwan. *Aquaculture* 164: 221-231.
- Wongteerasupaya, C., Vickers, J. E., Sriurairatana, S., Nash, G. L. & Flegel, T. W. 1995. A non-occluded, systemic baculovirus that occurs in cells of ectodermal and mesodermal origin and causes high mortality in the black tiger prawn *Penaeus monodon*. *Diseases of Aquatic Organisms* 21: 69-77.
- Wu, J. L., Namikoshi, A., Nishizawa, T., Mushiake, K., Teruya, K. & Muroga, K. 2001. Effects of shrimp density on transmission of penaeid acute viremia in *Penaeus japonicus* by cannibalism and the waterborne route. *Diseases of Aquatic Organisms* 47: 129-135.
- Yang, F., He, J., Lin, X., Li, Q., Pan, D., Zhang, X. & Xu, X. 2001. Complete genome sequence of the shrimp white spot bacilliform virus. *Journal of Virology* 75: 11811-11820.
- Yamuna, A., Kabila, V. & Geraldine, P. 2000. Expresión of heat shock protein 70 in freshwater prawn *Macrobrachium malcolmsonii* (H. Milne Edwards) following exposure to Hg and Cu. *Indian Journal of Experimental Biology* 38: 921-925.
- Zhan, W. B., Wang, Y. H., Fryer, J. L., Okubo, K., Fukuda, H., Yu, K. K. & Meng, Q. X. 1999. Production of monoclonal antibodies (MAbs) against white spot syndrome virus (WSSV). *Journal of Aquatic Animal Health* 11: 17-22.
- Zhang, L. R., Zhang, J. H., Chen, D. H. & Xiao L. C. 1994. Assembly of the rod-shape virus of *Penaeus orientalis* Kishinoye in vivo. *Journal of Chinese Electron Microscopy Society* 13: 354-363.

ANEXOS

ANEXO 1

ANÁLISIS DE PCR

Tipo de análisis: PCR de dos pasos para WSSV.

No. de muestras; 65 muestras

Tipo de muestra: Camarones subadultos

Muestras fijadas en etanol al 95%.

Para este tipo de análisis se utilizaron los iniciadores de Kimura *et al.* (1996).

Tipo de extracción del ADN: Solución de Isotiocianato de Guanidina.

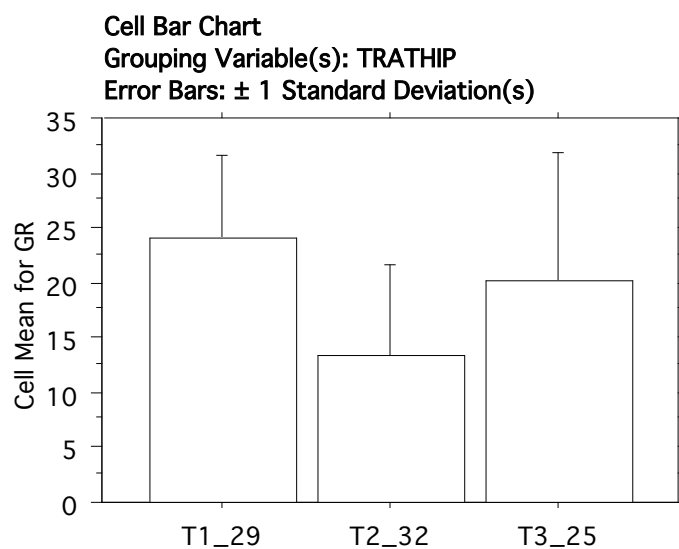
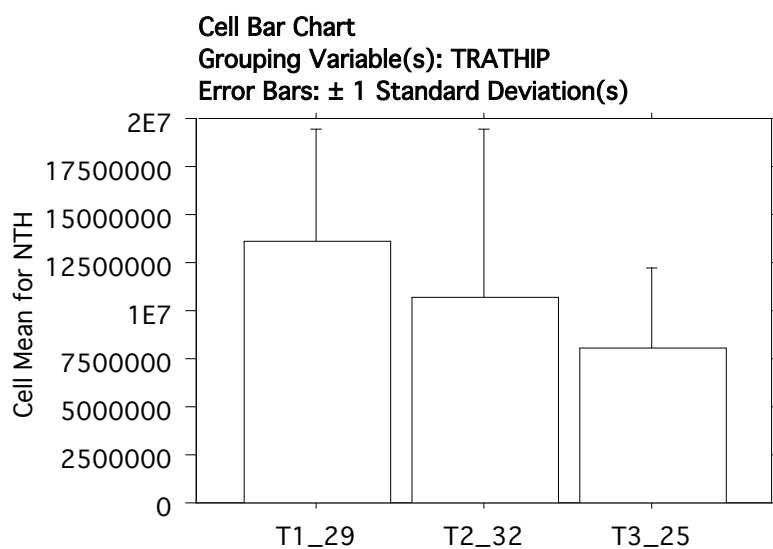
Resultados:

