



**Centro de Investigación en Alimentación y
Desarrollo, A.C.**

**EFFECTO DE DIFERENTES COMBINACIONES DE
SALINIDAD Y TEMPERATURA SOBRE LA
RESPUESTA METABOLICA Y PATOLÓGICA DE
JUVENILES DE *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931)
INFECTADOS CON EL VIRUS DE LA MANCHA
BLANCA (WSSV)**

**POR:
M en C. DANIEL ENRIQUE GODINEZ SIORDIA**

**TESIS
APROBADA POR LA**

**UNIDAD MAZATLÁN
EN ACUICULTURA Y MANEJO AMBIENTAL**

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

Hermosillo, Sonora a 26 de enero de 2012

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del director del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD).

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director de tesis.

Dr. Ramón Pacheco Aguilar

Director General

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para revisar la tesis de *Daniel Enrique Godínez Siordia*, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Doctor en Ciencias.

Dra. María Cristina Chávez Sánchez
Directora de Tesis

Dra. Silvia Gómez Jiménez
Co Directora de Tesis

Dra. Silvia Alejandra García Gasca
Asesora

Dr. Luis Jorge García Márquez
Asesor

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD, A.C. Unidad Hermosillo y Mazatlán), por el apoyo prestado durante el posgrado. Además al Programa de Mejoramiento al Profesorado (PROMEP) de la Secretaría de Educación Pública (SEP) por el apoyo otorgado y al Centro Universitario de la Costa Sur (CUCSUR) de la Universidad de Guadalajara (UdeG) por la licencia prestada a lo largo de mis estudios.

Quiero agradecer a Dios por permitirme alcanzar una meta más en mi vida y servir de ejemplo para mi familia. También quiero agradecer a San Judas Tadeo, Don Jesús Malverde, la Virgen de la Balbaneda y la Virgen de Guadalupe por su intervención para lograr culminar este proyecto.

A la Dra. Gloria Yépiz Plascencia y a su grupo, por su enorme apoyo, paciencia y sabiduría compartida durante mi primer año de estudios; también quiero agradecer profundamente a la Dra. Ana María Calderón de la Barca por sus amables consejos y facilidades recibidas para continuar mi doctorado. Al Dr. Pablo Almazán Rueda y Dr. Miguel Betancourt Lozano por toda su ayuda y hospitalidad brindada durante mi estancia en Mazatlán. A su vez un agradecimiento muy especial a la Dra. María Cristina Chávez Sánchez por sus finas atenciones para recibirme como su estudiante y brindarme todo el apoyo y preocuparse tanto para terminar en tiempo y en forma este compromiso académico, muchas gracias apreciable Doctora; además quiero agradecer también a la M en C. Selene Abad Rosales, por su atención y paciencia hacia mi persona durante mi trabajo en el laboratorio de histopatología, muchas gracias. También quiero agradecer a la Dra. Silvia Alejandra García Gasca por sus atinadas correcciones a los artículos y al presente documento, aparte por todas sus facilidades otorgadas para trabajar en su laboratorio, además a la M en C. Rubí Hernández Cornejo por su paciencia y disposición. Muchas gracias. Al Dr. Luis Jorge García Márquez por su amistad y apoyo a lo largo de este camino que hoy culmina. También quiero agradecer a la Dra. Silvia Gómez Jiménez por todo el apoyo brindado a lo largo de estos cuatro largos años y a su equipo de trabajo: Alonso, Rosalva, Alberto, Karina y a los estudiantes: Armando y a las chicas super poderosas: Betzabé, Chayito y Lupita (CIAD, Hermosillo); a su vez a mis compañeros doctorantes en CIAD Mazatlán: M en C. Ileana Espinoza Valles, M en C. Belisario Leyva Morales, M en C. Annelisse Bárcenas Ibarra, M en C. Juan Pablo

