

# UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y TECNOLÓGICAS

LICENCIATURA EN BIOLOGIA

EFEECTO DE LA INFECCIÓN DEL VIRUS DE LA NECROSIS INFECCIOSA  
HIPODÉRMICA Y HEMATOPOYÉTICA (IHHNV) SOBRE DIVERSOS PARÁMETROS  
BIOQUÍMICOS PLASMÁTICOS Y HEPATOPANCREÁTICOS DEL CAMARÓN

BLANCO (*Penaeus vannamei*)

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

CON OPCIÓN EN

ACUACULTURA

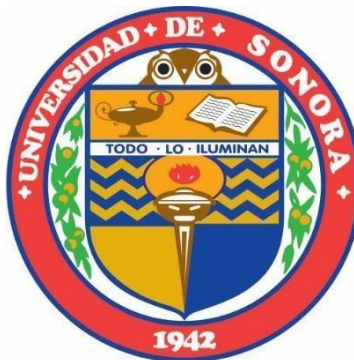
PRESENTA:

DIEGO ALBERTO GALVÁN ÁLVAREZ

Hermosillo, Sonora

Junio 2012

# Repositorio Institucional UNISON



**“El saber de mis hijos  
hará mi grandeza”**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

## **FORMATO DE APROBACIÓN**

Los miembros del Comité de Tesis designado para revisar la Tesis de Diego Alberto Galván Álvarez la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito para obtener el Título de Licenciado en Biología con Opción en Acuicultura.

---

Dr. Arturo Sánchez Paz  
Director de Tesis

---

Dr. Marco Antonio Lopez Torres  
Sinodal Secretario

---

Dr. Luis Enrique Gutiérrez Millán  
Sinodal

---

M.C. Lorena Bringas Alvarado  
Suplente

## DEDICATORIA

La realización del presente trabajo representa toda una vida de sueños, inquietudes, anhelos y superación personales, pero sobretodo, representan el inicio de mi formación profesional; aquel lejano sueño infantil por fin es una realidad.

Dedico especialmente la culminación de este trabajo a mi padre **RICARDO** y mi madre **SOCORRO**, por ser el ejemplo de vida honesta, de esfuerzo y de superación que me hicieron no desistir para su finalización, nunca podré pagar tanto que me han dado.

A mis hermanos **PABLO** y **RIKY**, sin su apoyo nada fuese como lo es hoy...GRACIAS.

A **KAREN**, de principio a fin fuiste parte de este proyecto. GRACIAS.

A **DIEGUITO**, tu fortaleza se ha convertido en mi fortaleza, llenas mi vida al contagiarme tu alegría. GRACIAS por ser ese gran luchador que me ha enseñado tanto en tan poco tiempo. Mi VIEJO te amo.

Al pequeño **JOSÉ TADEO**; hijo, GRACIAS por ser un motivo más para despertar cada mañana y amar la vida por permitirme el poder AMARTE.

A mi tía **ISABEL**, nunca olvidaré que estuviste cuando más te necesitaba; donde te encuentres **TIA CHABELA** GRACIAS por tus reconfortantes palabras, siempre las tengo presentes.

A **DIOS**, por darme la fortaleza de seguir adelante.

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la **Universidad de Sonora** por aceptarme como estudiante y brindarme la oportunidad de forjar mi futuro profesional en sus aulas.

Expreso mi agradecimiento al **Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora (DICTUS)** y a la **Licenciatura en Biología**, mi puerta de entrada a este maravilloso mundo llamado CIENCIA.

Al **Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR) campus Hermosillo** por las facilidades prestadas para la realización de este estudio.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)**. Por su apoyo al Proyecto 102744 (ASP)

A los miembros del **Comité de Tesis**. Por su valiosa aportación y observaciones efectuadas desde el inicio de este trabajo de titulación.

Quiero expresar de manera muy especial mi agradecimiento a mi director de tesis **Dr. Arturo Sánchez Paz**; por la confianza, paciencia y experiencia depositada en mi persona, esperando sea solo el principio de una sólida relación académica, laboral y personal.

Agradezco al **Dr. Jorge Hernández López**; por su incondicional apoyo desde mi llegada al laboratorio y darme la confianza de ingresar en su equipo de trabajo. Debe de saber que su franqueza al brindarme su amistad es igualmente retribuida.

Se agradece la valiosa colaboración del **M. en C. José Fernando Mendoza Cano**, por el apoyo en la determinación de metabolitos plasmáticos, y tiempo dedicado en diferentes etapas de este trabajo de tesis.

Al **Biol. Daniel Eduardo Coronado Molina**; su amplia experiencia de campo me permitió una mejor comprensión de la zootecnia de los organismos utilizados en el experimental.

Quiero agradecer por su paciencia y apoyo a detallar y finalizar en el formato adecuado para el escrito de este experimental a la **M. en C. Rosa Isela Vázquez Sánchez**.

Le agradezco a **Alfredo Barreras Torres**, su disponibilidad y apoyo en cuestiones técnicas al momento de realizar el bioensayo de este estudio.

## INDICE

	Página
<b>DEDICATORIA</b>	ii
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	iii
<b>ÍNDICE</b>	iv
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	vi
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	vii
<b>RESUMEN</b>	x
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>II. ANTECEDENTES</b>	3
II.1. Enfermedades Virales del Camarón	3
II.1.1. Enfermedad de la necrosis infecciosa hipodérmica y hematopoyética (IHHN)	4
II.1.1.1. Taxonomía y distribución geográfica del IHHNV	5
II.2. Infecciones Virales: Cambios en el Metabolismo Energético del Hospedero	6
II.2.1. Metabolitos plasmáticos en camarones peneidos	6
II.2.2. Metabolitos hepatopancreáticos en camarones peneidos	8
<b>III. JUSTIFICACIÓN</b>	10
<b>IV. HIPÓTESIS</b>	11
<b>V. OBJETIVOS</b>	12
V.1. Objetivo general	12
V.1.1. Objetivos específicos	12
<b>VI. METODOLOGÍA</b>	13
VI.1. Selección de Organismos Libres de IHHNV	13
VI.2. Preparación del Inoculo Viral	15
VI.3. Inoculación Experimental	15
VI.4. Obtención de Muestras	16
VI.5. Análisis Bioquímico de los Metabolitos Plasmáticos	17
VI.6. Análisis Estadístico	18
<b>VII. RESULTADOS</b>	19

VII.1. Índice Hepatosomático	19
VII.2. Metabolitos Plasmáticos	20
VII.2.1. Concentración de glucosa	20
VII.2.2. Concentración de lactato	21
VII.2.3. Concentración de proteínas totales	22
VII.2.4. Concentración de esteroides	23
VII.2.5. Concentración de acilglicéridos	24
VII.2.6. Concentración de lípidos totales	25
VII.3. Metabolitos Hepatopancreáticos	26
VII.3.1. Concentración de glucosa	26
VII.3.2. Concentración de glucógeno	27
VII.3.3. Concentración de proteínas totales	28
VII.3.4. Concentración de esteroides	29
VII.3.5. Concentración de acilglicéridos	30
VII.3.6. Concentración de lípidos totales	31
VIII. <b>DISCUSIÓN</b>	32
IX. <b>CONCLUSIONES</b>	43
X. <b>LITERATURA CITADA</b>	44

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I	Países en los cuales se reporta la presencia de diferentes aislados de IHHNV	7
Tabla II	Relación de longitudes de onda (nm) y coloración resultante de la reacción colorimétrica para la evaluación de la concentración de cada metabolito.	17



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Índice hepatosomático (IHS). Se muestran los resultados de los organismos del tratamiento control y de los organismos infectados experimentalmente a diferentes días post-inoculación (dpi). Durante el estudio no se observaron diferencias estadísticas significativas en este parámetro entre los tratamientos ( $p>0.294$ ). Los valores representan la media $\pm$ DS.	19
Figura 2	Concentración de glucosa (mg/mL) en plasma de camarón. Se muestran los resultados de los organismos del tratamiento control y de los organismos infectados experimentalmente a diferentes días post-inoculación (dpi). Los valores representan la media $\pm$ DS. *: Valor estadísticamente diferente ( $p= 0.002$ ).	20
Figura 3	Concentración de lactato (mg/mL) en plasma de camarón. Se muestran el tratamiento control y tratamiento infectado a diferentes días post-inoculación (dpi). Los valores representan la media $\pm$ DS. (*): Valor con diferencia significativa ( $p\leq 0.012$ ).	21
Figura 4	Concentración de proteínas totales (mg/mL) en plasma de camarón. Se muestran el tratamiento control y tratamiento infectado a diferentes días post-inoculación (dpi). Los valores representan la media $\pm$ DS.	22
Figura 5	Concentración de esteroides (mg/mL) en plasma camarón. Se muestran el tratamiento control y tratamiento infectado a diferentes días post-inoculación (dpi). Los valores representan la media $\pm$ DS. (*): Valor con diferencia significativa ó estadísticamente diferente ( $p=0.001$ ).	23
Figura 6	Concentración de acilglicéridos (mg/mL) en plasma de camarón. Se muestran el tratamiento control y tratamiento infectado a diferentes días post-inoculación (dpi). Los valores representan la media $\pm$ DS. (*): Valor con diferencia significativa ( $p\leq 0.005$ ).	24

Figura 7	Concentración de Lípidos Totales (mg/mL) en plasma de camarón. Se muestran el tratamiento control y tratamiento infectado a diferentes días post-inoculación (dpi). Los valores representan la media $\pm$ DS. (*): Valor con diferencia significativa (p=0.003).	25
Figura 8	Concentración de glucosa (mg/g) en hepatopáncreas de camarón. Se muestran el tratamiento control y tratamiento infectado a diferentes días post-inoculación (dpi). Los valores representan la media $\pm$ DS.	26
Figura 9	Concentración de glucógeno (mg/g) en hepatopáncreas de camarón. Se muestran el tratamiento control y tratamiento infectado a diferentes días post-inoculación (dpi). Los valores representan la media $\pm$ DS.	27
Figura 10	Concentración de proteína total (mg/g) en hepatopáncreas de camarón. Se muestran el tratamiento control y tratamiento infectado a diferentes días post-inoculación (dpi). Los valores encontrados (*): Valor con diferencia significativa (p= 0.008). Los valores representan la media $\pm$ DS.	28
Figura 11	Concentración de esteroles (mg/g) en hepatopáncreas de camarón. Se muestran el tratamiento control y tratamiento infectado a diferentes días post-inoculación (dpi). Los valores representan la media $\pm$ DS. (*): Valor con diferencia significativa (p= 0.001)	29
Figura 12	Concentración de acilglicéridos (mg/g) en hepatopáncreas de camarón. Se muestran el tratamiento control y tratamiento infectado a diferentes días post-inoculación (dpi). Los valores representan la media $\pm$ DS. (*): Valores con diferencia significativa (p $\leq$ 0.0130).	30
Figura 13	Concentración de Lípidos totales (mg/g) en hepatopáncreas de camarones no infectados y camarones infectados (IHHNV) muestreados a diferentes días post-inoculación (dpi). Los valores representan la media $\pm$ DS. (*): Valor con diferencia significativa (p $\leq$ 0.008).	31

- Figura 14 Representación esquemática del efecto de la infección experimental por el IHHNV en el metabolismo de la glucosa. La ruta normalmente (flechas color negro) procede a través de la oxidación de la glucosa a piruvato., Sin embargo, durante la infección con IHHNV esta ruta se altera (flechas en gris) de forma que ocurre un proceso similar a la glucólisis aerobia (o efecto Warburg), y el piruvato es reducido a lactato.. Algunos estudios han reportado la ocurrencia del efecto Warburg, la producción favorecida de lactato a partir de glucosa, en condiciones celulares patológicas como cáncer o infecciones virales (Chen et al., 2011). Posteriormente, el lactato es oxidado a piruvato, convirtiéndose en el primer sustrato de la ruta gluconeogénica. Estudios previos han reportado un incremento en la actividad de algunas enzimas gluconeogénicas en camarones infectados con WSSV (Mathew et al., 2005). 35
- Figura 15 Esquema simplificado de la ruta de síntesis de colesterol y ácidos grasos a partir de acetil-CoA. El proceso de oxidación de la glucosa a piruvato ocurre en el citoplasma, y es transportado al interior de la mitocondria. Una vez internalizado, el complejo multienzimático piruvato deshidrogenasa (PDH) cataliza la conversión del piruvato a acetil-CoA. Dado que la membrana mitocondrial es impermeable al acetil-CoA este se condensa con el oxaloacetato, producto del ciclo de Krebs, para generar citrato, reacción catalizada por la citrato sintasa (EC 2.3.3.1), Posteriormente, el citrato se exporta al citosol y a continuación, el citrato citosólico es escindido para generar oxaloacetato y acetil-CoA, reacción catalizada por la enzima ATP-citrato liasa (EC 2.3.3.8). Así, el acetil-CoA es un precursor de la síntesis de ácidos grasos y colesterol. 38

## RESUMEN

El Virus de la Necrosis Infecciosa Hipodérmica y Hematopoyética (IHHNV), es considerado como una de las amenazas más serias para la industria camaronícola, debido a que afecta de manera considerable la producción acuícola sustentada en el cultivo del camarón blanco *Penaeus vannamei*; provocando en este crustáceo una enfermedad crónica caracterizada por múltiples deformidades cuticulares y una importante disminución en la tasa de crecimiento de los organismos infectados; estado clínico conocido como el síndrome del enanismo y deformación. En el presente estudio se evaluó el efecto metabólico de la infección con IHHNV en *P. vannamei*, mediante la evaluación de reservas energéticas plasmáticas y hepatopancreáticas a los 0, 7, 14 y 21 días post-inoculación (dpi). El efecto más destacado de la infección ocurrió en la concentración de glucosa y lactato plasmática, donde se observó un incremento significativo a los 7 dpi, seguido de una disminución a los 14 dpi. Así mismo, se observó un incremento significativo en la concentración de esteroides y acilglicéridos en muestras de plasma de organismos infectados a los 14 dpi. La cuantificación de glucosa y glucógeno de origen hepatopancreáticos no mostraron diferencias significativas entre los tratamientos control e infectado durante el desarrollo de la infección viral. Por el contrario, el comportamiento de esteroides y acilglicéridos hepatopancreáticos se incrementó significativamente a los 14 dpi. La combinación de un estado hiperglucémico e hiperlactatémico, seguido de un incremento en los niveles de esteroides y acilglicéridos, sugiere que el virus secuestra, al menos, temporalmente, el metabolismo energético celular para modificar la composición lipídica de la membrana. De esta forma, el virus aprovecha los cambios estructurales y de composición para incrementar su replicación y propagación.

## I. INTRODUCCIÓN

En México, la industria camaronícola ha tenido un crecimiento significativo en las últimas dos décadas. Debido a sus condiciones geográficas y climatológicas, los estados de Sinaloa y Sonora son líderes nacionales tanto en área de cultivo como en toneladas de producción (superficie sembrada: 67,000 hectáreas, y producción total: 118,519 toneladas) (COSAES, 2009; CESASIN, 2009). Sin embargo, el creciente desarrollo de la industria del cultivo de camarones peneidos, se ha visto frenado, entre otras razones, por la presencia de enfermedades causadas por diversos patógenos, tales como protozoarios, hongos, bacterias y virus. De entre los patógenos que habitan el ambiente acuático, se considera que los más abundantes son los virus. Estudios recientes sugieren que en los océanos existen  $\sim 4 \times 10^{30}$  partículas virales (Suttle, 2005), y que cada segundo ocurren aproximadamente  $10^{23}$  infecciones, mismas que son una fuente importante de mortalidad. Además de los efectos adversos que provocan, hoy se reconoce que los virus marinos ejercen una influencia significativa en la composición de las comunidades marinas y desempeñan un papel importante dentro de los ciclos biogeoquímicos marinos. Así mismo, y como resultado de su forma de replicación, los virus poseen el potencial de introducir información genética novedosa en el organismo infectado, o en la propia progenie viral, con lo cual pueden impulsar el proceso evolutivo de las interacciones huésped-hospedero (Suttle, 2007).

La rentabilidad de la industria camaronícola se ve seriamente amenazada cuando se presentan epizootias de tipo viral debido a que causan altas mortalidades en periodos muy cortos de tiempo, no existen tratamientos efectivos disponibles contra dichos virus y a que nuestro entendimiento de los mecanismos de la patogénesis es aún mínimo.

De las enfermedades de camarón causadas por virus, la necrosis infecciosa hipodérmica y hematopoyética (IHHN), es considerada como una de las amenazas más serias para la industria camaronícola. Esta enfermedad se observó por primera ocasión en el camarón azul *Penaeus stylirostris* en Hawái (Lightner et al., 1983a) y su agente etiológico, el virus de la necrosis infecciosa hipodérmica y hematopoyética (IHHNV), se reconoció un par de años más tarde (Bell y Lightner, 1984). Recientemente, y considerando que la organización de su genoma es similar a la de los brevidensovirus del mosquito, se ha sugerido que el termino

IHHNV es inapropiado y se ha sugerido que el virus sea renombrado como *P. stylirostris* densovirus (*PstDNV*) (Shike et al., 2000).

Una característica notable del IHHNV es que en el camarón blanco *Penaeus vannamei*, no causa mortalidades importantes; sin embargo, impacta de manera negativa en la producción al provocar el Síndrome del Enanismo y Deformación (Runt-Deformity Syndrome o RDS, por sus siglas en inglés), caracterizado por una variedad de deformidades cuticulares y una reducción significativa en la tasa de crecimiento (Kalagayan, 1991).

Existen algunos estudios referentes al efecto causado por infecciones virales en el metabolismo del camarón blanco; sin embargo, actualmente no existen reportes relacionados con el efecto que pudiera ocasionar la infección con IHHNV sobre el metabolismo energético del camarón blanco, por lo que el presente trabajo pretende evaluar los efectos de la infección experimental con IHHNV sobre las reservas energéticas plasmáticas y hepatopancreáticas del camarón blanco (*P. vannamei*).