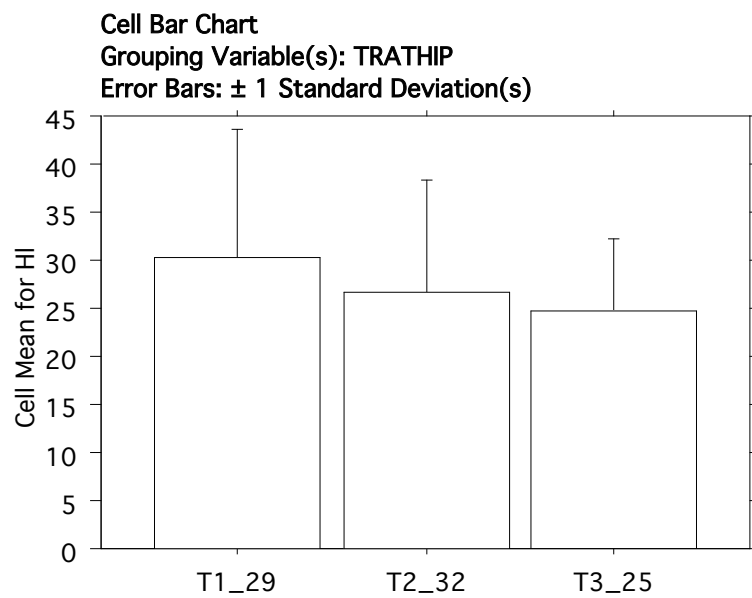
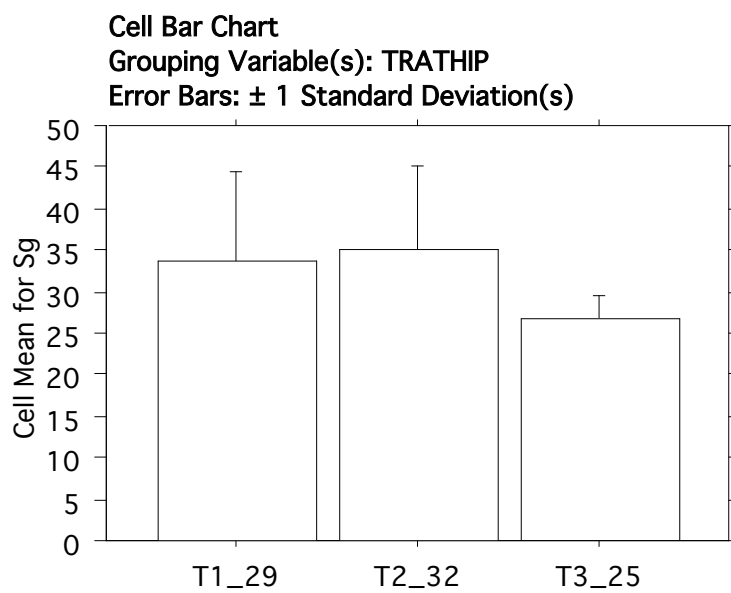
Código	T (°C)	Camarones	Código	T (°C)	Camarones
Bandeja 1	29	7/5 positivos	Bandeja 6	29	8/ 6 positivos
Bandeja 2	32	8/8 positivos	Bandeja 7	29	7/5 positivos
Bandeja 3	32	5/4 positivos	Bandeja 8	32	7/7 positivos
Bandeja 4	29	5/3 positivos	Bandeja 9	29	6/3 positivos
Bandeja 5	32	5/4 positivos	Bandeja 10	32	7/7 positivos