Ceyca Contreras, y a la Biol. Rocío Quezada Rodríguez, al igual que al Ing. Alberto Duran Niebla, muchas gracias por su amistad y confianza, siempre me acordaré de todos ustedes compañeros!. En especial quiero agradecer infinitamente a todos mis ex compañeros de carrera y maestros de CESUES Navojoa, que siempre han estado al pie del cañón para apoyarnos entre todos como una fraternidad incondicional y que sin ellos hubiese sido imposible terminar mi doctorado. Especialmente al Dr. Manuel Martín Mariscal Lagarda, M en C. José Luis Esquer (gracias al personal del modulo de CESUES del Tronconal: a José y a los Ingenieros, muchas gracias por todo compas!). También a mis ex compañeros de carrera, Ing. Juan Carlos Ruiz Moreno, Ing. Héctor Manuel Rivera Valenzuela, en especial Ing. Cornelio Pérez Reyes, pieza clave en este proyecto. Al Ing. Gildardo Chávez, Ing. Ramón Carreño con quienes también quisiera compartir este logro. También en esta misma fraternidad se incluyen los Drs. Luis Carlos Bravo Peña, Wilfrido Torres Arreola y mis padrinos de boda: Drs. Antonio García Triana e Hilda M. Gracia Valenzuela; todos ellos ex compañeros de mil batallas en la travesía por el duro camino del doctorado. En un apartado muy especial quiero agradecer a todos mis ex compañeros y ex jefes con quien compartí mis primeros años en la industria del cultivo de camarón y que su incondicional apoyo fue invaluable: Ing. Jesús Herrera, Biol. Cesar Patiño, Biol. Adolfo Pérez, Biol. Julio Figueroa, Biol. Antonio Jubera, Biol. Roberto Kawaminami, Ing. Jesús Reyna, Ing. Adolfo Carrasco, Ing. Javier Blasco, Ing. Juan Carlos López, Biol. Guillermo Portillo, Ing. Aurora Ayala, Ing. Ernesto Gómez (Chindo), Ing. Cesáreo Cabrera. Muchas gracias a todos!, saben que cuentan conmigo siempre!.

No podría faltar mis más sinceros agradecimientos a las familias Lara-Medina y Medina-Verdugo en Navojoa, Son; por tantos momentos gratos, por su hospitalidad durante la estancia en Sonora, momentos que serán inolvidables, muy en especial al patriarca: Don Jorge Medina Anaya, mi entrañable suegro con quien siempre compartí mis triunfos y frustraciones, me brindó sus consejos y confió plena y absolutamente en que este proyecto saldría adelante. A mi muy apreciado compadre QB. José Guadalupe Arce Ibarra, con quien también compartí muchas alegrías y sin sabores, y que me apoyó en una parte sustancial de los análisis, que sin esto, simplemente no habría podido concluir el trabajo, muchas gracias compa!, este triunfo también es tuyo!..

A mis padres Dr. Daniel E. Godínez Abarca y C.P. Liboria Siordia Morales quienes siempre me han apoyado y se han preocupado por mí y mis hermanos al dejarnos la herencia más preciada e inagotable: El estudio... Gracias, muchas gracias por brindarme las bases y el apoyo infinito en todo. A mis hermanos de sangre y hermano civil: M en A. Alicia del Rocío Godínez Siordia, Ing. Ricardo A. Olivera Barbosa, Ing. Erick M. Godínez Siordia, muchas gracias por su apoyo incondicional, siempre que los necesité estuvieron allí, prestos.

A mi familia por soportarme y ayudarme, además de acompañarme en mis desvelos con mis muestreos y análisis, fue muy gratificante sentirlos conmigo en esas largas jornadas sin respetar fines de semana, vacaciones.....Gracias....Infinitas gracias.....

DEDICATORIA

Este esfuerzo por alcanzar un doctorado se lo debo a la energía interior motivada por mi familia, el motor que hace funcionar todo mi ser y por el cual alcance este sueño, que en muchos momentos parecía una horrible pesadilla; pero la fortaleza que me brindó el amor y la unión familiar lograron superar todas las adversidades y me permitieron continuar hasta llegar a.... El fin...

Este doctorado te lo dedico a ti Sebastián que con tu alegría diaria me motivabas y me llenabas de energía al oírte jugar feliz... pleno....sano.

A Sky, que con su mirada y siempre su disposición para jugar me quitaba el pesado día de encima.

A ti Daniel por ser un pilar sólido en esta familia, con tu fortaleza interna me motivabas a no claudicar y seguir adelante pese las duras adversidades.