## II. ANTECEDENTES

Pese a haber pasado desapercibidos para la comunidad científica hasta hace sólo tres décadas, hoy en día se reconoce que los virus marinos, son los entes biológicos patogénicos más abundantes en el medio marino, y estudios recientes indican que albergan una enorme diversidad genética (Suttle, 2005). La observación de millones de partículas de tipo viral presentes en cada mililitro de agua oceánica excede casi en 15 veces la abundancia de bacterias y archaeas marinas (Bergh *et al.*, 1989). Además, se ha sugerido que los virus son capaces de infectar todos los organismos vivos que habitan el ambiente oceánico, desde bacterias hasta ballenas (Suttle, 2005). De esta forma se ha estimado que en el ambiente oceánico ocurren  $\sim 10^{23}$  infecciones virales cada segundo, y si bien es difícil calcular con precisión la mortalidad que ellos provocan, se ha estimado que los virus causan mortalidades de  $\sim 20-40\%$  de la biomasa procarionta que habita los mares por día, siendo asimismo una fuente importante de enfermedades y mortalidad de diversos organismos marinos (Suttle, 2005).

A pesar del importante efecto que causan los virus sobre la comunidad marina, sólo recientemente se les ha brindado la atención que requieren como factores relevantes en este ambiente. Desafortunadamente, mucho del conocimiento adquirido a la fecha proviene exclusivamente de aquellos virus que afectan especies económicamente importantes en la industria acuícola.

### II.1. Enfermedades Virales del Camarón

Desde la primera descripción del *Baculovirus penaei* en 1974 (Couch, 1974a, b), se han reportado unos 20 tipos diferentes de virus de camarón, la mayoría de los cuales fue descubierta como consecuencia del impacto negativo que han causado en la acuicultura (Lightner, 1996). Hasta el día de hoy se han reportado cinco virus que infectan camarón en el continente Americano, los cuales son: Virus del Síndrome de Taura (TSV, por sus siglas en inglés), Virus del Síndrome de la Mancha Blanca (WSSV), Virus de la Cabeza Amarilla

(YHV), Virus de la Necrosis Infecciosa Hipodérmica y Hematopoyética (IHHNV) (Lightner y Pantoja, 1996) y Virus de la Mionecrosis Infecciosa (IMNV) (Lightner *et al.*, 2004). Actualmente, tanto el WSSV como el IHHNV representan las amenazas más serias para las poblaciones naturales y de cultivo de camarón (Vega-Heredia *et al.*, 2011).

### **II.1.1. Enfermedad de la necrosis infecciosa hipodérmica y hematopoyética (IHHN)**

A principios de los 80s la población de camarón azul (*P. stylirostris*) mantenida en las instalaciones de la Universidad de Arizona en Hawái se afectó severamente por una enfermedad letal de etiología viral. Un análisis microbiológico e histológico minucioso reveló que los organismos infectados presentaban numerosas inclusiones intranucleares eosinófilas en tejidos de origen ecto- y mesodérmico. Así, para describir las principales lesiones causadas por esta enfermedad se le denominó como la enfermedad de la necrosis infecciosa hipodérmica y hematopoyética (IHHN) (Lightner *et al.*, 1983a).

En *P. stylirostris*, los primeros signos reconocibles de la enfermedad causada por el virus de la necrosis infecciosa hipodérmica y hematopoyética (IHHNV) son nado aletargado en la superficie, hundimiento y postura invertida en el fondo, disminución en la movilidad y finalmente la muerte del organismo, presentándose mayor mortalidad en animales de talla pequeña (0.5-3.7 g) que en los ubicados en el rango de talla 14.5-36.9 g (Vega-Heredia *et al.*, 2011), mientras que, en *P. vannamei* es una enfermedad de tipo crónico, la cual no presenta signos aparentes en fase inicial, pero, provoca el Síndrome de la Deformidad y Enanismo (Runt Deformity Syndrome, o RDS por sus siglas en inglés), en donde los organismos afectados exhiben rostros deformes, antenas arrugadas, exoesqueleto áspero o rugoso, y otras deformidades. Además, las poblaciones de juveniles con RDS presentan una distribución de tallas relativamente amplia con una proporción de tallas pequeñas mucho mayor de lo normal (Pantoja y Lightner, 2008).

Si bien, actualmente no existe un tratamiento efectivo contra el virus, existen reportes que mencionan que se han desarrollado líneas de *P. stylirostris* resistentes a IHHNV. Así, técnicas de reproducción efectivas que permitan líneas de *P. vannamei* libres de este patógeno,



se consideran como estrategias efectivas a seguir para mitigar los efectos de esta enfermedad (Tang y Lightner, 2002).

#### **II.1.1.1. Taxonomía y distribución geográfica del IHHNV**

Debido a su morfología (partículas virales de 22 nm de diámetro de forma icosaédrica), características fisicoquímicas (densidad de flotación de 1.40 g/mL en CsCl y alta estabilidad a pH, temperatura y agentes desnaturalizantes) y organización genómica (una molécula de ADN de cadena simple con tamaño estimado de 3.9 kbp, compuesta de tres grandes marcos de lectura abiertos) el IHHNV ha sido ubicado taxonómicamente dentro de la familia Parvoviridae, subfamilia Densovirinae. Generalmente, los miembros de esta subfamilia son capaces de infectar organismos invertebrados, principalmente insectos, así el IHHNV es el primer integrante identificado del género Brevidensovirus capaz de infectar artrópodos fuera de la clase Insecta (Lightner et al., 1987; Shike et al., 2000).

Algunos estudios indican que la introducción hacia Hawái de este patógeno se debió a la importación de lotes de organismos peneidos originados en Sur y Centro América, área geográfica de la cual se sugiere es endémico este virus en camarones cultivados en esa zona (Lightner et al., 1983b). Este patógeno viral se encuentra ampliamente distribuido en zonas de cultivo en América y en poblaciones silvestres a lo largo de la costa del pacífico y el Caribe (Vega-Heredia et al., 2011). Así, se ha reportado que en granjas camaronícolas instaladas en la zona del Golfo de California se encontraron organismos de *P. stylirostris* infectados con el virus (Lightner et al., 1992); mientras que en el Golfo de México, se ha reportado su presencia en muestras de camarón blanco *P. setiferus* y de camarón café *P. aztecus* de La Laguna Madre, Tamaulipas (Guzmán et al., 2009).

Recientemente, se ha reportado que el IHHNV se encuentra ampliamente distribuido en camarones silvestres y cultivados en el Este y Sureste de Asia (Tang et al., 2003; Primavera y Quintio, 2000), detectándose su presencia en costas de la India, causando una disminución en la tasa de crecimiento en el camarón tigre (*P. monodon*) (Rai et al., 2009). En Australia la presencia de este virus se reportó por vez primera en 1992 y recientemente un estudio

confirmó que continua presente en poblaciones de camarón (Saksmerprome et al., 2010; Vega-Heredia et al., 2011). En la tabla I se presenta una relación actualizada de la distribución geográfica del IHHNV (Vega-Heredia et al., 2011).

## **II.2. Infecciones Virales: Cambios en el Metabolismo Energético del Hospedero**

Durante una infección viral, cuando el genoma viral es replicado, los productos virales modulan la homeostasis celular del hospedero para que se favorezcan los procesos bioquímicos y moleculares para la biosíntesis del patógeno, y para satisfacer la demanda energética necesaria durante dicha biosíntesis (Chen et al., 2011). Algunos estudios han reportado el efecto que causan los virus en el metabolismo energético de sus hospederos. Shastri-Bhalla y Consigli (1994) reportaron que larvas de palomillas bandeadas (*Plodia interpunctella*) infectadas con el Virus de la Granulosis (VG), presentaron cambios significativos en cuanto a la composición de lípidos y ácidos grasos en comparación con organismos sanos. La proporción entre ácidos grasos saturados e insaturados de la composición fosfolipídica en larvas infectadas disminuyó 3.5 veces en comparación con los niveles observados en organismos no-infectados, de modo que la infección podría afectar la fluidez de la membrana celular del hospedero. Al mismo tiempo, en organismos no infectados la concentración de triacilgliceroles (TAGs) fue mayor, lo que podría implicar un posible aumento en la actividad de las lipasas en larvas infectadas.

### **II.2.1. Metabolitos plasmáticos en camarones peneidos**

La hemolinfa en los invertebrados es análoga en función a la sangre de los vertebrados, aunque a diferencia del sistema circulatorio de estos últimos, la circulación en los invertebrados es de tipo abierta; es decir, la hemolinfa, que no circula por capilares, se vacía en una cavidad abierta (el hemocele) y baña directamente los tejidos del organismo (Rendón y Balcazar, 2003). A pesar de esta diferencia, la hemolinfa cumple varias funciones similares a

Tabla I. Países en los cuales se reporta la presencia de diferentes aislados de IHHNV

<b>Continente</b>	<b>País</b>	<b>Referencia</b>
América	Argentina	Martorelli et al., et al 2010
	Perú	Alfaro et al., 2010
	Brasil	Dos Santos et al., 2009; Coehlo et al., 2009
	Venezuela	Boada et al., 2008
	Colombia	Tang et al., 2003
	México	Unzueta et al., 1998; Nunan et al., 2000; Tang y Lightner, 2001; Guzmán et al., 2009
	Ecuador	Jiménez et al., 1999; Nunan et al., 2000
	USA	Kalagayan et al., 1991; Owens et al., 1992; Nunan et al., 2000; Shike et al., 2000; Tang et al., 2007
	Panamá	Nunan et al., 2000; Tang y Lightner, 2001
	Belice	Tang et al., 2007
Asia	China	Yang et al., 2007; Zhang et al., 2007.
	India	Rai et al., 2009
	Filipinas	Belak et al., 1998; Nunan et al., 2000; Tang et al., 2003, 2007
	Tailandia	Chayaburakul et al., 2004; Tang et al., 2003, 2007
	Taiwán	Tang et al., 2003
	Brunei-Darussalam	Claydon et al., 2007
Oceanía	Australia	Krabsetsve, et al., 2004; Saksmerprome et al., 2010
África	Madagascar	Tang et al., 2003; Tang y Lightner, 2006
	Mozambique	Tang y Lightner, 2006
	Tanzania	Tang et al., 2003; Tang y Lightner, 2006
	Mauritius	Tang et al., 2003

las de los vertebrados, sirviendo como medio de transporte de diferentes metabolitos plasmáticos, como los son glucosa, proteínas totales, esteroides, lactato, acilglicéridos y lípidos totales (Lorenzon et al., 1999). Por esta razón, la composición bioquímica del plasma es un indicador del estado de salud, nutricional o metabólico de los organismos.

En los crustáceos, como en el caso de los vertebrados, existen evidencias de que ciertas enfermedades y toxinas pueden provocar cambios en las concentraciones de los metabolitos de este tejido (Noga, 2000). Algunos autores coinciden en la utilidad de la determinación de algunos iones, metabolitos y proteínas plasmáticas específicas para evaluar el estado de salud o detectar cambios fisiológicos, a través de las modificaciones que puedan observarse en los componentes de la hemolinfa del camarón (Vargas-Albores et al., 1991; Hernández-López et al., 2001; Sánchez et al., 2001). La evaluación de metabolitos plasmáticos, como glucosa, colesterol, acilglicéridos, nitritos, nitratos y proteína total, se considera como un indicador adecuado del estado nutricional en camarones peneidos (Cuzon et al., 1980; Stuck et al., 1996; Hall y Van Ham, 1998; Sánchez-Paz et al., 2007) y las variaciones de algunos de estos parámetros plasmáticos de *P. vannamei*, son utilizados como referencia en situaciones de estrés en los organismos (Rosas et al., 2002).

## **II.2.2. Metabolitos hepatopancreáticos en camarones peneidos**

El órgano hepatopancreático de los crustáceos se encuentra estrechamente relacionado en la secreción de enzimas digestivas, entre las que se incluyen proteasas, lipasas y carbohidrasas (Dall et al., 1990). Diferentes estudios realizados en animales vertebrados ubican a estas enzimas involucradas en actividades hepáticas, así mismo, existen reportes que evidencian la similitud de funciones metabólicas de dichas enzimas en organismos invertebrados. Por lo tanto, alteraciones en la cantidad de glucosa, triglicéridos y lípidos hepatopancreáticos, reflejan una degradación ó daño en este tejido; lo cual puede ser ocasionado por un patógeno viral (Li et al., 2008). Se ha reportado que *Baculovirus penaei* causa una disminución inmediata en el número y tamaño de gotas de lípidos en el hepatopáncreas de larvas y post-larvas del camarón blanco (*P. vannamei*) infectadas (Stuck y Overstreet, 1994); sin embargo,

se desconoce si esto puede tener algún efecto sobre el metabolismo de lípidos. Resultados similares fueron expuestos por Vogt (1992), en post-larvas del camarón tigre (*P. monodon*) infectado por el *Monodon baculovirus* (MBV), sugiriendo que estas reservas podrían ser utilizadas para proporcionar la energía necesaria para la replicación viral.

### III. JUSTIFICACIÓN

El camarón blanco del Pacífico (*P. vannamei*) ha sido ampliamente cultivado en México, especialmente en la región noroeste del país, generando con ello una importante derrama económica. Sin embargo, la industria camaronícola se ha visto afectada debido a la presencia de algunos patógenos causantes de enfermedades en los organismos cultivados, sobre todo de tipo viral. A pesar de esto, son pocos los estudios que se han desarrollado sobre los efectos fisiopatológicos del virus en su hospedero, por lo tanto, es evidente la necesidad de generar conocimiento científico acerca de este tipo de patógenos, con la finalidad de mantener la rentabilidad de esta industria.

Así, con base en lo anteriormente expuesto, es importante determinar el efecto de la infección con el Virus de la Necrosis Infecciosa Hipodérmica y Hematopoyética (IHHNV) en diferentes metabolitos plasmáticos y hepatopancreáticos del camarón blanco (*P. vannamei*), lo que permitiría evaluar el impacto fisiológico y metabólico de este patógeno sobre su hospedero.

#### **IV. HIPÓTESIS**

El Virus de la Necrosis Infecciosa Hipodérmica y Hematopoyética produce cambios en la concentración de metabolitos plasmáticos y hepatopancreáticos del camarón blanco *P. vannamei*, durante el desarrollo de la infección.

## **V. OBJETIVOS**

### **V.1. Objetivo General**

Evaluar los cambios en la concentración de metabolitos plasmáticos y hepatopancreáticos del camarón blanco *P. vannamei*, infectado con el Virus de la Necrosis Infecciosa Hipodérmica y Hematopoyética.

#### **V.1.1 Objetivos específicos**

Determinar los niveles de glucosa, lactato, proteínas solubles totales, lípidos totales, acilglicéridos y esteroles en plasma del camarón blanco *P. vannamei* durante el desarrollo de la infección ocasionada por el Virus de la Necrosis Infecciosa Hipodérmica y Hematopoyética.

Determinar los niveles de glucosa, glucógeno, lactato, proteínas solubles totales, lípidos totales, acilglicéridos y esteroles en hepatopáncreas del camarón blanco *P. vannamei* durante el desarrollo de la infección ocasionada por el Virus de la Necrosis Infecciosa Hipodérmica y Hematopoyética.

Evaluar el efecto de la infección con el Virus de la Necrosis Infecciosa Hipodérmica y Hematopoyética sobre el índice hepatosomático del camarón blanco *P. vannamei*.



## VI. METODOLOGÍA

### VI.1. Selección de Organismos Libres de IHHNV

Los organismos de camarón blanco del Pacífico (*P. vannamei*) empleados en este trabajo, , fueron donados por una Unidad de Producción Acuícola (UPA) del Estado de Sonora, los cuales contaban con un peso promedio de 26 g. Los organismos se transportaron al Laboratorio de Análisis Integral Acuícola (LAIA), del CIBNOR Unidad Sonora, Campus Hermosillo, donde se aclimataron y mantuvieron en condiciones controladas, durante una semana en agua marina a 35 ppm de salinidad, temperatura 28 °C, aireación a saturación de oxígeno en contenedores plásticos con capacidad de 3,000 L. Los organismos se alimentaron ad libitum dos veces al día con alimento artificial (Camaronina 35<sup>®</sup>, Purina).

Una vez aclimatados, se procedió a diagnosticar individualmente, a los organismos para detectar y diagnosticar la presencia de IHHNV. Así, a un lote de 150 organismos de forma individual se extrajeron 400 µL de hemolinfa de la base del quinto par de pereopodos con una jeringa desechable de 1 mL con aguja de 27g x 13 mm (BD PLASTIPAC<sup>®</sup>) conteniendo 400 µL de solución anticoagulante (450 mM NaCl, 10 mM KCl, 10mM Na<sub>2</sub>-EDTA, 10 mM HEPES, pH 7.3) (Vargas-Albores et al., 1993). Las muestras de hemolinfa se centrifugaron a 400 x g durante 15 min, y posteriormente se retiró cuidadosamente el plasma. Al paquete de hemocitos obtenidos se le añadieron 150 µL de solución de lisis (NaCl 100 mM, Tris 50 mM, EDTA 100 mM y SDS 1%) y se homogeneizaron utilizando pistilos de teflón (Kontes). A continuación, se extrajo ADN total, mediante el uso de una matriz de sílica (Glass milk, MP biomedical), para lo cual se transfirieron 50 µL del lisado de hemocitos a tubos Eppendorf de 1.7 mL nuevos y estériles conteniendo 150 µL de la matriz. Posteriormente las muestras se incubaron por 5 min a temperatura ambiente y a continuación se centrifugaron a 800 x g durante 5 min El sobrenadante obtenido se retiró por decantación y se agregaron 500 µL de solución de lavado (50% TBE buffer: 130 mM Tris, 45 mM ácido bórico, y 2.5 mM EDTA, pH 8.0, 50% etanol). El precipitado se resuspendió por agitación suave y posteriormente las muestras se centrifugaron a 800 x g por 3 min, repitiendo una vez más este

proceso de lavado. Finalmente, la solución de lavado se retiró por decantación y cada muestra se secó durante 5 min por inversión de los tubos sobre papel secante. Una vez que las muestras se secaron, se les adicionaron 50  $\mu$ L de agua libre de nucleasas y se centrifugaron a 800 x g 5 min, después de lo cual se recuperaron 30  $\mu$ L de sobrenadante.