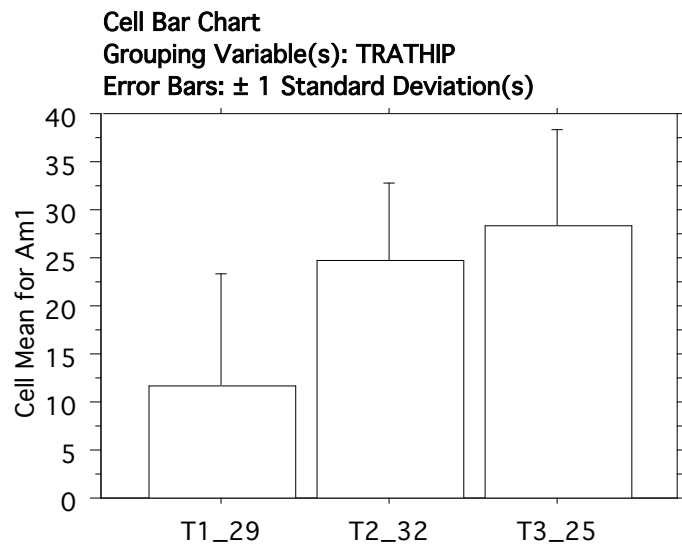
ANEXO 2

TABLAS Y GRÁFICOS HEMOGRAMAS

CAMARONES CON HIPERTERMIA







ANOVA Table for Am_T

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value
TRATHIP	2	.233	.116	3.955	.0479
Residual	12	.353	.029		

Model II estimate of between component variance: .017

Bonferroni/Dunn for Am_T

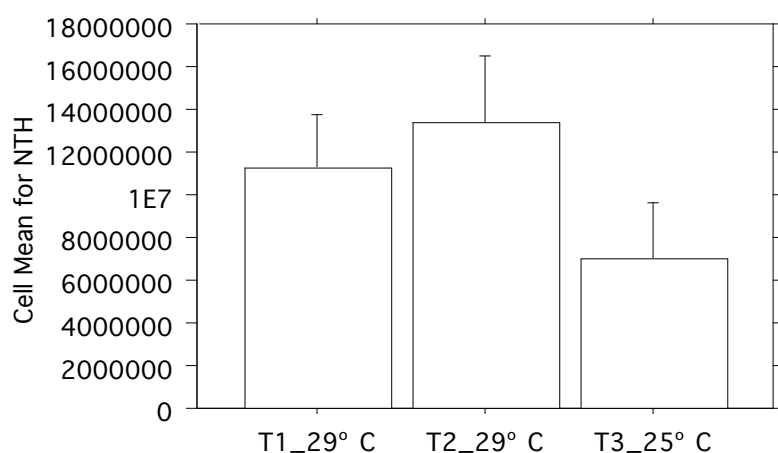
Effect: TRATHIP

Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff	P-Value
T1_29, T2_32	-.242	.302	.0456
T1_29, T3_25	-.282	.302	.0233
T2_32, T3_25	-.040	.302	.7188

Comparisons in this table are not significant unless the corresponding p-value is less than .0167.

CAMARONES SIN HIPERTERMIA



ANOVA Table for NTH

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value
TRATHIP	2	10486933333333.250	5243466666666.625	6.650	.0114
Residual	12	9462400000000.000	788533333333.333		

Model II estimate of between component variance: 890986666666.658

Scheffe for NTH

Effect: TRATHIP

Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff	P-Value	
T1_29° C, T2_29° C	-2120000.000	4950703.949	.5101	
T1_29° C, T3_25° C	4240000.000	4950703.949	.0971	
T2_29° C, T3_25° C	6360000.000	4950703.949	.0128	S