A mi hermosa princesa, mi eterno amor, única dueña de mis penas, mis alegrías, mis entregas y quincenas... Tú...mi Socorrito... tienes una parte muy especial en este trabajo, y en esta nueva etapa de nuestra vida que inicia...vida que ahora y siempre será de la mano... sin separarnos por nada ni nadie.... Hasta envejecer juntos...promesa y dulce condena... Te amo por siempre y para siempre.....mi eterno y único...verdadero amor.....

"államiika yeu púhua... jséjtul juchéntoko

yeu púhua sin eria.....buëituk kaita jítasu eria....."

RESUMEN

La industria del cultivo de camarón está sufriendo pérdidas ocasionadas por enfermedades infecciosas, esto ha ocasionado que se propongan herramientas de evaluación bioquímica para apoyar en el diagnóstico de salud y estado nutricional de los camarones. En este sentido este trabajo aporta referencias sobre el desarrollo de la enfermedad de la mancha blanca en juveniles de *L. vannamei* al estar sujeto a diversas condiciones de temperatura (20, 27 y 33°C) y salinidad (5, 15 y 35 g/l) cuantificando carga viral, señalando lesiones macro y microscópicas en los diversas etapas de la enfermedad al igual que el seguimiento de la sobrevivencia y concentraciones de metabolitos. La temperatura y la salinidad del medio acuático intervinieron parcialmente en la concentración de metabolitos en hemolinfa de juveniles de *L. vannamei* sanos y en desafío al virus de la mancha blanca (WSSV). Se detectó la mayor concentración de carga viral en el tratamiento formado por 27°C y 5 g/l alcanzando una concentración de 2.5×10^6 copias de DNA viral/ μ l después de las 48 hpi. Los análisis histopatológicos realizados a los juveniles acondicionados a 33°C presentaron lesiones leves a moderadas sin la detección de cargas virales por PCR en hemolinfa; el daño ocasionado por la enfermedad se incrementa en mayor medida en los camarones acondicionados a 27°C. El tratamiento cuya combinación de 33°C de temperatura y 15 g/l de salinidad fue en donde se registró la mayor sobrevivencia (65%) de juveniles de *L. vannamei* al desafío del virus de la enfermedad de la mancha blanca.

Palabras clave: *Litopenaeus vannamei*, WSSV, salinidad, temperatura, capacidad osmótica

ABSTRACT

The shrimp farming industry is coping heavy losses caused by infectious diseases resulting, in recent years, in the development of research strategies aimed to the improvement of shrimp immunity, increasing resistance and survival in aquaculture. These strategies include biochemical tools to assist the diagnosis of health and nutritional status of the shrimp. In this way, this work investigates the development of white spot disease in juveniles of the white shrimp *L. vannamei* under different conditions of temperature (20, 27, 33°C) and salinity (5, 15, 35 g/l). Several parameters such as viral load quantification, gross and microscopic lesions in various stages of the disease, as well as survival and metabolite concentrations were measured. Both temperature and salinity of the water were partially involved in the concentration of metabolites in haemolymph of healthy and white spot virus (WSSV)-challenged shrimp; the highest viral load concentration was detected at 27°C and 5 g/l reaching a concentration of 2.5×10^6 copies/ μ l of viral DNA after 48 hpi. The histopathological examination of juveniles at 33°C showed mild to moderate injuries without viral load detection by PCR in haemolymph, the damage caused by the disease increased in shrimp at 27°C. The combination treatment of 33°C and 15 g/l showed the highest survival rate in *L. vannamei* juveniles challenged with the white spot disease virus.