Para el diagnóstico de la presencia de IHNV se amplificó individualmente, por PCR, un fragmento de 309 pb de acuerdo a la metodología descrita por Tang et al., (2007) empleando los primers 309F (5'-TCC-AAC-ACT-TAG-TCA-AAA-CCA-A-3') y 309R (5'-TGT-CTG-CTA-CGA-TGA-TTA-TCC-A-3'). Las condiciones de amplificación utilizadas fueron las siguientes: ciclo inicial de desnaturalización de 95 °C por 5 min, seguido de 35 ciclos a 95 °C 30 s, 55 °C 30 s y 72 °C 60 s y un paso de extensión final de 72 °C por 7 min El volumen final de las reacciones de amplificación fue de 12.5  $\mu$ L, conteniendo 10.5  $\mu$ L Platinum PCR SuperMix (Invitrogen, EUA), 0.5  $\mu$ L de primer 309F, 0.5  $\mu$ L de primer 309R y 1  $\mu$ L de DNA. Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un termociclador TECHNE TC-412. Los productos de PCR se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa 2% (Invitrogen) y para su visualización y análisis se utilizaron un transiluminador de luz ultravioleta (UVP®) y un sistema de documentación de imágenes digital (Kodak Imaging System).

Los organismos que resultaron negativos al primer diagnóstico de IHNV, se sometieron a un segundo diagnóstico 15 días después para detectar el virus. Esto se debe a que el tiempo de replicación viral característico en los miembros de la familia Parvoviridae es de aproximadamente 6-14 días (Anderson et al., 1985; Schwarz et al., 1989; Zakrzewska et al., 2005; Montgomery et al., 2007); y así, los organismos que resultaron negativos en el primer diagnóstico pudieran haberse encontrado en una fase temprana de infección con un bajo número de copias virales de modo que la carga viral sería difícilmente detectable. Considerando esto, se realizó un segundo diagnóstico en el lote de organismos negativos 15 días después del primer análisis. Como resultado, se encontraron 72 organismos libres de IHNV, mismos que se distribuyeron aleatoriamente en dos tratamientos: 36 camarones que no fueron inyectados con inóculo viral, sirviendo como referencia de organismos sanos (grupo control), y 36 camarones experimentalmente inoculados con IHNV. Los organismos se dividieron en grupos de 6 y se transfirieron a acuarios plásticos con volumen de agua marina

de 40 L equipados con un sistema de filtrado a base de carbón activado de capacidad filtradora 240 L/h. Las condiciones durante el desarrollo del ensayo fueron las siguientes: 80% recambio de agua diario mediante sifoneo por gravedad, salinidad de 35 ppm, temperatura 28 °C, alimentación 2 veces al día.

## **VI.2. Preparación del Inóculo Viral**

Para la preparación del inóculo viral infectivo con carga viral conocida se utilizó la metodología descrita por Escobedo-Bonilla (2005). Un camarón cuyo diagnóstico por PCR resultó positivo a IHHNV se sacrificó por decapitación. El músculo abdominal se pesó y se transfirió a un vaso de licuadora de 250 mL en el que se agregaron 6 volúmenes de solución salina (SSF) 0.9% PiSA<sup>®</sup> por volumen de músculo (p/v). Posteriormente el tejido se homogeneizó en una licuadora mediante 10 pulsos de 10 s a máxima velocidad con pausas de 30 s, durante las cuales el recipiente con la suspensión celular se transfirió a hielo. A continuación, la muestra se transfirió a tubos Eppendorf de 1.7 mL y se centrifugó a 3,000 x g durante 20 min a 4 °C. Una vez finalizada la centrifugación, el sobrenadante se transfirió a tubos Eppendorf nuevos de 1.7 mL y el clarificado se centrifugó una vez más a 13,000 x g por 20 min a 4 °C. El sobrenadante se recuperó con una jeringa de 10 mL (BD PLASTIPAC<sup>®</sup>) y se filtró a través de una membrana (Acrodisc) de 20 µm. El inóculo obtenido se recolectó en tubo FALCON<sup>®</sup> de 15 mL y se almacenó a -80 °C hasta su uso. Finalmente, se tomó una alícuota del inóculo y se cuantificó la carga viral mediante una curva estándar utilizando IQ REAL<sup>™</sup> IHHNV Quantitative System (GeneReach Biotechnology Corp).

## **VI.3. Inoculación Experimental**

A cada uno de los organismos sometidos al tratamiento infectado, se le inyectó por vía intramuscular con una jeringa de 1 mL una dosis de 100 µL de inóculo con una carga viral de

$1 \times 10^4$  copias/ $\mu\text{L}$  en el tercer somita abdominal. A los organismos del grupo control se les inyectaron  $100 \mu\text{L}$  de SSF.

#### **VI.4. Obtención de Muestras**

Los muestreos de los organismos se realizaron a los 0, 7, 14 y 21 días post-inoculación (dpi) y se destinó un acuario por tratamiento para cada tiempo. Dos horas antes de cada toma de muestra, a los organismos de cada acuario se les suministró alimento peletizado (Camaronina 35<sup>®</sup>, Purina), ad libitum, mismo que fue retirando por sifoneo después de 1 hora de haber sido proporcionado.

Los camarones se extrajeron individual y cuidadosamente, de cada acuario utilizando una red y se colocaron en cubetas con agua proveniente del mismo recipiente, con la intención de disminuir los factores de estrés que pudieran afectar la concentración de los diferentes metabolitos. Se determinó el peso de cada organismo y a cada camarón se le extrajeron  $400 \mu\text{L}$  de hemolinfa con una jeringa de  $1 \text{ mL}$  conteniendo  $400 \mu\text{L}$  de solución anticoagulante (previamente mencionada en la sección de selección de organismos) y la solución obtenida se transfirió a tubos Eppendorf de  $1.7 \text{ mL}$ , donde las muestras se centrifugaron a  $400 \times g$  por  $15 \text{ min}$ . El plasma así obtenido se depositó en tubo Eppendorf estéril para el posterior análisis de metabolitos plasmáticos. Del paquete de hemocitos obtenido, se extrajo ADN de acuerdo con el protocolo anteriormente descrito para realizar el PCR como prueba diagnóstica de infección de IHHNV. Así mismo, el hepatopáncreas se disectó, se pesó y se dividió en dos partes aproximadamente iguales, a las que se les determinó su peso y una porción se depositó en tubo Eppendorf conteniendo TRIzol LB (Invitrogen) y se almacenó a  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  y otra porción se transfirió a otro tubo Eppendorf y se almacenó a  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  hasta su análisis.

## VI.5. Análisis Bioquímico de Metabolitos Plasmáticos

Para la determinación de la concentración de glucosa, lactato, proteínas totales, lípidos totales, esteroides y acilglicéridos se utilizaron kits comerciales para diagnóstico médico (RANDOX), según las especificaciones del fabricante. Las reacciones para la cuantificación de cada uno de los metabolitos se realizaron por triplicado transfiriendo 10  $\mu\text{L}$  de cada muestra al fondo del pozo de una microplaca de 96 pozos de 300  $\mu\text{L}$  (Nunc<sup>TM</sup>), y se agregaron 250  $\mu\text{L}$  del reactivo correspondiente. A continuación, las muestras se incubaron durante 15 min a temperatura ambiente y posteriormente se analizaron espectrofotométricamente a la longitud de onda recomendada para cada metabolito (Tabla II) en un lector de microplacas Synergy (Bio-Tek Instruments) de acuerdo a la metodología propuesta por Sánchez-Paz et al., (2007).

La determinación de la concentración de lípidos totales se realizó mediante la siguiente metodología: se transfirieron 10  $\mu\text{L}$  de cada muestra (por triplicado) en tubo tipo Eppendorf de 0.2  $\mu\text{L}$  y se agregaron 100  $\mu\text{L}$  de ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ). Las muestras se incubaron a 95 °C por 1 h en un termociclador (TECHNE TC-412) y posteriormente se mantuvieron a 5 °C durante 5 min. Finalmente, 10  $\mu\text{L}$  de cada muestra se transfirieron a una microplaca y se les adicionaron 150  $\mu\text{L}$  de reactivo (RANDOX), y se incubaron durante 20 min a temperatura ambiente. Una vez transcurrido este periodo, se determinó la absorbancia de cada muestra espectrofotométricamente.

Tabla II. Relación de longitudes de onda (nm) y coloración resultante de la reacción colorimétrica para la evaluación de la concentración de cada metabolito.

<b>Metabolito</b>	<b>Longitud de onda (nm)</b>	<b>Coloración resultante</b>
Glucosa	500	Rojo-Violeta
Lactato	505	Violeta
Acilglicéridos	500	Violeta
Esteroides	500	Rosa
Proteínas Totales	550	Violeta
Lípidos totales	540	Rosa

Para la evaluación de la concentración de los metabolitos hepatopancreáticos se colocó una porción de tejido en un volumen de solución A (100 mM Buffer PBS, pH 7.2, 0.5 mM EDTA) y dos volúmenes (p/v) de cloroformo-metanol (2:2), para finalmente centrifugar a 15,000 x g durante 15 min. La fase acuosa se utilizó para cuantificar los niveles de glucosa, glucógeno y proteína total. La fase de solventes conteniendo el cloroformo fue recolectada y secada al aire durante 12 h en obscuridad total a temperatura ambiente (25 °C), posteriormente homogeneizada en volumen correspondiente de agua destilada para la cuantificación de lípidos totales, acilglicéridos y esteroides.

La glucosa, proteínas totales, acilglicéridos y esteroides se determinaron inmediatamente después de recolectar las respectivas fases donde se contenían; en cambio, para obtener la concentración de lípidos totales se implementó la metodología anteriormente mencionada para lípidos plasmáticos. El nivel de glucógeno fue medido al cuantificar las unidades de glucosa obtenidas después de una hidrólisis ácida, es decir, de cada muestra se hizo un homogeneizado (1:1) de hepatopáncreas y un volumen de agua destilada, posteriormente se agregó HCl 2M en relación 2:1 a la mezcla anterior y se mantuvo a 95 °C durante 2 h, finalmente se neutralizó (pH 7.0) con NaOH 2M y se hizo la lectura de la absorbancia correspondiente para glucosa.

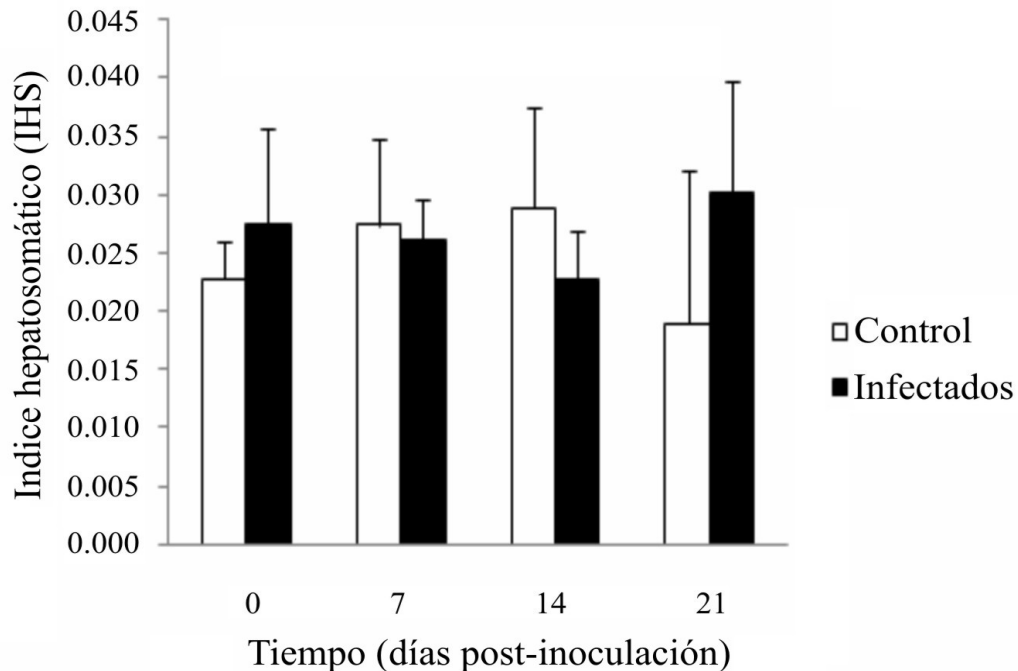
## **VI.6. Análisis Estadístico**

Se realizó un análisis de varianza de una vía de los datos de concentración de cada metabolito en los diferentes tratamientos de cada tejido, para determinar la existencia de posibles efectos de los tratamientos. Posteriormente se realizó una prueba de contraste a posteriori (post-hoc) para discriminación de medias (prueba de honestidad de Tukey, HSD). Los datos con interacciones estadísticamente significativas fueron considerados para  $P < 0.05$ . El análisis estadístico se realizó utilizando el programa computacional SigmaPlot para Windows v.11.0 (Systat Software, Inc.)

## VII. RESULTADOS

### VII.1. Índice Hepatosomático (IHS)

En la Figura 1 se puede observar el comportamiento del índice hepatosomático a lo largo del estudio. En general, los valores obtenidos tanto en los organismos del grupo control como en los infectados con IHHNV permanecieron relativamente estables, salvo a los 21 dpi, cuando se observa una diferencia mínima entre ambos grupos, sin llegar a ser estadísticamente diferente.

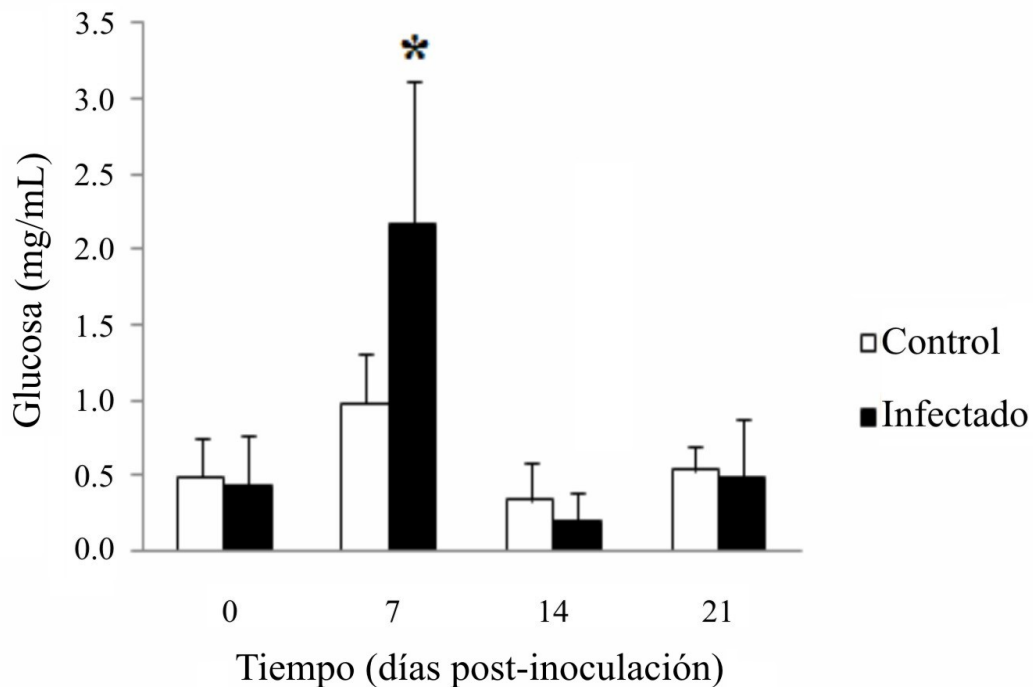


**Figura 1.** Índice hepatosomático (IHS). Se muestran los resultados de los organismos del tratamiento control y de los organismos infectados experimentalmente a diferentes días post-inoculación (dpi). Durante el estudio no se observaron diferencias estadísticas significativas en este parámetro entre los tratamientos ( $p > 0.294$ ). Los valores representan la media  $\pm$  DS.

## VII.2. Metabolitos Plasmáticos

### VII.2.1. Concentración de glucosa

Al evaluar la concentración de glucosa plasmática en organismos infectados con IHHNV se observó un incremento significativo ( $p= 0.002$ ) a los 7 dpi, en comparación con los valores observados en organismos no infectados. Es evidente que en este tiempo el grupo de organismos infectados presentó una concentración mayor (~2 veces) a la observada en el grupo control (Figura 2), y posteriormente la concentración de glucosa disminuyó drásticamente (aproximadamente 90%), recuperando los niveles iniciales a los 21 dpi. El tratamiento control se mantuvo relativamente estable durante el transcurso del estudio.