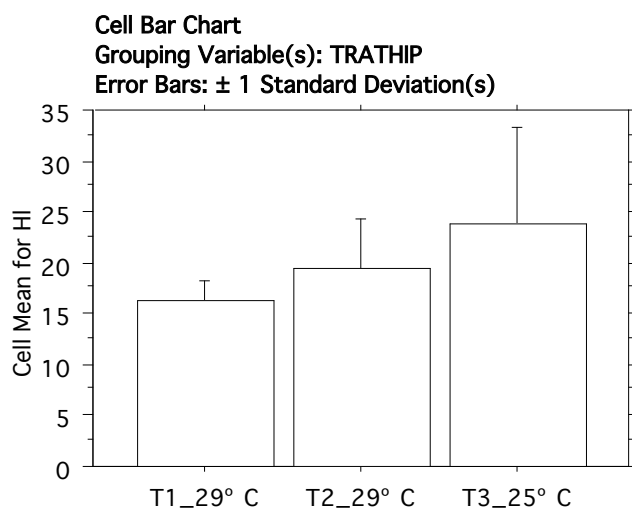
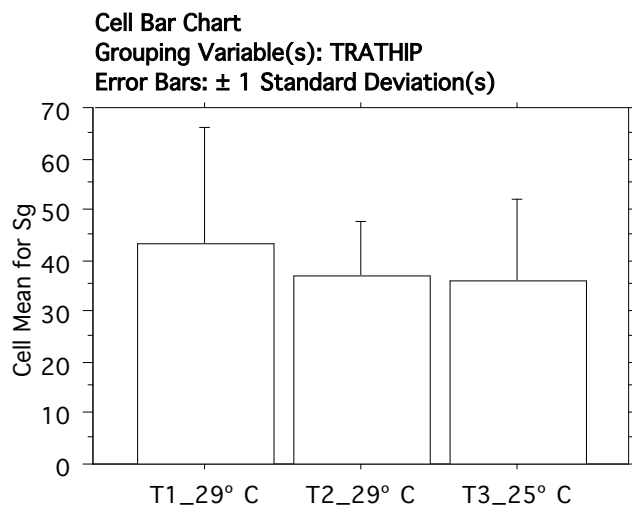
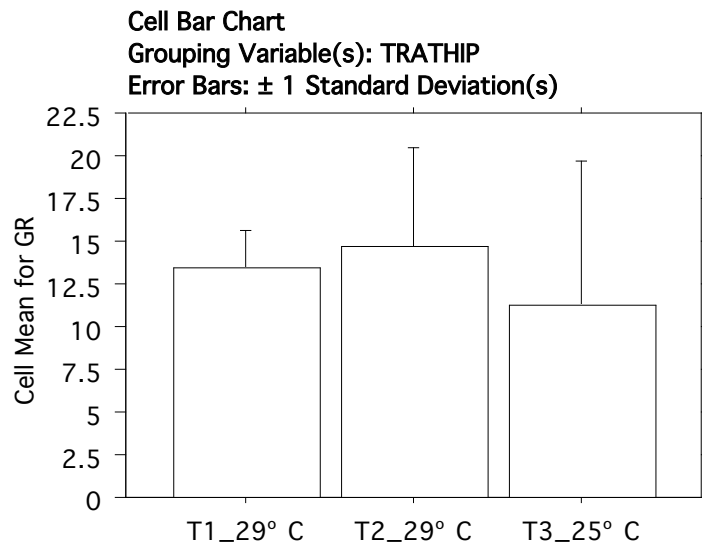
Bonferroni/Dunn for NTH

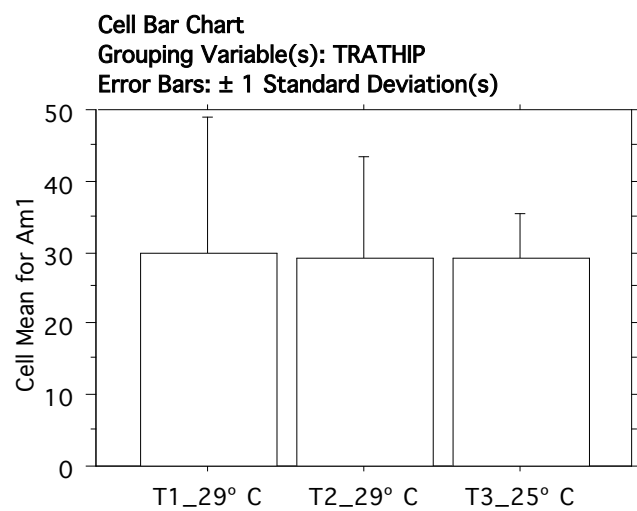
Effect: TRATHIP

Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff	P-Value	
T1_29° C, T2_29° C	-2120000.000	4936310.841	.2557	
T1_29° C, T3_25° C	4240000.000	4936310.841	.0343	
T2_29° C, T3_25° C	6360000.000	4936310.841	.0038	S

Comparisons in this table are not significant unless the corresponding p-value is less than .0167.





ANEXO 3

TABLAS HEMOCITOS AMORFOS CON HIPERTERMIA

Tukey Compromise
Effect: TRATHIP
Dependent: Am_T
Significance level: .05

	Count	Mean	
T1_29	5	.2857	a
T2_32	5	.5355	a
T3_25	5	.5755	a

None were significantly different at this level.