Key Words: *Litopenaeus vannamei*, WSSV, salinity, temperature, osmotic capacity

ÍNDICE GENERAL

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL.....	2
APROBACIÓN.....	3
AGRADECIMIENTOS.....	4
DEDICATORIA.....	7
RESUMEN.....	8
ABSTRACT.....	9
ÍNDICE GENERAL.....	10
LISTA DE CUADROS.....	12
LISTA DE FIGURAS.....	13
I. INTRODUCCIÓN.....	16
II. ANTECEDENTES.....	20
III. HIPÓTESIS.....	24
IV. OBJETIVOS.....	25
V. MATERIAL Y MÉTODOS.....	26
5.1. Diseño experimental.....	26
5.2. Obtención de juveniles de <i>Litopenaeus vannamei</i>	27
5.3. Sistema de recirculación.....	27
5.4. La cepa viral e inoculación.....	28
5.5. Muestreo y obtención de hemolinfa.....	29
5.6. Análisis de la infección viral.....	29
5.7. Análisis histopatológico.....	30
5.8. Supervivencia.....	30
5.9. Respuestas metabólicas.....	30
5.9.1. Análisis bioquímico de hemolinfa.....	30
5.9.2. Determinación de capacidad osmótica.....	30
5.10. Análisis de resultados.....	31
VI. RESULTADOS.....	32
6.1. Análisis confirmativo de la infección viral.....	32
6.2. Análisis de la infección viral.....	34
6.3. Desarrollo de la enfermedad de la mancha blanca (WSSV).....	40
6.3.1. Lesiones a nivel macroscópico.....	52
6.3.2. Lesiones a nivel microscópico.....	57

6.3.2.1. Lesiones G1 (ligeras).....	58
6.3.2.2. Lesiones G2 (Moderadas).....	59
6.3.2.3. Lesiones G3 (Severas).....	60
6.4. Supervivencia.....	61
6.4.1. Correlación entre concentración viral y supervivencia.....	65
6.5. Respuestas metabólicas.....	66
6.5.1. Análisis bioquímico de hemolinfa.....	66
6.5.1.1. Glucosa.....	66
6.5.1.2. Colesterol.....	67
6.5.1.3. Triacilglicéridos.....	67
6.5.1.4. Lactato.....	67
6.5.1.5. Proteínas totales.....	67
6.5.1.6. Hemocianina.....	68
6.5.2. Comportamiento osmótico.....	70
6.5.2.1. Presión osmótica.....	70
6.5.2.2. Capacidad osmótica.....	72
6.5.2.3. Determinación de puntos isosmóticos.....	72
6.5.2.4. Correlación entre supervivencia y capacidad osmótica.....	75
VII. DISCUSIÓN.....	77
7.1. Análisis de la infección viral.....	78
7.2. Desarrollo de la enfermedad de la mancha blanca (WSSV).....	80
7.3. Supervivencia.....	81
7.4. Respuestas metabólicas.....	83
VIII. CONCLUSIONES.....	95
IX. LITERATURA CITADA.....	97
X. ANEXOS.....	115

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Conformación de los tratamientos de prueba a partir de la combinación de temperatura y salinidad.....	27
Cuadro 2. Desarrollo de la enfermedad de la mancha blanca (WSSV) en juveniles de <i>L. vannamei</i> sujetos a condiciones de 20°C y 35 g/l.....	41
Cuadro 3. Desarrollo de la enfermedad de la mancha blanca (WSSV) en juveniles de <i>L. vannamei</i> sujetos a condiciones de 27°C y 35 g/l.....	43
Cuadro 4. Desarrollo de la enfermedad de la mancha blanca (WSSV) en juveniles de <i>L. vannamei</i> sujetos a condiciones de 33°C y 35 g/l.....	44
Cuadro 5. Desarrollo de la enfermedad de la mancha blanca (WSSV) en juveniles de <i>L. vannamei</i> sujetos a condiciones de 20°C y 15 g/l.....	45
Cuadro 6. Desarrollo de la enfermedad de la mancha blanca (WSSV) en juveniles de <i>L. vannamei</i> sujetos a condiciones de 27°C y 15 g/l.....	46
Cuadro 7. Desarrollo de la enfermedad de la mancha blanca (WSSV) en juveniles de <i>L. vannamei</i> sujetos a condiciones de 33°C y 15 g/l.....	47
Cuadro 8. Desarrollo de la enfermedad de la mancha blanca (WSSV) en juveniles de <i>L. vannamei</i> sujetos a condiciones de 20°C y 5 g/l.....	48
Cuadro 9. Desarrollo de la enfermedad de la mancha blanca (WSSV) en juveniles de <i>L. vannamei</i> sujetos a condiciones de 27°C y 5 g/l.....	49
Cuadro 10. Desarrollo de la enfermedad de la mancha blanca en juveniles de <i>L. vannamei</i> sujetos a condiciones de 33°C y 5 g/l.....	51
Cuadro 11. Matriz de correlación entre la tasa de sobrevivencia y carga viral de <i>L. vannamei</i> en desafío al WSSV sujetos a diferentes temperaturas (20, 27 y 33°C) y concentraciones de salinidad (5, 15 y 35 g/l).....	65
Cuadro 12. Concentraciones promedio \pm desviación estándar de metabolitos en hemolinfa de juveniles de <i>L. vannamei</i> sanos (C) e infectados (I) a diferentes temperaturas (20, 27 y 33°C) y salinidades (5, 15 y 35 g/l) del agua	69
Cuadro 13. Comparación de la presión osmótica (mmol/kg) de hemolinfa y medio acuático entre juveniles de <i>L. vannamei</i> en desafío a WSSV y sanos, sujetos a diversas condiciones de temperatura (20, 27 y 33°C) y salinidad (5, 15 y 35 g/l).....	71
Cuadro 14. Matriz de correlación entre la tasa de sobrevivencia y capacidad osmótica de juveniles de <i>L. vannamei</i> en desafío al WSSV sujetos a diferentes temperaturas (20, 27 y 33°C) y concentraciones de salinidad (5, 15 y 35 g/l).....	76