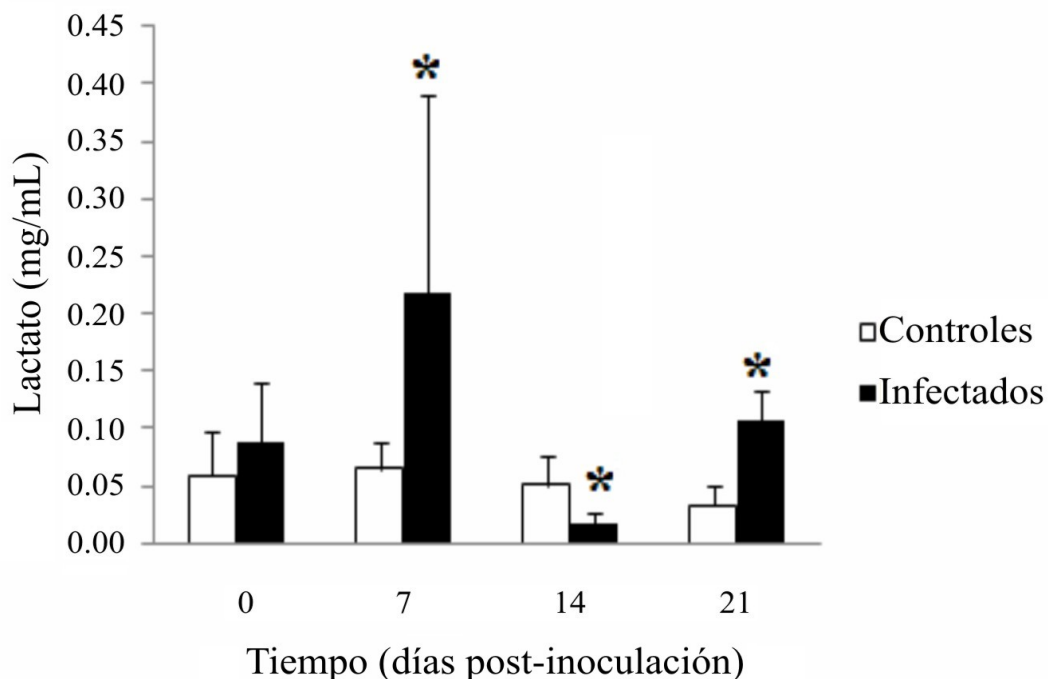


**Figura 2.** Concentración de glucosa (mg/mL) en plasma de camarón. Se muestran los resultados de los organismos del tratamiento control y de los organismos infectados experimentalmente a diferentes días post-inoculación (dpi). Los valores representan la media  $\pm$  DS. \*: Valor estadísticamente diferente ( $p= 0.002$ ).



### VII.2.2. Concentración de lactato

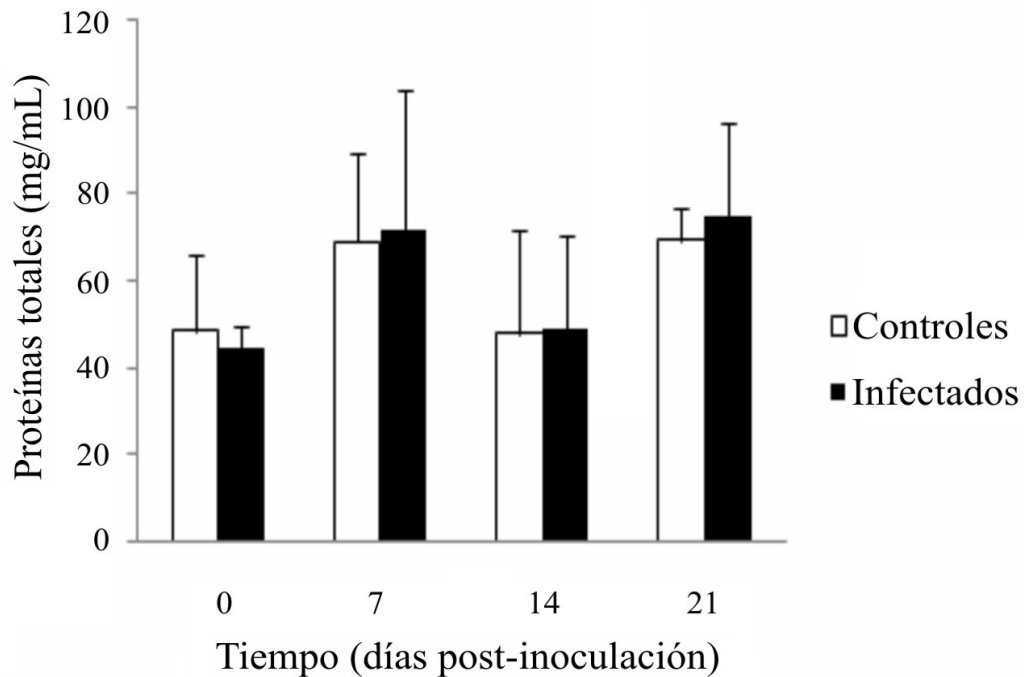
La concentración de este metabolito en plasma mostró variaciones en los organismos infectados con IHNV (Figura 3). La concentración de lactato se incrementó significativamente a los 7 dpi, alcanzando los valores más altos (3.3 veces mayor que la concentración observada en el grupo control); sin embargo, a los 14 dpi se observó una clara disminución de la concentración de lactato plasmático en los organismos infectados con el virus. Finalmente, a los 21 dpi la concentración de lactato recupera los niveles observados al inicio del ensayo. Los organismos del grupo control mantuvieron valores promedio relativamente estables a lo largo del estudio.



**Figura 3.** Concentración de lactato (mg/mL) en plasma de camarón. Se muestran el tratamiento control y tratamiento infectado a diferentes días post-inoculación (dpi). Los valores representan la media  $\pm$  DS. (\*): Valor con diferencia significativa ( $p \leq 0.012$ ).

### VII.2.3. Concentración de proteínas totales

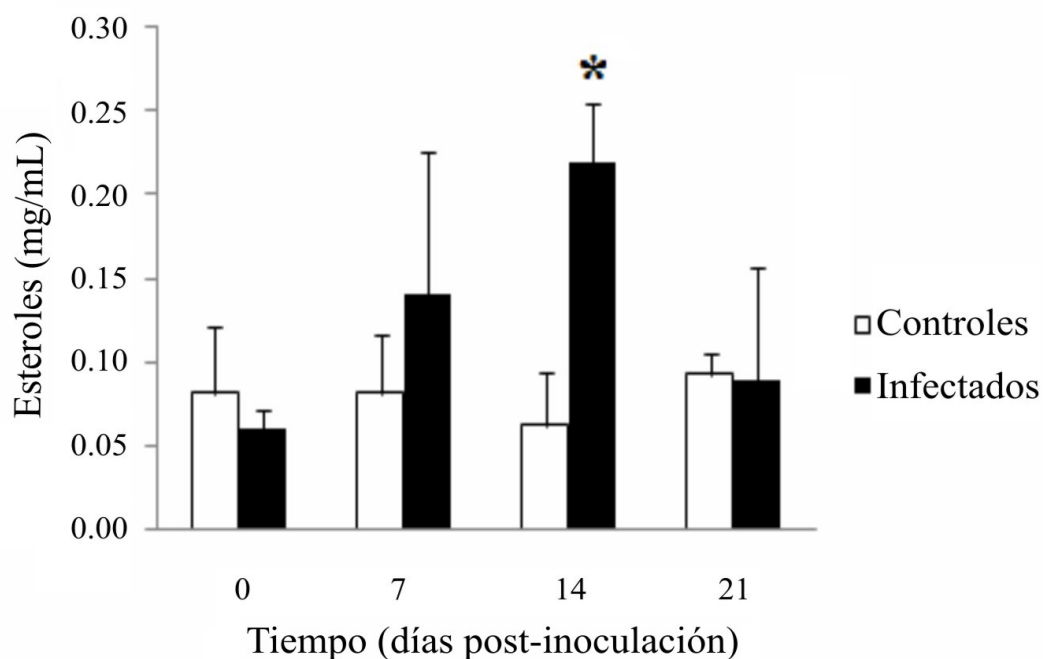
Durante este estudio no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la concentración de proteínas totales en plasma ( $p \geq 0.05$ ) entre los organismos infectados y los organismos del grupo control (Figura 4). Se pueden observar algunas variaciones temporales, sin embargo el comportamiento observado en los niveles de proteínas totales en plasma entre ambos grupos fue muy similar.



**Figura 4.** Concentración de proteínas totales (mg/mL) en plasma de camarón. Se muestran el tratamiento control y tratamiento infectado a diferentes días post-inoculación (dpi). Los valores representan la media  $\pm$  DS.

#### VII.2.4. Concentración de esteroides

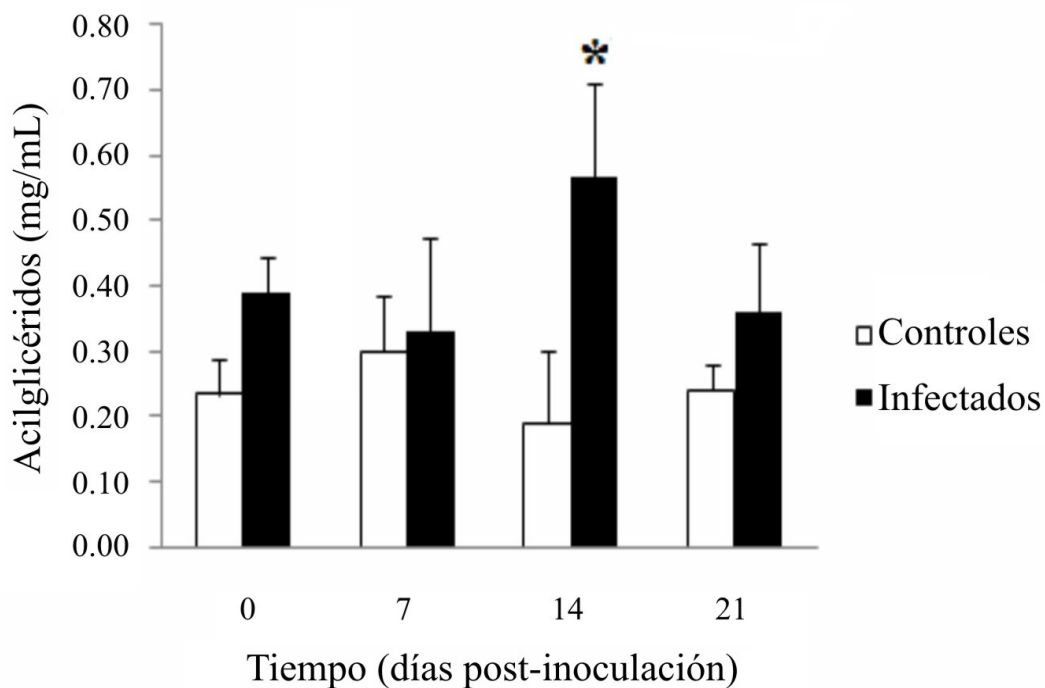
La concentración de esteroides en plasma de los organismos no infectados se mantuvo relativamente estable. Sin embargo, en los organismos infectados se observan variaciones estadísticamente significativas, con un incremento muy notable a los 7 y 14 dpi ( $p=0.001$ ). Posteriormente, se observó una disminución en los niveles de colesterol en plasma de organismos infectados con IHHNV, de modo que en este tiempo se recuperaron los niveles observados al inicio del estudio (Figura 5).



**Figura 5.** Concentración de esteroides (mg/mL) en plasma camarón. Se muestran el tratamiento control y tratamiento infectado a diferentes días post-inoculación (dpi). Los valores representan la media  $\pm$  DS. (\*): Valor con diferencia significativa ó estadísticamente diferente ( $p=0.001$ ).

### VII.2.5. Concentración de acilglicéridos

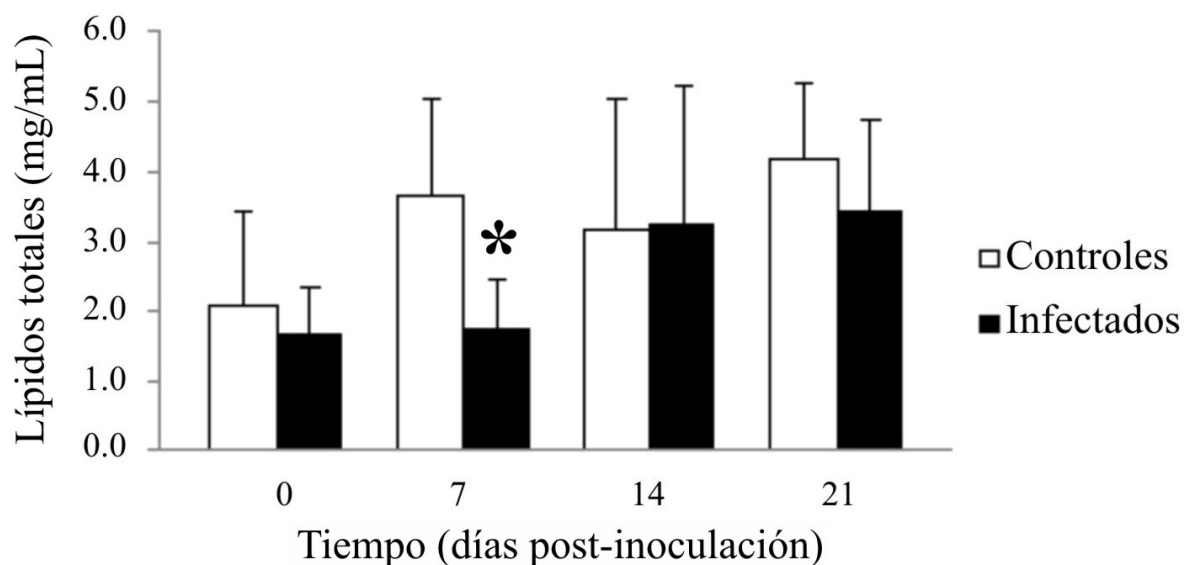
Como se puede observar en la figura 6, la concentración de acilglicéridos plasmáticos siempre fue más elevada en los organismos infectados que en los organismos del grupo control. Sin embargo, se puede observar un incremento notorio a los 14 dpi ( $P=0.001$ ) cuando la concentración de este metabolito fue 2.9 veces mayor que en los organismos no infectados. Finalmente, a partir del día 14 post-inoculación se observó una disminución en los niveles de acilglicéridos en plasma, de forma tal que los niveles recuperaron su valor inicial a los 21 dpi. Por otro lado, si bien se pueden observar ligeras variaciones en cuanto a la concentración de acilglicéridos plasmáticos en los organismos del grupo control, se mantuvo una tendencia relativamente estable durante el bioensayo.



**Figura 6.** Concentración de acilglicéridos (mg/mL) en plasma de camarón. Se muestran el tratamiento control y tratamiento infectado a diferentes días post-inoculación (dpi). Los valores representan la media  $\pm$  DS. (\*): Valor con diferencia significativa ( $p \leq 0.005$ ).

### VII.2.6. Concentración de lípidos totales

Los resultados obtenidos sobre la concentración de lípidos totales en plasma mostraron diferencias significativas entre los organismos infectados y los del grupo control durante los primeros 7 días de estudio ( $p=0.003$ ) (Figura 7). Cabe recalcar que, con excepción del tiempo 14, donde los organismos infectados y los del grupo control presentaron valores similares en cuanto a la concentración de lípidos plasmáticos, en los tiempos restantes, los organismos no infectados mantuvieron niveles superiores de lípidos en plasma. Así mismo, la concentración de lípidos totales en ambos grupos, organismos infectados y no infectados, mostró una tendencia a incrementarse durante el ensayo.

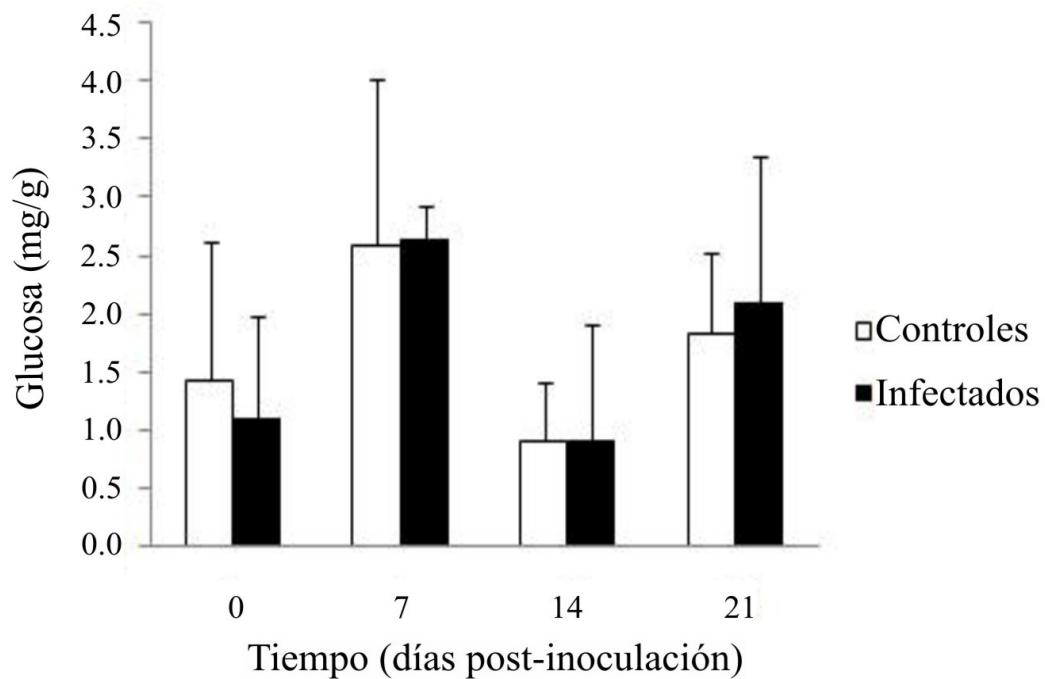


**Figura 7** Concentración de lípidos totales (mg/mL) en plasma de camarón. Se muestran el tratamiento control y tratamiento infectado a diferentes días post-inoculación (dpi). Los valores representan la media  $\pm$  DS. (\*): Valor con diferencia significativa ( $p=0.003$ ).