Tukey Compromise
Effect: TRATHIP
Dependent: Am_T
Significance level: .05

	Vs.	Diff.	Crit. diff.
T1_29	T2_32	.2498	.2707
	T3_25	.2898	.2980
T2_32	T3_25	.0400	.2707

None were significantly different at this level.

	Vs.	Diff.	Std. Error	t-Test	P-Value
T1_29	T2_32	-.2498	.1118	-2.2343	.0453
	T3_25	-.2898	.1118	-2.5921	.0236
T2_32	T3_25	-.0400	.1118	-.3578	.7267

NÚMERO TOTAL DE HEMOCITOS SIN HIPERTERMIA

Tukey Compromise
Effect: TRATHIP
Dependent: NTH
Significance level: .05

	Vs.	Diff.	Crit. diff.	
T3_25° C	T1_29° C	4240000	4.3012E6	S
	T2_29° C	6360000	4734415.55	
T1_29° C	T2_29° C	2120000	4.3012E6	

S = Significantly different at this level.

Tukey Compromise
Effect: TRATHIP
Dependent: NTH
Significance level: .05

	Count	Mean	
T3_25° C	5	7000000	a
T1_29° C	5	11240000	a b
T2_29° C	5	13360000	b

	Vs.	Diff.	Std. Error	t-Test	P-Value
T1_29° C	T2_29° C	-2120000	1.776E6	-1.1937	.2557
	T3_25° C	4240000	1.776E6	2.3874	.0343
T2_29° C	T3_25° C	6360000	1.776E6	3.5811	.0038

ANEXO 4

PRUEBA DE NBT (GENERACIÓN DE ANIÓN SUPERÓXIDO): CAMARONES EXPUESTOS A HIPERTERMIA

ANOVA Table for nbt_tasa

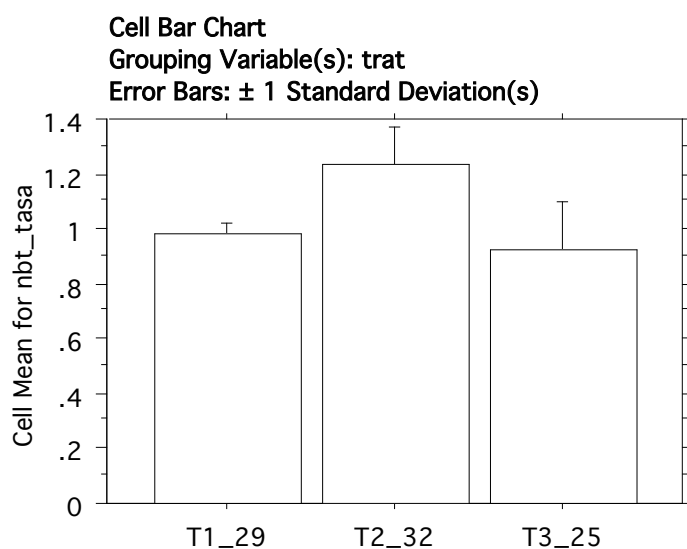
	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value
trat	2	.284	.142	8.493	.0050
Residual	12	.201	.017		

Model II estimate of between component variance: .025

Means Table for nbt_tasa

Effect: trat

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
T1_29	5	.982	.039	.017
T2_32	5	1.238	.133	.059
T3_25	5	.920	.176	.079



Scheffe for nbt_tasa

Effect: trat

Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. D...	P-Value	
T1_29, T2_32	-.256	.228	.0279	S
T1_29, T3_25	.062	.228	.7554	
T2_32, T3_25	.318	.228	.0075	S

Bonferroni/Dunn for nbt_tasa

Effect: trat

Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff	P-Value	
T1_29, T2_32	-.256	.227	.0087	S
T1_29, T3_25	.062	.227	.4631	
T2_32, T3_25	.318	.227	.0022	S

Comparisons in this table are not significant unless the corresponding p-value is less than .0167.