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Análisis de los productos de PCR de <i>L. vannamei</i> infectado con el virus de la mancha blanca (WSSV).....	33
Figura 2. Corte histológico de epitelio gástrico y tejido conectivo de organismos en desafío al virus de la mancha blanca (WSSV) con grado severo de la enfermedad.....	34
Figura 3. Análisis de qPCR en muestras de hemolinfa de juveniles de <i>L. vannamei</i> en desafío al virus de la mancha blanca (WSSV).....	35
A. Tratamiento 20°C/35 g/l	
B. Tratamiento 27°C/35 g/l	
C. Tratamiento 33°C/35 g/l	
Figura 4. Análisis de qPCR en muestras de hemolinfa de juveniles de <i>L. vannamei</i> en desafío al virus de la mancha blanca (WSSV).....	37
A. Tratamiento 20°C/15 g/l	
B. Tratamiento 27°C/15 g/l	
C. Tratamiento 33°C/15 g/l	
Figura 5. Análisis de qPCR en muestras de hemolinfa de juveniles de <i>L. vannamei</i> en desafío al virus de la mancha blanca (WSSV).....	39
A. Tratamiento 20°C/5 g/l	
B. Tratamiento 27°C/5 g/l	
C. Tratamiento 33°C/5 g/l	
Figura 6. Lesiones macroscópicas en cutícula y epidermis con daño de melanización leve (G1) multifocal, observadas en juveniles de <i>L. vannamei</i> en desafío al virus de la mancha blanca (WSSV).....	52
Figura 7. Lesiones macroscópicas en cutícula y epidermis con daño de melanización leve a moderada multifocal coalecente (G1-G2), observadas en juveniles de <i>L. vannamei</i> en desafío al virus de la mancha blanca (WSSV).....	53
A. Melanización en segmentos abdominales en la sección dorsal.	
B. Lesiones multifocales coalescentes en cutícula y epidermis con melanización leve a moderado. Imagen con acercamiento 2x.	
Figura 8. Lesiones macroscópicas en cutícula y epidermis con daño de melanización moderada multifocal (G2), observadas en juveniles de <i>L. vannamei</i> en desafío al virus de la mancha blanca (WSSV).....	54
A. Melanización en cefalotórax, segmentos abdominales en la sección ventral, media y dorsal y télson.	
B. Lesiones multifocales coalescentes y sufuciones en cutícula y epidermis con melanización moderada. Imagen con acercamiento 2x.	