### VII.3. Metabolitos Hepatopancreáticos

#### VII.3.1. Concentración de glucosa

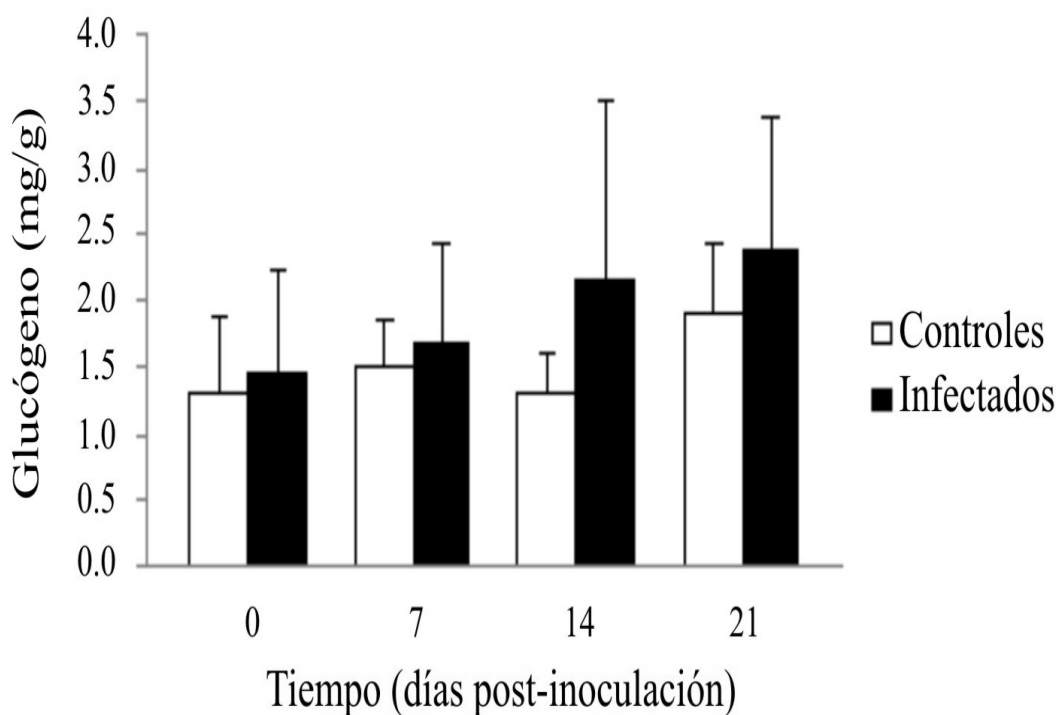
En el presente estudio no se observaron cambios estadísticamente significativos en la concentración de glucosa en hepatopáncreas ( $p \geq 0.05$ ) (Figura 8).



**Figura 8.** Concentración de glucosa (mg/g) en hepatopáncreas de camarón. Se muestran el tratamiento control y tratamiento infectado a diferentes días post-inoculación (dpi). Los valores representan la media  $\pm$  DS.

### VII.3.2. Concentración de glucógeno

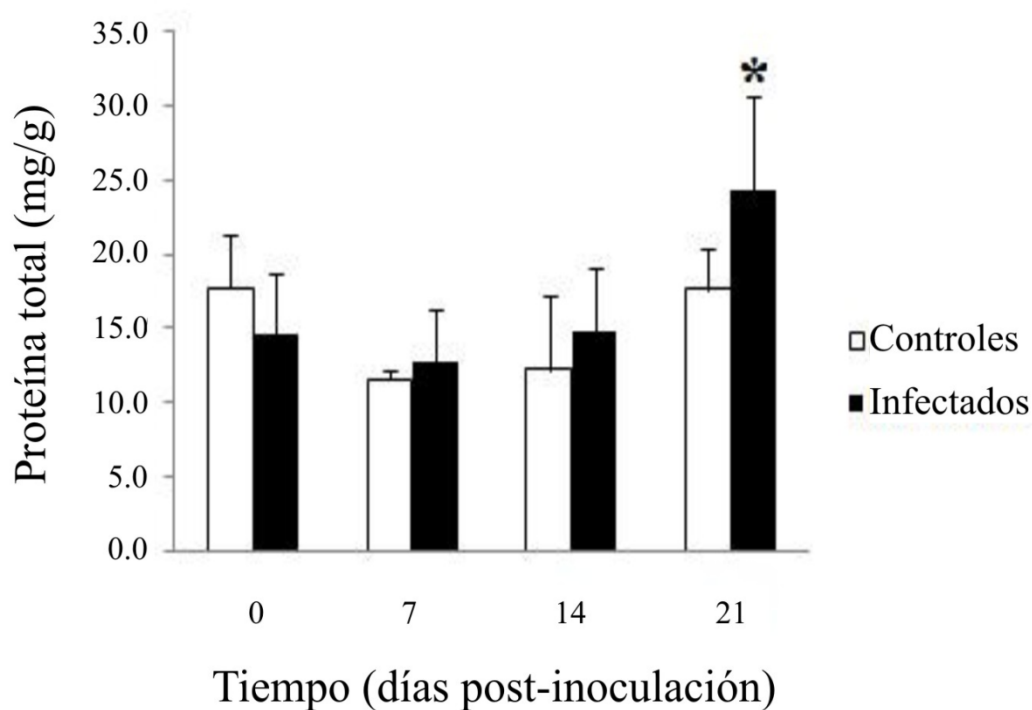
Si bien no se aprecian diferencias estadísticamente significativas en la concentración de glucógeno en hepatopáncreas entre los dos tratamientos, se observó una tendencia hacia una acumulación gradual y constante de glucógeno en el hepatopáncreas de los organismos infectados con el virus (Figura 9), de modo que al final del estudio los organismos infectados con IHHNV presentaron un nivel de glucógeno casi 1.5 veces mayor que aquellos recién infectados (0 dpi). Así mismo, se observa una relativa estabilidad en la concentración de glucógeno hepatopancreático de los organismos control al mantenerse en un intervalo de 1.3-1.9 mg/g.



**Figura 9.** Concentración de glucógeno (mg/g) en hepatopáncreas de camarón. Se muestran el tratamiento control y tratamiento infectado a diferentes días post-inoculación (dpi). Los valores representan la media  $\pm$  DS.

### VII.3.3. Concentración de proteínas totales

La concentración de proteínas totales en hepatopáncreas se mantuvo estable durante la mayor parte del estudio. Sin embargo, a los 21 dpi, se observó una concentración 1.5 veces superior a la obtenida en los muestreos anteriores ( $p= 0.008$ ) (Figura 10). Cabe mencionar que al comparar la concentración entre los organismos infectados y los organismos del grupo control, solamente al inicio del estudio se observaron valores en la concentración de proteínas totales mayores en los organismos no infectados, ya que a partir de los 7 dpi la concentración de proteína hepatopancreática fue superior en los organismos infectados.

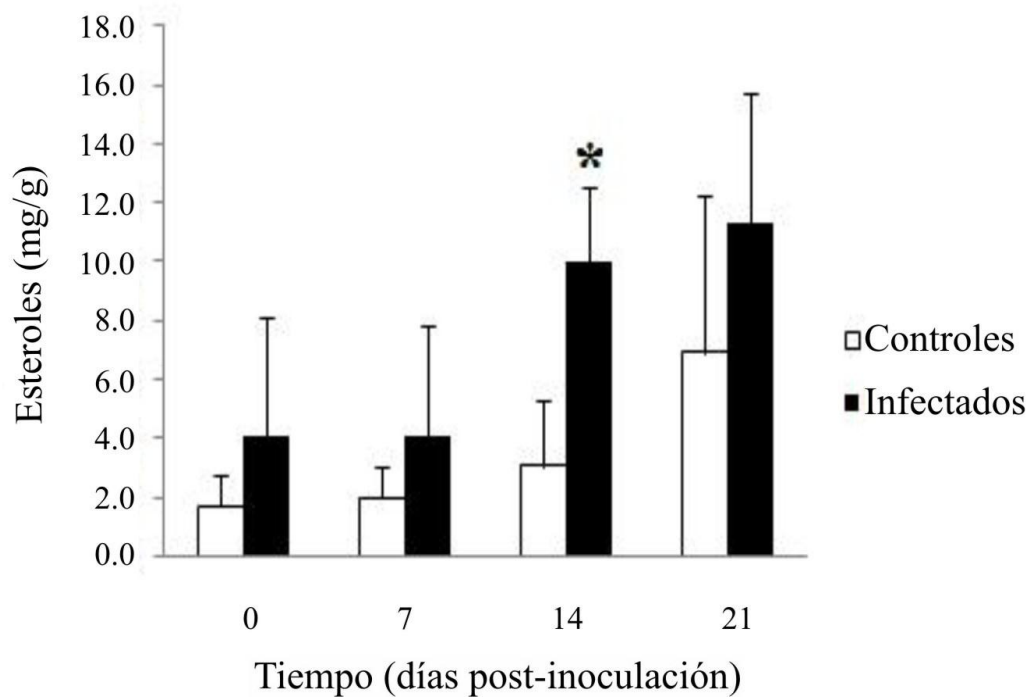


**Figura 10.** Concentración de proteína total (mg/g) en hepatopáncreas de camarón. Se muestran el tratamiento control y tratamiento infectado a diferentes días post-inoculación (dpi). Los valores encontrados (\*): Valor con diferencia significativa ( $p= 0.008$ ). Los valores representan la media  $\pm$  DS.



### VII.3.4. Concentración de esteroides

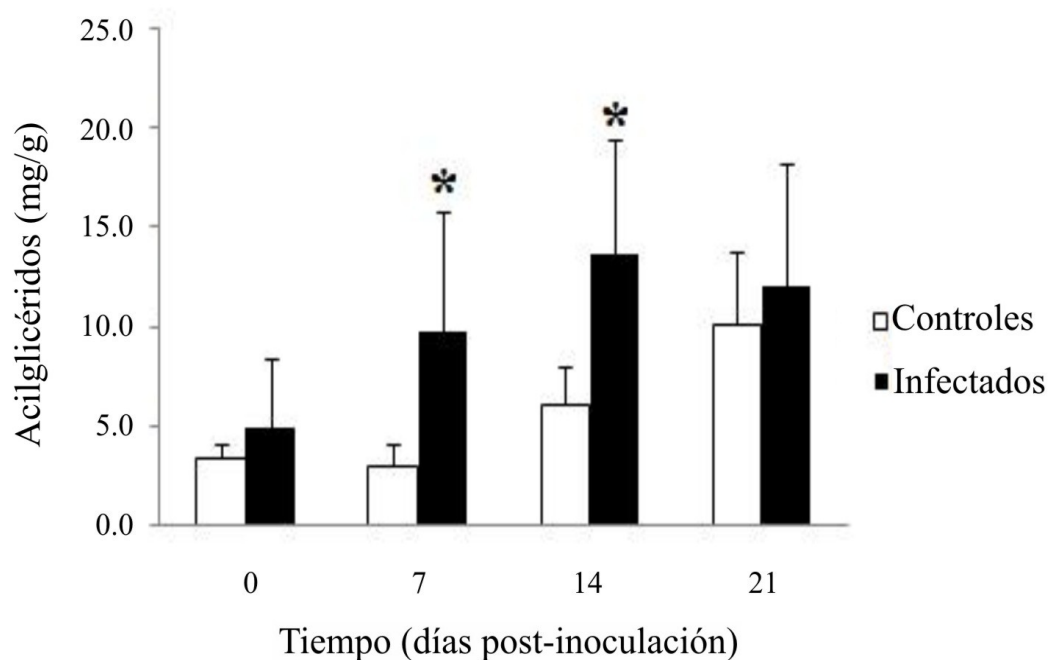
Como se puede observar en la figura 11, a los 14 dpi existen diferencias estadísticamente significativas ( $p=0.001$ ) en la concentración de esteroides en el hepatopáncreas entre organismos infectados experimentalmente con IHHNV y organismos sanos. Cabe señalar que la concentración de este metabolito siempre fue superior en organismos infectados, especialmente a los 14 dpi, cuando se observó un incremento de 2.5 veces en relación a la concentración observada a los 0 y 7 dpi.



**Figura 11.** Concentración de esteroides (mg/g) en hepatopáncreas de camarón. Se muestran los cambios en la concentración de esteroides en los organismos del tratamiento control y en los infectados en diferentes días post-inoculación (dpi). Los valores representan la media  $\pm$  DS. (\*): Valor con diferencia significativa ( $p= 0.001$ )

### VII.3.5. Concentración de acilglicéridos

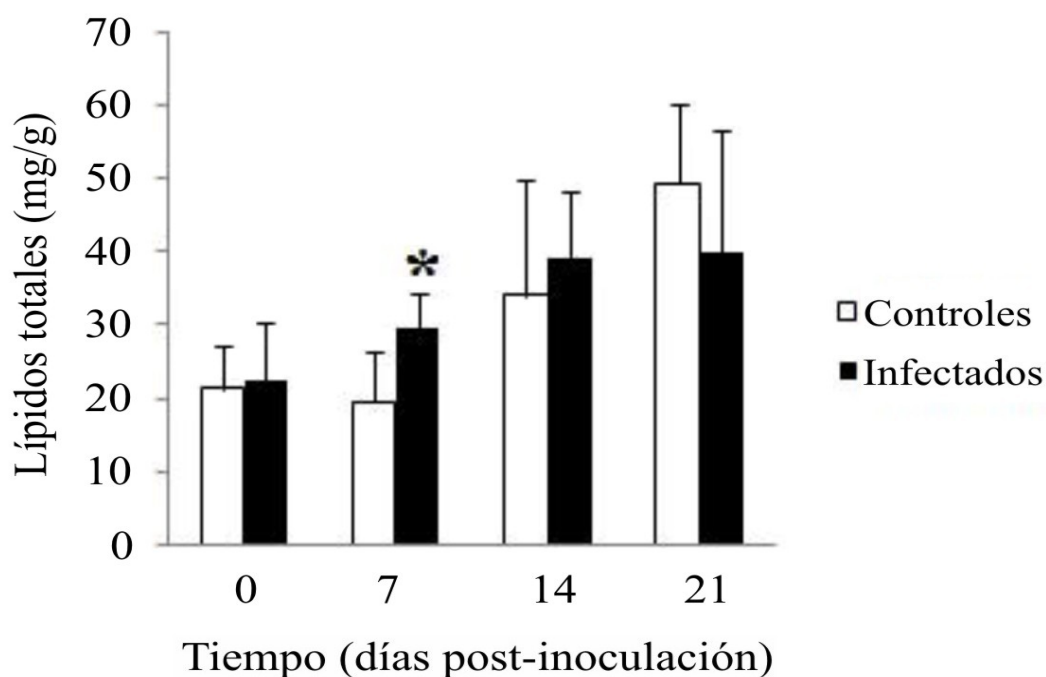
Respecto a los resultados obtenidos al cuantificar la concentración de acilglicéridos en hepatopáncreas, con el transcurso del tiempo se observó un incremento tanto en los organismos infectados como en los sanos, aunque el incremento fue mayor (casi 3 veces) en los primeros que en los últimos (casi 2 veces). En el caso de los organismos infectados ocurrieron incrementos significativos tanto a los 7 como a los 14 dpi ( $p \leq 0.0130$ ) (Figura 12). Por su parte, en el grupo control los niveles se mantuvieron estables desde el inicio del estudio hasta los 14 dpi y posteriormente (21 dpi) este valor se incrementó. Vale la pena mencionar el hecho de que a partir de los 7 dpi la concentración de acilglicéridos hepatopancreáticos se incrementa al doble en los camarones infectados en comparación con los organismos del grupo control, manteniéndose esta relación hasta los 14 dpi, y posteriormente (21 dpi) la diferencia entre ambos grupos se redujo sustancialmente.



**Figura 12.** Concentración de acilglicéridos (mg/g) en hepatopáncreas de camarón. Se muestran el tratamiento control y tratamiento infectado a diferentes días post-inoculación (dpi). Los valores representan la media  $\pm$  DS. (\*): Valores con diferencia significativa ( $p \leq 0.0130$ ).

### VII.3.6. Concentración de lípidos totales

Como se puede observar en la figura 13, la concentración de los lípidos totales en hepatopáncreas, se incrementó tanto en los organismos infectados como en los sanos, durante el transcurso del estudio. Únicamente se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos a los 7 dpi ( $p \leq 0.008$ ). Un hecho que se debe recalcar, es que desde el inicio del estudio hasta los 14 dpi la concentración de lípidos en los organismos infectados fue mayor en comparación con los organismos del grupo control, y finalmente, a los 21 dpi la concentración de lípidos totales en hepatopáncreas rebasó a la observada en camarones infectados y duplicó los valores iniciales.



**Figura 13.** Concentración de Lípidos totales (mg/g) en hepatopáncreas de camarones no infectados y camarones infectados (IHHNV) muestreados a diferentes días post-inoculación (dpi). Los valores representan la media  $\pm$  DS. (\*): Valor con diferencia significativa ( $p \leq 0.008$ ).

## VIII. DISCUSIÓN

A lo largo de su historia evolutiva los virus han desarrollado interacciones muy complejas y dinámicas con sus hospederos (Heaton y Randall, 2011). Estas entidades genéticamente programadas para sobrevivir y replicarse han implementado diversos mecanismos de infección, proliferación y persistencia en las células huésped (Hilleman, 2004). Algunos han optado por estrategias en donde la velocidad de replicación puede no ser la mejor opción a considerarse, ya que esta podría resultar en la eliminación del hospedero (Danilova, 2006), pero son capaces de modificar el metabolismo de su hospedero (Chen et al., 2011). Entender los efectos metabólicos que acontecen en el hospedero durante el proceso infeccioso permitirá entender de manera integral la fisiopatología de la enfermedad.