CAMARONES SIN HIPERTERMIA

ANOVA Table for Some of nbt_tasa

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value
Some of trat	2	.618	.309	16.026	.0004
Residual	12	.231	.019		

Model II estimate of between component variance: .058

Means Table for Some of nbt_tasa

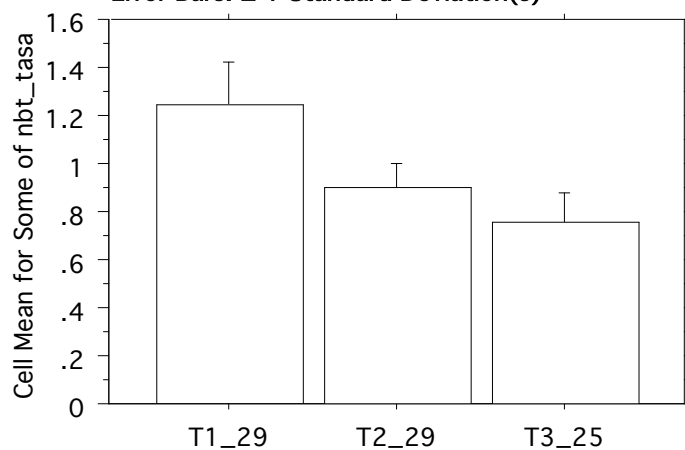
Effect: Some of trat

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
T1_29	5	1.242	.185	.083
T2_29	5	.902	.099	.044
T3_25	5	.758	.118	.053

Cell Bar Chart

Grouping Variable(s): Some of trat

Error Bars: ± 1 Standard Deviation(s)



Scheffe for Some of nbt_tasa

Effect: Some of trat

Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff	P-Value	
T1_29, T2_29	.340	.245	.0077	S
T1_29, T3_25	.484	.245	.0005	S
T2_29, T3_25	.144	.245	.2971	

Bonferroni/Dunn for Some of nbt_tasa

Effect: Some of trat

Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff	P-Value	
T1_29, T2_29	.340	.244	.0022	S
T1_29, T3_25	.484	.244	.0001	S
T2_29, T3_25	.144	.244	.1269	

Comparisons in this table are not significant unless the corresponding p-value is less than .0167.

ANEXO 5

PRUEBA DE NBT (GENERACIÓN DE ANIÓN SUPERÓXIDO): CAMARONES CON HIPERTERMIA

Tukey Compromise
Effect: trat
Dependent: nbt_tasa
Significance level: .05

	Count	Mean	
T3_25	5	.9395	a
T1_29	5	1.0015	a
T2_32	5	1.2575	b

Tukey Compromise
Effect: trat
Dependent: nbt_tasa
Significance level: .05

	Vs.	Diff.	Crit. diff.	
T3_25	T1_29	.0620	.1981	S
	T2_32	.3180	.2181	
T1_29	T2_32	.2560	.1981	S

S = Significantly different at this level.

	Vs.	Diff.	Std. Error	t-Test	P-Value
T1_29	T2_32	-.2560	.0818	-3.1294	.0087
	T3_25	.0620	.0818	.7579	.4631
T2_32	T3_25	.3180	.0818	3.8873	.0022

NBT SIN HIPERTERMIA

Tukey Compromise
Effect: Some of trat
Dependent: Some of nbt_tasa
Significance level: .05

	Count	Mean	
T3_25	5	.7775	a
T2_29	5	.9215	a
T1_29	5	1.2615	b

Tukey Compromise
Effect: Some of trat
Dependent: Some of nbt_tasa
Significance level: .05

	Vs.	Diff.	Crit. diff.	
T3_25	T2_29	.1440	.2126	S
	T1_29	.4840	.2340	
T2_29	T1_29	.3400	.2126	S

S = Significantly different at this level.

	Vs.	Diff.	Std. Error	t-Test	P-Value
T1_29	T2_29	.3400	.0878	3.8726	.0022
	T3_25	.4840	.0878	5.5128	.0001
T2_29	T3_25	.1440	.0878	1.6402	.1269