Figura 9. Lesiones en cutícula y epidermis con daño de melanización multifocal moderada-severa (G2-G3) observadas en juveniles de <i>L. vannamei</i> en desafío al virus de la mancha blanca (WSSV).....	55
A. Melanización en cefalotórax y segmentos abdominales en la sección ventral, media y dorsal.	
B. Lesiones multifocales coalescentes y puntuales en cutícula y epidermis con melanización moderada. Acercamiento 2x.	
C. Área de mineralización. Acercamiento 2x.	
Figura 10. Lesiones macroscópicas en cutícula y epidermis con daño de melanización y mineralización multifocal con áreas de necrosis focal severa (G3) observadas en juveniles de <i>L. vannamei</i> en desafío al virus de la mancha blanca (WSSV).....	56
A. Melanización en cefalotórax y segmentos abdominales en la sección ventral, media y dorsal.	
B. Lesiones multifocales coalescentes en cutícula y epidermis con melanización severa; imagen con acercamiento 2x.	
C. Zonas de necrosis con pérdida de cutícula y epidermis; imagen con acercamiento 4x.	
D. Área de mineralización, acercamiento 4x.	
Figura 11. Lesiones microscópicas grado ligero (G1) observadas en juveniles de <i>L. vannamei</i> en desafío al virus de la mancha blanca (WSSV); se señalan con flechas la presencia de CIIN. Tinción H&E. Escala de la barra 10 µm.....	58
A. Tejido Hematopoyético 40x	
B. Tejido conectivo de epitelio dérmico 40x	
C. Branquias 40x.	
Figura 12. Lesiones microscópicas (G2) observadas en juveniles de <i>L. vannamei</i> en desafío al virus de la mancha blanca (WSSV); se señalan con flechas la presencia de CIIN. Tinción H&E. Escala de la barra 10 µm.....	59
A. Branquias 40x	
B. Epitelio dérmico 40x.	
Figura 13. Lesiones microscópicas (G3) observadas en juveniles de <i>L. vannamei</i> en desafío al virus de la mancha blanca (WSSV); se señalan con flechas la presencia de CIIN. Tinción H&E. Escala de la barra 10 µm.....	60
A. Epitelio dérmico 40x	
B. Branquias 40x	
C. Tejido conectivo epidermis 40x	
D. Glándula antenal 40x.	
Figura 14. Tasa de sobrevivencia de juveniles de <i>L. vannamei</i> sanos (C) e infectados con el virus de la mancha blanca (WSSV) (I), registrada en diferentes temperaturas (20, 27 y 33°C) a 35 g/l de salinidad.....	62

Figura 15. Tasa de sobrevivencia de juveniles de <i>L. vannamei</i> sanos (C) e infectados con el virus de la mancha blanca (WSSV) (I), registrada en diferentes temperaturas (20, 27 y 33°C) a 15 g/l de salinidad.....	63
Figura 16. Tasa de sobrevivencia de juveniles de <i>L. vannamei</i> sanos (C) e infectados con el al virus de la mancha blanca (WSSV) (I), registrada en diferentes temperaturas (20, 27 y 33°C) a 5 g/l de salinidad.....	64
Figura 17. Capacidad osmorreguladora de juveniles sanos (C) y en desafío al virus de la mancha blanca (WSSV) (I) de <i>L. vannamei</i> en diferentes condiciones de temperatura (20, 27 y 33°C) y salinidad (5, 15 y 35 g/l).....	72
Figura 18. Relación entre la osmolaridad de la hemolinfa y osmolaridad del medio en juveniles de <i>L. vannamei</i> en desafío al virus de la mancha blanca (WSSV) (I) a diferentes condiciones de temperatura (20, 27 y 33°C) y salinidad (5, 15 y 35 g/l).....	73
Figura 19. Relación entre la osmolaridad de la hemolinfa y osmolaridad del medio en juveniles sanos (C) de <i>L. vannamei</i> a diferentes condiciones de temperatura (20, 27 y 33°C) y salinidad (5, 15 y 35 g/l).....	75