Si bien se reconoce que la glucosa es el carbohidrato más abundante entre los que constituyen la hemolinfa de los crustáceos (Telford 1968a; Hohnke y Scheer, 1970), su concentración varía de manera importante entre especies e individuos (Telford 1968b; Chang y O'Connor, 1983). Estudios recientes demuestran que la glucosa en hemolinfa de crustáceos es un indicador del estado fisiológico, nutricional o de estrés de los organismos (Rosas, et al., 2002; Lorenzon, 2004). En este estudio se observó un incremento significativo (~2 veces) en los valores de glucosa plasmática a los 7 dpi en organismos experimentalmente expuestos al IHHNV. Sin embargo, a los 14 dpi la concentración de glucosa plasmática disminuyó (~90%), alcanzando valores similares a los observados en organismos no infectados. Algunos reportes han demostrado que los niveles de glucosa plasmática se incrementan en organismos estresados o infectados, como una respuesta a ambas condiciones (Hall y van Ham, 1998, Racotta y Palacios, 1998). Los resultados obtenidos en este estudio coinciden con los reportados en el camarón *P. indicus* infectados con WSSV, en donde se observó un rápido incremento en los niveles de glucosa plasmática (Yoganandhan et al., 2003). De igual forma, se ha reportado que la infección experimental de la oruga *Pseudoplusia includens* con el bracovirus de *Microplitis demolitor* (MdBV) causa un estado hiperglucémico persistente, de modo que ocurren alteraciones metabólicas y fisiológicas que evitan que el hospedero alcance un estado de madurez, y que pueden incluir la supresión de la respuesta inmune, esencial para la sobrevivencia del organismo (Pruijssers et al., 2009). Otros reportes mencionan que 24

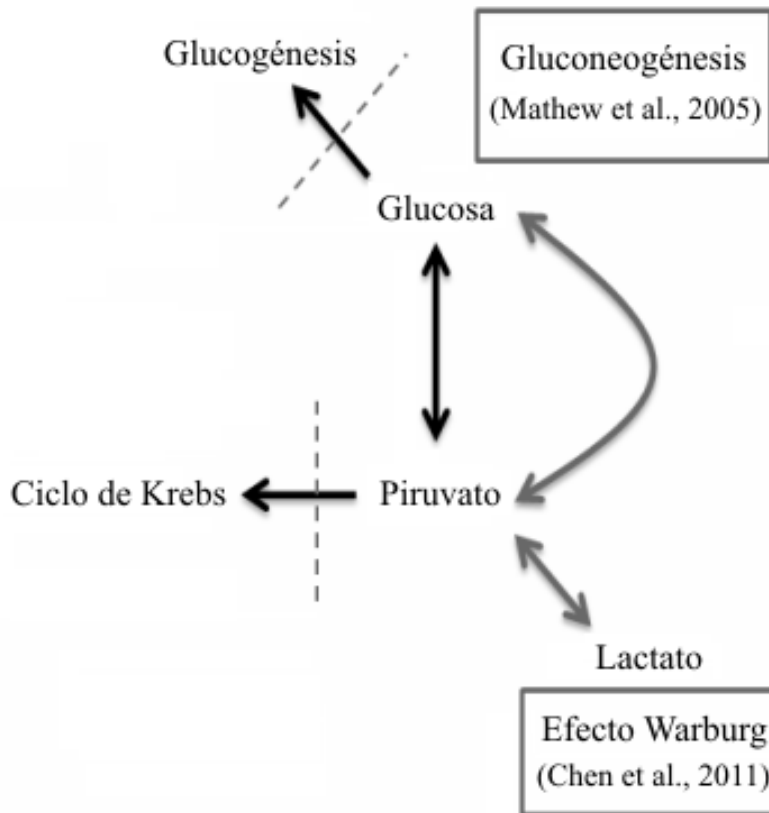
horas después de haber infectado al camarón tigre (*P. monodon*) con WSSV ocurre una disminución significativa (33%) en la concentración de glucosa en hemolinfa (Mathew et al., 2007). Este hecho es trascendente ya que dicho descenso glucosídico concuerda con la fase de replicación reportada para WSSV, resultados similares a los obtenidos en el presente estudio, donde ocurre un decremento en la concentración de glucosa plasmática a los 14 dpi cuando el IHNV se encuentra en fase de replicación (Montgomery, 2007).

Diversos autores han sugerido que durante la compensación fisiológica en respuesta al estrés se incrementan las demandas energéticas, y por lo tanto ocurren cambios en la concentración de diversos sustratos energéticos, reflejados en la forma de una respuesta hiperglucémica, hiperlactatémica o hiperlipidémica y que dichos sustratos pueden considerarse como indicadores sensibles y adecuados de estrés (Chang y O'Connor, 1983; Racotta y Palacios, 1998; Radford et al., 2005). Así, en el presente estudio se observó que a los 7 dpi la concentración de lactato plasmático se incrementó en los organismos infectados, lo que se puede considerar una respuesta asociada a situaciones estresantes (Spotts y Lutz, 1981). Vale la pena subrayar el hecho de que el comportamiento de la concentración de lactato plasmático durante el desarrollo del proceso infeccioso es muy similar a lo observado en cuanto a la concentración de glucosa plasmática. El análisis de los datos sugiere que los niveles elevados de glucosa plasmática pueden ser producto de un incremento en la actividad gluconeogénica, es decir, a través de la ruta anabólica por la cual se sintetiza glucosa a partir de precursores no glucídicos, como lactato, glicerol o aminoácidos glucogénicos, como serina, valina y metionina, entre otros. Aparentemente, el lactato no puede ser oxidado por las mitocondrias de los organismos infectados y es convertido, nuevamente, en piruvato. El incremento constante de lactato estimula la gluconeogénesis (Figura 14), ya que la disponibilidad de sustrato es un factor importante que determina la tasa gluconeogénica (Fritsche et al., 2008). Este ciclo en el que la glucosa es oxidada, a través de glucólisis aerobia, a lactato, y éste es convertido nuevamente en glucosa, se conoce como el ciclo de Cori, y se ha documentado que algunas condiciones celulares patológicas, como el cáncer, incrementan la actividad en el ciclo de Cori (Holroyde et al., 1979). Es importante tener en cuenta que el lactato se ha considerado tradicionalmente como el precursor más importante de la gluconeogénesis (Hetenyi et al., 1983). Resultados similares se han observado en camarones infectados por otros virus.

Recientemente se observó que al infectar al camarón tigre *P. monodon* con WSSV, la actividad de enzimas involucradas en la gluconeogénesis se incrementó significativamente durante el proceso de infección (Mathew et al., 2005). Por otro lado, se ha reportado que en el camarón japonés (*Marsupenaeus japonicus*) la concentración de lactato plasmático se incrementa abruptamente después de la infección experimental con WSSV, lo cual semeja una respuesta glucolítica anormal, conocida como el efecto Warburg, similar a la que se observa en células cancerosas y tumores (Chen et al., 2011). De igual forma, es pertinente sugerir, que de alguna forma, una vez transcurridos los primeros 7 días post-inoculación, ocurre un evento, metabólico o genético, que permite que tanto la glucogénesis como el ciclo de Krebs procedan normalmente, de modo que los niveles de glucosa y lactato disminuyan dramáticamente a partir del día 14 post-inoculación. Resultados similares han sido reportados previamente (Chen et al., 2011).

Existe evidencia de que la concentración de proteínas totales en plasma en decápodos puede variar ampliamente tanto a nivel inter- como intra-específico (Depledge y Bjerregaard, 1989). Asimismo, se ha reportado que los valores de proteína total pueden verse afectados por varios estresores, como el proceso de muda (Chan et al., 1988), el ayuno, o la ausencia de carbohidratos y lípidos en el alimento (Akiyama et al., 1989). Sin embargo, varios reportes indican que dada la importancia energética de la proteína, este recurso solamente sufre alteraciones bajo condiciones de estrés extremas o muy prolongadas. Así, se ha reportado que en el cangrejo *Carcinus maenas* expuesto a condiciones de estrés salino, la concentración de proteína plasmática no se modificó (Weeks et al., 1993). De igual forma, se ha reportado que en el camarón blanco *P. vannamei* sometido a un periodo de ayuno de hasta 120 h no se observaron diferencias significativas en la concentración de proteínas totales plasmáticas (Sánchez-Paz et al., 2007). Sin embargo, la exposición experimental a diferentes patógenos puede afectar la concentración de proteínas en plasma del camarón *P. vannamei*. Recientemente se demostró una reducción significativa (56%) en la concentración de proteínas totales en el camarón *P. vannamei* infectado experimentalmente con el virus del Síndrome de Taura (Song et al., 2003). En el presente estudio no se encontraron cambios estadísticamente significativos en la concentración de proteínas plasmáticas durante el proceso de infección,

debidos quizás a las consecuencias metabólicas que implica la utilización de este tipo de moléculas como aporte energético.

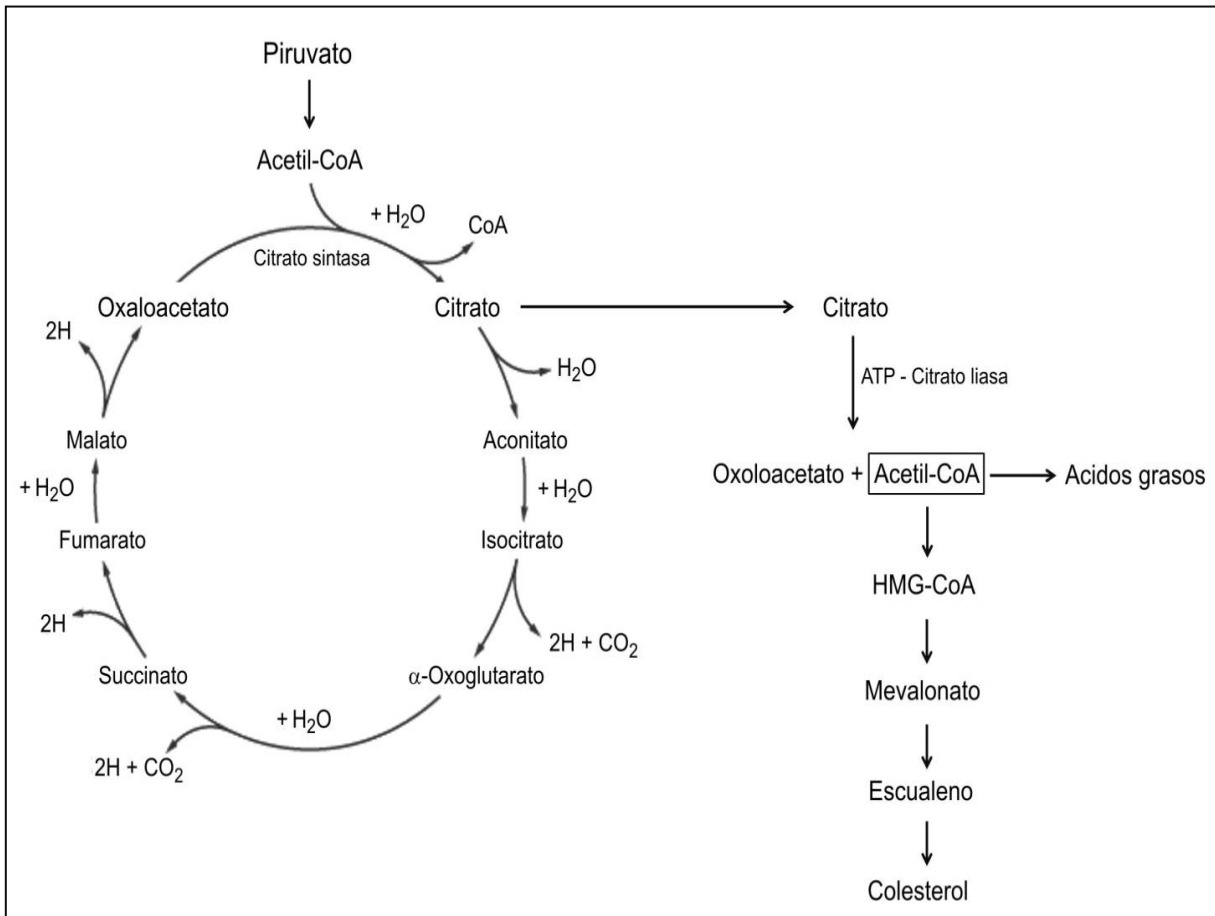


**Figura 14.** Representación esquemática del efecto de la infección experimental por el IHHNV en el metabolismo de la glucosa. La ruta normalmente (flechas color negro) procede a través de la oxidación de la glucosa a piruvato. Sin embargo, durante la infección con IHHNV esta ruta se altera (flechas en gris) de forma que ocurre un proceso similar a la glucólisis aerobia (o efecto Warburg), y el piruvato es reducido a lactato. Algunos estudios han reportado la ocurrencia del efecto Warburg, la producción favorecida de lactato a partir de glucosa, en condiciones celulares patológicas como cáncer o infecciones virales (Chen et al., 2011). Posteriormente, el lactato es oxidado a piruvato, convirtiéndose en el primer sustrato de la ruta gluconeogénica. Estudios previos han reportado un incremento en la actividad de algunas enzimas gluconeogénicas en camarones infectados con WSSV (Mathew et al., 2005).

Un indicador importante para conocer el estado nutricional y fisiológico en organismos peneidos es la determinación de la concentración de colesterol en la hemolinfa (Rosas et al., 2002). Estudios recientes han demostrado que el camarón blanco *P. vannamei* en condiciones de niveles elevados de amonio, la concentración de colesterol plasmático disminuyó como consecuencia de su utilización para la síntesis de hormonas y como componente de membranas (Racotta y Hernandez, 2000). La organización de las membranas biológicas se basa en la interacción de proteínas y lípidos de membrana. Datos recientes indican que dentro de las membranas existen regiones específicas, llamadas balsas lipídicas, caracterizadas por contener una elevada concentración de colesterol, esfingolípidos y ciertas proteínas de anclaje. Las propiedades biofísicas y el alto contenido de moléculas de señalización convierten a estas regiones en un objetivo natural, mediante las cuales los patógenos pueden adherirse a las células huésped y secuestrar el tráfico intermembranal, perturbar las zonas de señalización en los hospederos, alterar el tráfico intracelular permitiendo la maduración de los viriones y son medios alternativos utilizados para salir de la célula huésped (Ynske et al., 2010). Existen bacterias que utilizan citolisinas dependientes de colesterol (CDC) para crear poros en membranas con rangos de diámetros entre 1-50 nm (Rosado et al. 2008). Estas interacciones también han sido documentadas en diversas infecciones de tipo viral, como en el caso del virus del dengue, donde se ha observado que la presencia de colesterol en la membrana celular facilita la fusión con la membrana viral, para que el virus pueda entrar en la célula (Noisakran et al., 2008). Sin embargo, la presencia de colesterol en la membrana celular no es un requisito indispensable, para que ocurra la fusión (Kielian y Helenius, 1986; Smit et al., 1999). En el presente estudio se observó un incremento paulatino, pero continuo, en la concentración de colesterol en plasma desde el inicio del ensayo hasta los 14 dpi cuando se observan diferencias significativas al comparar con los organismos no infectados. Cabe mencionar que el efecto de diversos patógenos virales sobre la concentración de esteroides en plasma no sigue un patrón definido. Así, la concentración de colesterol en plasma puede disminuir durante algunas infecciones agudas, mientras que en otros casos se ha observado un incremento en la concentración de colesterol plasmático (Beisel, 1981). En este caso, el incremento en la concentración de colesterol pudiera explicarse como consecuencia de la concentración elevada de glucosa y lactato observados a los 7 dpi. Se ha reportado que tanto el piruvato como el



lactato son precursores colesterogénicos importantes en hepatocitos de rata (Gibbons y Pullinger, 1979). De este modo, los resultados del presente estudio sugieren que el lactato acumulado durante los primeros 7 dpi es utilizado, posteriormente, como sustrato para la síntesis de colesterol y ácidos grasos (en los que se observa un incremento a los 14 dpi). Esto puede ocurrir mediante la oxidación del lactato a piruvato en citoplasma (Figura 15). El piruvato es posteriormente internalizado a la mitocondria, donde es transformado a acetil-CoA. Sin embargo, la membrana mitocondrial es impermeable al acetil-CoA, de modo que su participación en la síntesis de ácidos grasos y colesterol se ve interrumpida. De este modo, una molécula de acetil-CoA y una de oxalacetato (proveniente del ciclo de Krebs) se condensan para formar citrato, reacción catalizada por la enzima citrato sintasa (E.C. 2.3.3.1). El citrato es transportado posteriormente de la matriz mitocondrial al citosol, en donde es convertido a acetil-CoA y oxalacetato por la ATP citrato liasa (E.C. 2.3.3.8). De esta forma el acetil-CoA, es utilizado como sustrato para la síntesis de ácidos grasos y colesterol. Así, es posible que la síntesis de colesterol por esta vía permita modificar las condiciones de permeabilidad de la membrana plasmática. Estudios recientes han demostrado que perturbaciones en el metabolismo de lípidos son un sello característico en células viralmente infectadas (Blanc et al., 2011). Autores como Mackenzie et al., (2007) mencionan que una redistribución del colesterol de la membrana plasmática es crucial para la replicación del virus del Nilo Oriental, en donde una manipulación directa de este patógeno a las vías celulares, específicamente funciones enzimáticas, promueve la síntesis de este metabolito; facilitando el proceso de replicación e inhibiendo la capacidad de respuesta antiviral del hospedero, finalmente restaurándose los valores de colesterol en la membrana disminuyendo con esta acción la replicación del virus. Así mismo, se ha reportado que el parvovirus canino induce la desorganización de membranas lo que permite que la membrana tenga mayor fluidez y, por lo tanto, se facilite la entrada del virus a las células de su hospedero (Pakkanen et al., 2009). Así, los resultados obtenidos en este estudio sugieren que los cambios en la concentración de colesterol pudieran ser consecuencia de la estrategia adoptada por el IHHNV para modificar la permeabilidad de la membrana celular, incrementando de esta manera su capacidad de replicación y propagación.