ANEXO 6

TABLAS Y GRÁFICOS ANÁLISIS DE PROTEÍNAS: CAMARONES CON HIPERTERMIA

ANOVA Table for protein

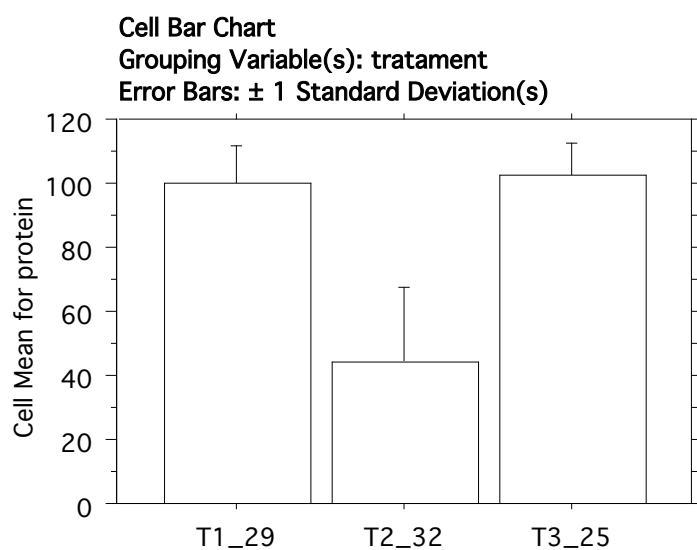
	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value
tratament	2	10929.920	5464.960	21.097	.0001
Residual	12	3108.494	259.041		

Model II estimate of between component variance: 1041.184

Means Table for protein

Effect: tratament

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
T1_29	5	99.862	11.755	5.257
T2_32	5	44.094	23.287	10.414
T3_25	5	102.742	9.833	4.397



Scheffe for protein

Effect: tratament

Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff	P-Value	
T1_29, T2_32	55.768	28.375	.0005	S
T1_29, T3_25	-2.880	28.375	.9609	
T2_32, T3_25	-58.648	28.375	.0004	S

Bonferroni/Dunn for protein

Effect: tratamiento

Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff	P-Value	
T1_29, T2_32	55.768	28.293	.0001	S
T1_29, T3_25	-2.880	28.293	.7821	
T2_32, T3_25	-58.648	28.293	<.0001	S

Comparisons in this table are not significant unless the corresponding p-value is less than .0167.

CAMARONES SIN HIPERTERMIA

ANOVA Table for protein

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value
tratamiento	2	1725.215	862.607	.414	.6699
Residual	12	24984.191	2082.016		

Model II estimate of between component variance: •

Means Table for protein

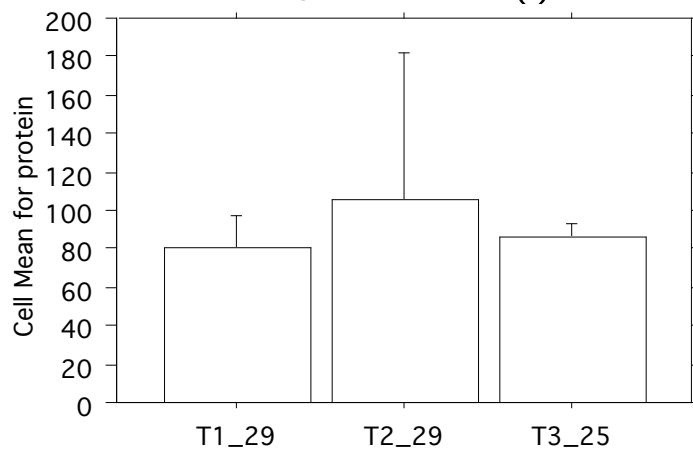
Effect: tratamiento

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
T1_29	5	79.904	16.746	7.489
T2_29	5	104.946	76.807	34.349
T3_25	5	85.552	8.145	3.643

Cell Bar Chart

Grouping Variable(s): tratamiento

Error Bars: ± 1 Standard Deviation(s)



ANEXO 7

CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS PLASMÁTICAS: HIPERTERMIA

Tukey Compromise
Effect: tratamiento
Dependent: protein
Significance level: .05

	Count	Mean	
T2_32	5	44.1135	a
T1_29	5	99.8815	b
T3_25	5	102.7615	b

Tukey Compromise
Effect: tratamiento
Dependent: protein
Significance level: .05

	Vs.	Diff.	Crit. diff.	
T2_32	T1_29	55.7680	24.6524	S
	T3_25	58.6480	27.1357	S
T1_29	T3_25	2.8800	24.6524	

S = Significantly different at this level.

	Vs.	Diff.	Std. Error	t-Test	P-Value
T1_29	T2_32	55.7680	10.1792	5.4786	.0001
	T3_25	-2.8800	10.1792	-.2829	.7821
T2_32	T3_25	-58.6480	10.1792	-5.7615	.0001