**Figura 15.** Esquema simplificado de la ruta de síntesis de colesterol y ácidos grasos a partir de acetil-CoA. El proceso de oxidación de la glucosa a piruvato ocurre en el citoplasma, y es transportado al interior de la mitocondria. Una vez internalizado, el complejo multienzimático piruvato deshidrogenasa (PDH) cataliza la conversión del piruvato a acetil-CoA. Dado que la membrana mitocondrial es impermeable al acetil-CoA este se condensa con el oxaloacetato, producto del ciclo de Krebs, para generar citrato, reacción catalizada por la citrato sintasa (EC 2.3.3.1), Posteriormente, el citrato se exporta al citosol y a continuación, el citrato citosólico es escindido para generar oxaloacetato y acetil-CoA, reacción catalizada por la enzima ATP-citrato liasa (EC 2.3.3.8). Así, el acetil-CoA es un precursor de la síntesis de ácidos grasos y colesterol.

En los camarones, los lípidos son una fuente primaria de almacenamiento de energía y se encuentran involucrados en procesos fisiológicos como el crecimiento, muda y reproducción (Sánchez-Paz et al., 2007). Específicamente la importancia de los triglicéridos radica en su función como principal fuente de energía (D'Abramo, 1997). Durante el transcurso del presente estudio el comportamiento de acilglicéridos en plasma de organismos infectados fue muy similar al observado en la concentración de esteroides. De manera similar Sánchez-Paz et al., (2007) al exponer a organismos de *P. vannamei* a un periodo de ayuno durante 120 h encontró similitudes entre la concentración de estos dos metabolitos plasmáticos. Los resultados obtenidos en cuanto a la concentración de acilglicéridos en plasma, presentan un comportamiento muy similar al observado en esteroides plasmáticos y probablemente se ajuste a la explicación anterior (resultado del uso de lactato acumulado para la síntesis de esteroides y ácidos grasos), más como una estrategia viral para modificar la permeabilidad de la membrana, de modo que las demandas ordinarias de energía pasan a segundo término.

Hoy se reconoce que los lípidos juegan un papel importante en la interacción patógeno-hospedero, ya que las múltiples funciones celulares en las que intervienen los lípidos los convierten en protagonistas principales durante una infección viral (Ynske et al., 2010). Al analizar los datos sobre la concentración de lípidos totales encontramos un descenso en los niveles plasmáticos a los 7 dpi lo cual podría explicarse mediante el catabolismo de lípidos para la síntesis de acetil-CoA y ésta a su vez utilizada para la obtención de colesterol. Es decir, una de las rutas catabólicas de lípidos es la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos en donde se producen fragmentos de dos carbonos, los cuales son aceptados por la coenzima A, produciendo acetil-CoA, misma que participa en la biosíntesis de este metabolito. Sin embargo, hay que mencionar que si bien se observó un descenso significativo a los 7 dpi hubo cambios notables en las concentraciones de esteroides y acilglicéridos (componentes importantes del repertorio lipídico total). Es decir, aunque se detectaron cambios importantes en la concentración de esteroides y acilglicéridos, los niveles de los lípidos totales permanecieron relativamente estables durante el proceso infeccioso, por lo que es claro que existe un cambio en cuanto a la población de distintas especies de lípidos. Esto deberá

estudiarse cuidadosamente más adelante, ya que podría elucidar una parte importante del proceso infeccioso.

El hepatopáncreas es un órgano vital en los crustáceos y en él se lleva a cabo la absorción de nutrientes, metabolismo de proteínas, lípidos y carbohidratos, síntesis y secreción de distintas enzimas digestivas (como la tripsina) y síntesis de proteínas plasmáticas (como la hemocianina y lipoproteínas) (Sánchez-Paz et al., 2007), las cuales en conjunto preservan la integridad celular regulando la degradación de las reservas energéticas (Sánchez-Paz et al., 2006). Además, es el sitio de reserva de fuentes de reservas energéticas (como el glucógeno) y participa en los procesos de excreción y muda (Sánchez-Paz et al., 2007). En camarones expuestos a un periodo de ayuno prolongado se presentó una reducción en el índice hepatosomático de ~35% en comparación con organismos sin esta condición estresante (Sánchez-Paz *et al.* 2007). Durante el transcurso de la infección con IHHNV no se observaron diferencias estadísticas en cuanto al valor de este índice, probablemente debido a la aparente relación con el comportamiento de glucógeno explicado anteriormente.

En el presente estudio no se observaron diferencias significativas en la concentración de glucosa hepatopancreática en los organismos infectados en comparación con los observados con los organismos del grupo control. Estos resultados contrastan con los observados por Yoganandhan et al., (2003), quienes reportaron una reducción significativa en la concentración de glucosa en hepatopáncreas de organismos infectados con WSSV. Esta diferencia se podría deber a que los camarones infectados con WSSV pueden requerir un aporte energético inmediato para impulsar la demanda de energía necesaria para activar y mantener la respuesta inmune contra un virus de replicación muy rápida; mientras que en el caso de los camarones infectados con IHHNV, dada la baja tasa de replicación de este virus, los organismos no requieren hacer uso urgente de fuentes de energía.

El glucógeno, como se mencionó anteriormente, es almacenado en el hepatopáncreas (Verri et al., 2001) y este metabolito proporciona un suministro constante de glucosa, además de generar los precursores para la síntesis de quitina (Cuzon et al., 2000). Si bien, no se observaron diferencias significativas en la concentración de glucógeno hepatopancreático entre los organismos infectados y los controles, es evidente la tendencia paulatina, pero constante, a incrementar los niveles de glucógeno en los organismos infectados. Este

incremento pudiera ser el resultado de la acumulación de glucosa plasmática observada en los primeros 7 dpi, aunque se requieren estudios posteriores para demostrarlo. Así mismo, los datos anteriormente mencionados acerca del comportamiento del IHS durante el experimental, pudieran estar reflejando una estrecha relación entre este factor fisiológico y la condición relativamente estable y tendiente al incremento de glucógeno hepatopancreático.

En lo que respecta a la utilización de las reservas proteicas, hace algunas décadas se propuso que estas eran la opción de utilización como fuente de energía preferente para el camarón (New, 1976); sin embargo, estudios recientes indican que la glucosa es la fuente principal de obtención inmediata de energía (Sánchez-Paz et al., 2007), ya que mientras ésta es rápidamente consumida, la concentración de proteína disminuye lentamente. Esta respuesta puede ser una estrategia metabólica adaptativa para evitar el costo fisiológico ocasionado por el consumo de macromoléculas. En el presente estudio la concentración de proteína total en los organismos infectados y los organismos del grupo control no mostró diferencias significativas.

La estructura de la membrana celular depende en gran parte de la combinación de lípidos y proteínas. Adicionalmente, en tejidos específicos se acumulan lípidos que sirven como reservas energéticas (Yepiz-Plascencia et al., 2000). El hepatopáncreas funciona como el órgano de almacenamiento lipídico más importante en crustáceos, de modo que las grasas presentes en el alimento son digeridas y absorbidas a través del tracto digestivo y transportados a este órgano (Sánchez-Paz et al., 2006). El colesterol es un nutriente esencial para crustáceos ya que ellos son incapaces de la síntesis de *novo* de este anillo esteroideal (Rabid et al., 1999). Algunos estudios precedentes indican que infecciones de tipo viral pueden interferir en el metabolismo lipídico. Existen reportes que indican que camarones infectados con WSSV presentan un comportamiento letárgico, mismo que se ha asociado a una interferencia en el catabolismo de lípidos, resultando en elevadas concentraciones lipídicas en las células afectadas (De Croos et al., 2004). Nuestros resultados coinciden con lo anteriormente mencionado, ya que se observó un incremento significativo tanto en la concentración de lípidos totales, esteroides y acilglicéridos en hepatopáncreas en los organismos infectados. La posible explicación de estos hechos está muy relacionada a los eventos observados en plasma. Durante los primeros días de infección existe una acumulación

de glucosa y lactato. Aparentemente, las vías para síntesis de glucógeno y el ciclo de Krebs son inhibidas temporalmente. Posteriormente, existe un evento que permite que estas rutas fluyan nuevamente, y los niveles de glucosa y lactato disminuyen drásticamente, permitiendo el flujo de precursores de síntesis de esteroides y ácidos grasos. Sin embargo, se requieren más estudios para corroborar si esto ocurre a nivel de actividad enzimática, regulación génica o si dicho incremento es mediado, dirigido o regulado por el huésped o el hospedero.

Como se mencionó anteriormente, la importancia de los triglicéridos radica en su función como principal fuente de energía (D'Abramo, 1997), Sin embargo, en condiciones que alteran el metabolismo de los lípidos, esta energía podría ser desviada de su destino normal, esto se ve reflejado en los resultados obtenidos en este estudio, que pueden ser un indicativo de que las células son estimuladas por el virus para la liberación de lípidos, acilglicéridos y esteroides, los cuales serán utilizados en el proceso de replicación del patógeno y no en el uso como energía de crecimiento del organismo afectado, ya que durante el desarrollo del experimental, la concentración hepatopancreática de acilglicéridos y lípidos totales, mantuvo una tendencia al incremento, observándose niveles mas elevados en el grupo de los organismos infectados.

## **IX. CONCLUSIONES**

Al inicio del proceso infeccioso ocurre un estado hiperglucémico e hiperlactatémico en plasma, seguido de un decremento significativo en los niveles de ambos metabolitos al finalizar la fase de replicación viral.

Existe un incremento significativo en la concentración de esteroides y acilglicéridos medidos en plasma y hepatopáncreas a partir de los 14 dpi.

La afectación del metabolismo energético del camarón por el metabolismo infeccioso del IHHNV, puede favorecer la replicación y propagación del virus en el hospedero.

Un estudio detallado sobre modificaciones en el perfil lipídico provocado por el IHHNV, pudiera sugerir una estrategia para contrarrestar los efectos adversos de este virus sobre su hospedero. Además, pudiera explicar el crecimiento retardado del hospedero.

## X. LITERATURA CITADA

- Akiyama, D. M., Coelho, S. R., Lawrence, A., y Robinson, E. H. 1989. Apparent digestibility of feedstuffs by the marine shrimp *Penaeus vannamei* Boone. Nippon Suisan Gakkaishi 55:91-98.
- Alfaro-Aguilera, R., Guevara-Torres, M., y Gonzales-Chávez, I. 2010. Prevalence and distribution of the principal etiologic agents that affecting wild shrimp from Tumbes, Peru. Rev. Peru. Biol. 17:359-364.
- Anderson, M. J., Higgins, P. G., Davis, L. R., Willman, J. S., Jones, S. E., Kidd, I. M., Pattison, J. R. y Tyrrell, D. A. 1985. Experimental parvoviral infection in humans. J. Infect. Dis. 152:257-265.
- Beisel, W. R. 1981. Impact of infectious disease upon fat metabolism and immune functions. Cancer Res. 41:3797-3798.
- Belak, J., Dhar, A. K., Primavera, J. H., De la Peña, L. D., Pettit, P., y Alcivar-Warren, A. 1998. Prevalence of viral diseases (IHHNV and WSSV) In: *Penaeus monodon* from the Philippines and its Association with Mangrove Status and Shrimp Culture Systems. Symposium on Aquaculture and Conservation of Marine Shrimp Biodiversity, pp. 18. Tufts University School of Veterinary Medicine, Massachusetts, USA, 10 Diciembre 1998.
- Bell, T. A., y Lightner, D. V. 1984. IHHN virus: infectivity and pathogenicity studies in *Penaeus stylirostris* and *Penaeus vannamei*. Aquaculture 38:185-194.
- Bergh, O., Børsheim, K. Y., Bratbak, G., y Heldal, M. 1989. High abundance of viruses found in aquatic environments. Nature 340:467-468.
- Blanc, M., Hsieh, W. Y., Robertson, K. A., Watterson, S., Shui, G., y Lacaze, P. I. 2011. Host defense against viral infection involves interferon mediated down-regulation of sterol biosynthesis. Plos Biol; 9: e1000598.
- Boada, M., De Donato, M., y Rodulfo, H. 2008. Detection of the infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) in asymptomatic cultured white shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone), in Venezuela. Rev Cient-Fac Cien 18:7-11.



- Chan, S. M., Rankin, S. M., y Keeley, L. L. 1988. Characterization of the molt stages in *Penaeus vannamei*: setogenesis and hemolymph levels of total protein, ecdysteroids and glucose. *Biol. Bull.* 175:185-192.
- Chang, E. S., y O'Connor, J. D. 1983. Metabolism and transport of carbohydrates and lipids. *The Biology of the Crustacea*, vol. 5 (ed. L. H. Mantel), pp. 263–289. New York: Academic Press.
- Chayaburakul, K., Nash, G., Pratanpipat, P., Sriurairatana, S. y Withyachumnarnkul, B. 2004: Multiple pathogens found in growth-retarded black tiger shrimp *Penaeus monodon* cultivated in Thailand. *Dis. Aquat. Organ.* 60:89-96.
- Chen, I. T., Aoki, T., Huang, Y. T., Hirono, I., Chen, T. C., Huang, J. Y., Chang, G. D., Lo, C. F., y Wang, H. C. 2011. White spot syndrome virus induces metabolic changes resembling the Warburg effect in shrimp hemocytes in the early stage of infection. *J. Virol.* 85:12919-12928.
- Claydon, K., Haji-Tajir, R. A., Said, H. M., Lakim, M. H., y Tamat, W. 2010. Prevalence of shrimp viruses in wild *Penaeus monodon* from Brunei Darussalam. *Aquaculture* 308:71-74.
- Coelho, M., Silva, G., Vilanova, V. J., Neto, O., Lima, N., Feijo, R. G., Apolinario, D. F., Maggioni, R., y Gesteira, C. V. 2009. Susceptibility of the wild southern brown shrimp (*Farfantepenaeus subtilis*) to infectious hypodermal and hematopoietic necrosis (IHNN) and infectious myonecrosis (IMN). *Aquaculture* 294:1-4.
- Comité de Sanidad Acuicola del Estado de Sinaloa. 2009. Resumen de siembras y cosechas del ciclo de producción 2009. Consultado Noviembre, 15, 2010. (<http://www.cesasin.com.mx/ESTADISTICAS%202009.html>)
- Comite de Sanidad Acuicola del Estado de Sonora. 2009. Reporte Tecnico 2009. COSAES.com. Reporte consultado Noviembre, 15, 2010. (<http://www.COSAES.com>).
- Couch, J. A. 1974a. Free and occluded virus, similar to Baculovirus, in hepatopancreas of pink shrimp. *Nature* 247:229-231.
- Couch, J. A. 1974b. An enzootic nuclear polyhedrosis virus of pink shrimp: ultrastructure, prevalence, and enhancement. *J. Invertebr. Pathol.* 24:311-331.

- Cuzon, G., Cahu, C., Aldrin, J. F., Massager, J. L., Stephan, C., y Mevel, M. 1980. Starvation effect on metabolism of *Penaeus japonicus*. Proc. World Mariculture Soc. 11:410-423.
- Cuzon, G., Rosas, C., Gaxiola, G., Taboada, G., y Van Wormhoudt, A. 2000. Utilization of carbohydrates by shrimp. In: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M.A., Civera-Cerecedo, R. (Eds.), Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium de Nutrición Acuícola. 19–22 Noviembre, 2000. Mérida, Yucatán. pp. 328–339.
- D'Abramo, L. R. 1997. Triacylglycerols and fatty acids. In: D'Abramo, L., Conklin, D.E., Akiyama, D.M. (Eds.), Crustacean nutrition. J World Aquacult Soc, Baton Rouge, La., pp. 71–84.
- Dall, W., Hill, B. J., Rothlisberg, P. C., y Sharples, D. J. 1990. Molting and growth. En: Blaxter, J. H. S., Southward, A. J. (Eds.), The Biology of the Penaeidae. Adv. Mar. Biol., vol. 27. Academic Press, London, pp. 213–250.
- Danilova, N. 2006. The evolution of immune mechanisms. J.Exp. Zool. 306B:496-520
- De Croos, M. D. S. T., Jayasinghe, J. M. P. K., Edirisinghe, E. M. R. K. B., y De Silva, D. N. 2004. Influence of white spot disease on muscle lipid content and fatty acid profile of cultured *Penaeus monodon*. Asian Fish. Sci. 17:93-100.
- Depledge, M. H., y Bjerregaard, P. 1989. Haemolymph protein composition and cooper levels in decapods crustaceans. Helgoland Mar. Re., 43:207-223.
- Dos Santos-Braz, R. F., Rodrigues de Oliveira da Silva, C. P., Garcia-Reis, L., Cunha-Martins, P. C., Pereira de Sales, M., y Vasconcelos-Meissner, R. 2009. Prevalence of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) in *Penaeus vannamei* cultured in northeastern Brazil. Aquaculture 288:143-146.
- Escobedo-Bonilla, C. M., Wille, M., Alday-Sanz, V., Sorgeloos, P., Pensaert, M. B., y Nauwynck, H. J. 2005. In vivo titration of white spot syndrome virus (WSSV) in specific pathogen-free *Litopenaeus vannamei* by intramuscular and oral routes. Dis. Aquat. Organ. 66:163-170.
- Fritsche, L., Weigert, C., Häring, H. U., y Lehmann, R. 2008. How insulin receptor substrate proteins regulate the metabolic capacity of the liver. Curr. Med. Chem. 15:1316-1329.

- Gibbons, G. F., y Pullinger, C. R. 1979. Utilization of endogenous and exogenous sources of substrate for cholesterol biosynthesis by isolated hepatocytes. *Biochem. J.* 177:255-263.
- Guzmán, S. F. M., Molina, Z. R., Pérez, R., Ibarra J. C., y Galaviz, L. 2009. Virus de la Necrosis Hipodérmica y Hematopoyética Infecciosa (IHHNV) y Virus del Síndrome de Taura (TSV) en camaron silvestre (*Farfantepenaeus aztecus* Ives, 1981 y *Litopenaeus setiferus* Linnaeus, 1767) de La Laguna Madre, Golfo de Mexico. *Biol. Mar. Ocean.* 44:663-672.
- Hall, M., y Van Ham, E. H. 1998. The effect of diferent types of stress on blood glucose in the gigant tiger prawn. *Penaeus monodon*. *J. World Aquac. Soc.* 29:290-299.
- Heaton, N. S., y Randall, G. 2011. Multifaceted roles for lipids in viral infection. *Trends Microbiol.* 19:368-75.
- Hernández-López, J. 2001. Diseño de técnicas para la cuantificación de moléculas plasmáticas de camarón. Tesis Doctoral. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. Hermosillo, Sonora, México.
- Hetenyi, G., Perez, G., y Vranic, M. 1983. Turnover and precursor product relationships of nonlipid metabolites. *Physiol. Rev.* 63:606-667.
- Hilleman, M. R. 2004. Strategies and mechanisms for host and pathogen survival in acute and persistent viral infections. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101:14560-14566.
- Hohnke, L., y Scheer, B. J. 1970. Carbohydrate metabolism in crustaceans. En: Florkin, M., Scheer, B. T., (eds). *Chem. Zool.* New York: Academic Press. P. 147-166.
- Holroyde, C. P., Axelrod, R. S., Skutches, C. L., Haff, A. C., Paul, P., y Reichard, G. A. 1979. Lactate metabolism in patients with metastatic colorectal cancer. *Cancer Res.* 39:4900-4904.
- Jimenez, R., Barniol, R., de Barniol, L., y Machuca, M. 1999. Infection of IHHN virus in two species of cultured shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) and *Litopenaeus stylirostris* (Stimpson) in Ecuador during El Niño 1997-1998. *Aquac. Res.* 30:695-705.
- Kalagayan, H., Godin, D., Kanna, R., Hagino, G., Sweeney, J., y Wyban, J. 1991. IHHN virus as etiological factor in runt-deformity syndrome (RDS), of juveline *Penaeus vannamei* cultured in Hawaii. *J. World Aquac. Soc.* 22:235-243.

- Kielian, M. C., y Helenius, A. 1984. Role of cholesterol in fusion of Semliki Forest virus with membranes J. Virol. 52:281-283.
- Krabsetsve, K., Cullen, B. R., y Owens, L. 2004. Rediscovery of the Australian strain of infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus. Dis. Aquat. Organ. 61:153-158.
- Li, C., Shields, J. D., Ratzlaff, R. E., y Butler, M. J. 2008. Pathology and haematology of the Caribbean spiny lobster experimentally infected with *Panulirus argus* virus 1 (PaV1). Virus Res. 132:104-113.
- Lightner, D. V. 1996. Epizootiology, distribution and the impact on international trade of two penaeid shrimp viruses in the Americas. Res Supp, U.S. Gov't, Non-P.H.S.
- Lightner, D. V. y Pantoja, C. R. 1996. Manual para el diagnostico de enfermedades del camarón. USDA Unites States Despartament of Agriculture.
- Lightner, D. V., Mohny, L. L., Williams, R. R., y Redman, R. M. 1987. Glycerol tolerance of IHHN virus of penaeid shrimp. J. World Aquac. Soc. 18:196-197.
- Lightner, D. V., Pantoja, C. R., Poulos, B. T., Tang, K. F. J., Redman, R. M., Andreas, T., y Bonami, J. R. 2004. Infectious Myonecrosis (IMN): A new virus disease of *Litopenaeus vannamei*. Book of Abstracts. World Aquaculture 2004, March 2-5, Honolulu, HI. J. World Aquac. Soc., Baton Rouge, LA, USA.
- Lightner, D. V., Redman, R. M., Bell, T. A., y Brock, J. A. 1983b. Detection of IHHN virus in *Penaeus stylirostris* and *Penaeus vannamei* imported into Hawaii. J. World Mar. Soc. 14:212-225.
- Lightner, D. V., Redman, R. M., y Bell, T. A. 1983a. Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis (IHHN), a newly recognized virus disease of penaeid shrimp. J. Invertebr. Pathol. 42:62-70.
- Lightner, D. V., Williams, R., Bell, T., Redman, R. M., y Perez, A. 1992. A collection of case histories documenting the introduction and spread of the virus disease IHHN in penaeid shrimp culture facilities in Northwestern Mexico. ICES. J. World Mar. Soc. 194:97-105.

- Lorenzon S., Brezovec S., y Ferrero, E. A. 2004 Species-specific effects on hemolymph glucose control by serotonin, dopamine, and L-enkephalin and their inhibitors in *Squilla mantis* and *Astacus leptodactylus* (crustacea). *J. Exp. Zool.* 301:727-736.
- Lorenzon, S., Guarrini, S., Smith, V. J., y Ferrero, E. A. 1999. Effects of LPS injection on circulating haemocytes in crustaceans in vivo. *Fish Shellfish Immun.* 9:31-50.
- Mackenzie, J. M., Khromykh, A. A., y Parton, R. G. 2007. Cholesterol manipulation by West Nile virus perturbs the cellular immune response. *Cell Host Microbe* 2:229–239.
- Martorelli, S. R., Overstreet, R. M., y Jovanovich-Alvillar, J. A. 2010. First report of viral pathogens WSSV and IHHNV in Argentine crustaceans. *Bull. Mar. Sci.* 86:117-131.
- Mathew, S. 2005. Haematological and enzymatic alterations during white spot syndrome virus infection in *Penaeus monodon* (fabricius) Ph.D. Thesis, Central Institute of Fisheries Education, Indian Council of Agricultural Research, Mumbai.
- Mathew, S., Kumar, K. A., Anandan, R., Nair, P. G., y Devadasan, K. 2007. Changes in tissue defense system in white spot syndrome virus (WSSV) infected *Penaeus monodon*. *Comp. Biochem. Physiol.* 145D:315-320.
- Montgomery, D. B., Tacon, A. G. J., Poulos, B., y 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.
- New, M. B. 1976. A review of dietary studies with shrimp and prawns. *Aquaculture* 9:101-144.
- Noga, E. J. 2000. Hemolymph biomarkers of crustacean health. En: *Recent Advances in Marine Biotechnology, Immunobiol. Pathol*, Vol. 5.
- Noisakran, S., Dechtawewat, T., Avirutnan, P., Kinoshita, T., Siripanyaphinyo, U., Puttikhunt, C., Kasinrerak, W., Malasit, P. y Sittisombut, N. 2008. Association of dengue virus NS1 protein with lipid rafts. *J. Gen. Virol.* 89:2492–2500.
- Nunan, L. M., Poulos, B. T., y Lightner, D. V. 2000. Use of polymerase chain reaction for the detection of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus in penaeid shrimp. *Mar. Biotechnol.* 2:319-328.

- Owens, L., Anderson, I. G., Kenway, M., Trott, L., y Benzie, J. A. H. 1992. Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) in a hybrid penaeid prawn from tropical Australia. *Dis. Aquat. Organ.* 14:219-228.
- Pakkanen, K., Kirjavainen, S., Mäkelä, A. R., Rintanen, N., Oker-Blom, C., Jalonen, T. O., y Vuento, M. 2009. Parvovirus capsid disorders cholesterol-rich membranes. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 379:562-566.
- Pantoja, C., y Lightner, D. V. 2008. Enfermedades virales. En: Morales, V. y J. Cuellar-Angel (eds). *Guía Técnica - Patología e Inmunología de Camarones Penaeidos*. Programa CYTED Red II-D Vannamei, Panamá, Rep. De Panamá, 270 pp.
- Primavera, J. H., y Quintio, R. T. 2000. Runt-Deformity Syndrome in cultured giant tiger prawn *Penaeus monodon*. *J. Crustacean Biol.* 20:796-802.
- Pruijssers, A. J., Falabella, P., Eum, J. H., Pennacchio, F., Brown, M. R., y Strand, M. R. 2009. Infection by a symbiotic polydnavirus induces wasting and inhibits metamorphosis of the moth *Pseudoplusia includens*. *J. Exp. Biol.* 212:2998-3006.
- Rabid, T., Tietz, A., Khayat, M., Boehm, E., Michelis, R. y Lubzens, E. 1999. Lipid accumulation in the ovaries of a marine shrimp *Penaeus semisulcatus* (de haan). *J. Exp. Biol.* 202:1819-1829.
- Racotta, I. S., y Hernández-Herrera, R. 2000. Metabolic response of the white shrimp, *Penaeus vannamei*, to ambient ammonia. *Comp. Biochem. Phys.* 125<sup>a</sup>:437-443.
- Racotta, I. S., y Palacios, E. 1998. Hemolymph metabolic variables in response to experimental manipulation stress and serotonin injection in *Penaeus vannamei*. *J. World Mar. Soc.* 29:351-356.
- Radford, C. A., Marsden, I. D., Davison, W., y Taylor, H. H. 2005. Haemolymph glucose concentrations of juvenile rock lobsters, *Jasus edwardsii*, feeding on different carbohydrate diets. *Comp. Biochem. Phys.* 140A:241-249.
- Rai, P., Pradeep, B., Karunasagar, I., y Karunasagar, I. 2009. Detection of viruses in *Penaeus monodon* from India showing signs of slow growth syndrome. *Aquaculture* 289:231-235.
- Rendón, L., y Balcazar, J. L. 2003. Inmunología de camarones, conceptos básicos y recientes avances. *Rev AquaTIC* 19:27-33.

- Rosado, C. J., Kondos, S., Bull, T. E., Kuiper, M. J., Law, R. H., Buckle, A. M., Voskoboinik, I., Bird, P. I., Trapani, J. A., Whisstock, J. C. y Dunstone, M. A. 2008. The MACPF/CDC family of pore-forming toxins. *Cell Microbiol.* 10:1765-1774.
- Rosas, C., Pascual, C., López, N., y Sánchez, A. 2002. Metabolitos sanguíneos como herramientas para evaluar el estado nutricional de camarones peneidos. En: Cruz-Suárez, L. E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Gaxiola-Cortés, M. G., y Simoes, N. (Eds.) avances en Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI Simposium International de Nutrición Acuícola. 3 al 6 de septiembre del 2002. Cancún, Quintana Roo, México.
- Saksmerprome, V., Puiprom, O., Noonin, C., y Flegel, T. W. 2010. Detection of infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus (IHHNV) in farmed Australian *Penaeus monodon* by PCR analysis and DNA sequencing. *Aquaculture*, 298:190-193.
- Sánchez, A. P. C., Sánchez, A., Vargas-Albores, F., Le Moullac, G., y Rosas, C. 2001. Hemolymph metabolic variables and immune response in *Litopenaeus setiferus* adult males: the effect of acclimation. *Aquaculture*, 198:13-28.
- Sánchez-Paz, A., García-Carreño, F. L., Muhlia-Almazán, A., Peregrino-Uriarte, A. B., Hernández-López, J. y Yepiz-Plascencia, G. 2006. Usage of energy reserves in crustaceans during starvation: status and future directions. *Insect Biochem. Molec.* 36:241-249.
- Sánchez-Paz, A., García-Carreño, F., Hernández-López, J., Muhlia-Almazán, A., y Yepiz-Plascencia, G. 2007. Effect of short-term starvation on hepatopancreas and plasma energy reserves of the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 340:184-193.
- Schwarz, T. F., y Wolff, H. H. 1989. Parvovirus B19 infection: not confined to exanthema of erythema infectiosum. *Der Hautarzt; Zeitschrift für Dermatologie, Venerologie, und verwandte Gebiete.* 40:1-3.
- Shastri-Balla, K., y Consigli, R. A. 1994. Lipid and fatty acid analysis of uninfected and granulosis virus-infected *Plodia interpunctella* larvae. *J. Invertebr. Pathol.* 63:249-254.
- Shike, H., Dhar, A. K., Burns, J. C., Shimizu, C., Jousset, F. X., Klimpel, K. R., y Bergoin, M. 2000. Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus of shrimp is related to mosquito Brevdensoviruses. *Virology* 277:167-177.

- Smit, J. M., Bittman, R., y Wilschut, J. 1999. Low-pH-dependent fusion of Sindbis virus with receptor free cholesterol and sphingolipid containing liposomes. *J. Virol.* 73:8476-8484.
- Song, Y. L., Yu, C. I., Lien, T. W., Huang, C. C. y Lin, M. N. 2003. Haemolymph parameters of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) infected with Taura syndrome virus. *Fish Shellfish Immun.* 14:317-331.
- Spotts, D. G., y Lutz, P. L. 1981. L-Lactic acid accumulation during activity stress in *Macrobrachium rosenbergii* and *Penaeus duorarum* J. World Maricul. Soc. 12:244-249.
- Stuck, K. C., Watts, S. A., y Wang, S. 1996. Biochemical response during starvation and subsequent recovery in postlarval pacific white shrimp, *Penaeus vannamei*. *Mar. Biol.* 125:33-45.
- Stuck, K. C., y Overstreet, R. M. 1994 Effect of *Baculovirus penaei* on growth and survival of experimentally infected postlarvae of the Pacific white shrimp, *Penaeus vannamei*. *J. Invertebr. Pathol.* 24:18-25.
- Suttle, C. A. 2007. Marine viruses - major players in the global ecosystem. *Nature.* 5:801-812.
- Suttle, C.A. 2005. Viruses in the sea. *Nature.* 437:356-361.
- Tang, K. F. J., y Lightner, D. V. 2002. Low sequence variation among isolates of Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus (IHHNV) originating from Hawaii and the Americas. *Dis. Aquat. Organ* 49:93-97.
- Tang, K. F. J., Navarro, S. A. y Lightner, D. V. 2007. PCR assay for discriminating between infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) and virus-related sequences in the genome of *Penaeus monodon*. *Dis. Aquat. Organ.* 74:165-170.
- Tang, K. F. J., Poulos, B. T., Wang, J., Redman, R. M., Shih, H. H., y Lightner, D. V. 2003. Geographic Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus (IHHNV) isolates and characteristics of their infection. *Dis. Aquat. Organ.* 53:91-99.
- Tang, K. F. J., y Lightner, D. V. 2001. Detection and quantification of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus in penaeid shrimp by real-time PCR. *Dis. Aquat. Organ.* 44:79-85.



- Tang, K. F. J., y Lightner, D. V. 2006: Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV)-related sequences in the genome of the black tiger prawn *Penaeus monodon* from Africa and Australia. *Virus Res.* 118:185-191.
- Telford, M. 1968a. The identification and measurement of sugars in the blood of three species of Atlantic crabs. *Biol. Bull. Mar. Biol* 135:574-584.
- Telford, M. 1968b. The effects of stress on blood sugar composition of the lobster, *Homarus americanus*. *Can. J. Zool.* 46:819-826.
- Unzueta-Bustamante, M. L., Holschmit, K. H., Olivas-Valdez, J. A., Martinez-Cordova, L. R., Porchas-Cornejo, M. A., y Lizárraga-Partida, M. L. 1998. Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) in wild parent stocks of blue shrimp, *Penaeus stylirostris* (Stimpson), in Guaymas, bay, Sonora, Mexico. *Cienc. Mar.* 24:491-498.
- Vargas-Albores, F., Guzmán A., y Ochoa, J. L. 1993. An anticoagulant solution for haemolymph collection and prophenoloxidase studies of penaeid shrimp (*Penaeus californiensis*). *Comp. Biochem. Phys.* 106A:299-303
- Vargas-Albores, F., Guzmán-Murillo, A., y Ochoa, J. L. 1991. Posibles indicadores de salud de los camarones y su aplicación en la acuicultura, *Biotechnología.* 1:17-25.
- Vega-Heredia, S., Mendoza-Cano, J. F. y Sánchez-Paz, A. 2011. The Infectious Hypodermal and Haematopoietic Necrosis Virus: A brief review of what we do and do not know. *Transbound. Emerg. Dis.*, 59:95-105.
- Verri, T., Mandal, A., Zilli, L., Bossa, D., Mandal, P. K., Ingrosso, L., Zonno, V., Vilella, S., Ahearn, G. A., Storelli, C. 2001. D-Glucose transport in decapod crustacean hepatopancreas. *Comp. Biochem. Phys.* 130A:585-606.
- Vogt, G. 1992. Transformation of anterior midgut and hepatopancreas cells by monodon baculovirus (MBV) in *Penaeus monodon* postlarvae. *Aquaculture.* 107:239-248.
- Weeks, J. M., Jensen, F. B., y Depledge, M. H. 1993. Acid-base status, haemolymph composition and tissue copper accumulation in the shore crab *Carinus maenas* exposed to combined copper and salinity stress. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 97:91-98.

- Yang, B., Song, X. L., Huang, J., Shi, C. Y., y Liu, L. 2007. Evidence of existence of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus in penaeid shrimp cultured in China. *Microbiology* 120:63-70.
- Yepiz-Plascencia, G., Vargas-Albores, F., e Higuera-Ciapara, I. 2000. Penaeid shrimp hemolymph lipoproteins. *Aquaculture* 191:177-189.
- Ynske, P. M., Meer-Janssen, V. D., Galen, J. V., Batenburg, J. J., y Helms, J. B. 2010. Lipids in host–pathogen interactions: Pathogens exploit the complexity of the host cell lipidome. *Prog. Lipid Res.* 49:1-26.
- Yoganandhan, K., Thirupathi, S., y Hameed, A. S. S. 2003. Biochemical, physiological and hematological changes in white spot syndrome virus-infected shrimp. *Penaeus indicus*. *Aquaculture*, 221:1-11.
- Zakrzewska, K., Cortivo, R., Tonello, C., Panfilo, S., Abatangelo, G., Giuggioli, D., Ferri, C., Corcioli, F., y Azzi, A. 2005. Human parvovirus B19 experimental infection in human fibroblasts and endothelial cells cultures. *Virus Res.* 114:1-5.
- Zhang, C., Yuan, J. F., y Shi, Z. L. 2007. Molecular epidemiological investigation of infection hypodermal and hematopoietic necrosis virus and taura syndrome virus in *Penaeus vannamei* cultured in China. *Virology. Sin.* 22:380-388.