I. INTRODUCCIÓN

El cultivo de camarón como una actividad pecuaria permite un desarrollo económico considerable, sin embargo, en México, una deficiente planificación y vacíos en los marcos de regulación gubernamentales han evitado el desarrollo sustentable de esta actividad. Por un lado, el uso del agua y el suelo para la crianza de organismos acuáticos ha deteriorado los ecosistemas costeros, induciendo la contaminación de estos ambientes y la limitación en el hábitat de muchas especies (Peña, 2009). La contaminación por nutrientes de los efluentes de las unidades de producción ha provocado la propagación de muchas enfermedades que afectan a la misma industria camaronícola (Martínez-Córdova et al., 2009); asociado a esto, la camaronicultura debe efectuar una serie de cambios en los paradigmas que hasta ahora se han manejado en busca de la sustentabilidad, esforzándose por crear un impacto ambiental mínimo y reducir al máximo los posibles brotes de enfermedades (Zarain-Herzberg, 2003). Ante toda esta problemática se encuentra en proceso el desarrollo de diferentes tecnologías amigables con el ambiente acuático, utilizando medidas de mitigación acordes con la aplicación de diversas estrategias como es la sedimentación de biopartículas y la biofiltración por moluscos bivalvos, además de la absorción con la ayuda de algas en el tratamiento de los efluentes generados por el cultivo de camarón (Ramos et al., 2010). Por otro lado, para no seguir impactando la zona costera, desde hace algunos años se desarrollan tácticas en la modalidad de producción de camarón en ambientes no tradicionales como es el caso del cultivo a baja salinidad en zonas desérticas, como los que se realizan en la península Arábiga con especies de camarón nativas ó de los cultivos desarrollados en el desierto de Arizona, E.U.A con *Litopenaeus vannamei* (Ochoa et al, 2006). Esta estrategia se encuentra en expansión en muchos países del mundo como Ecuador, Tailandia y Vietnam que tradicionalmente son productores de camarón en agua marina, alcanzando con esta modalidad más del 30% de su producción total (Saoud et al., 2003; Sakamoto et al., 2009). En México se han desarrollado sistemas de producción de este tipo en muchas entidades, entre las cuales destacan Colima, Jalisco, Baja California, Hidalgo, Guerrero, Sonora, Sinaloa y Oaxaca; en donde se utiliza agua con

un amplio rango de salinidades, existiendo valores incluso menores a 0.5 g/l (Olivas y Cáceres, 2003; Angulo et al., 2005; Ñonthe, 2006; Mariscal et al., 2007; Rendón et al. 2008; Valenzuela et al., 2010; Zavala *com. pers.* 2011; Comité de Sanidad Acuícola de Baja California, 2010 *com. pers.*). Hoy en día bajo cualquier sistema de producción que se utilice, ya sea en ambientes costeros o continentales, la principal limitante para el éxito del cultivo de camarón depende principalmente del control de los patógenos (Lightner, 2011). Las elevadas densidades de siembra que son utilizadas en sistemas intensivos propician una rápida propagación de los agentes infecciosos, desencadenando mortalidades masivas y gastos económicos considerables (Lightner y Pantoja, 2001); sin embargo, existen otros factores estresantes tales como condiciones adversas del medio ambiente, mala nutrición y alimentación, aunado al inadecuado manejo del cultivo, desencadenando enfermedades infecciosas. Los organismos infecciosos que afectan al camarón incluyen bacterias, hongos, protozoarios y virus (Lightner, 1993); contra los tres primeros existen tratamientos específicos efectivos desde el uso de productos químicos, antibióticos, antimicóticos y probióticos; sin embargo no se cuenta con métodos eficaces contra los agentes de origen viral (Martínez y López, 2007). Aquellos virus que afectan a las especies de camarones penaeidos, producen lesiones generalizadas en diferentes órganos y tejidos de los organismos infectados, causando mortalidades masivas de hasta el 100% en los cultivos en períodos muy cortos de tiempo (Lightner, 2003). Hoy en día, se han descrito alrededor de 20 virus que afectan de manera directa o indirecta al camarón (Aguirre y Valle, 2000); no obstante Lightner (2011) considera a TSV (virus del síndrome de Taura), IHNV (virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa), YHV (virus de la cabeza amarilla), IMNV (virus de la mionecrosis infecciosa) y WSSV (el virus de la mancha blanca), como los de mayor incidencia en el continente Americano y que han ocasionado fuertes impactos sociales además de cuantiosas pérdidas económicas. El virus de la mancha blanca (WSSV) es un patógeno cuyo material genético consiste en DNA de doble cadena, y fue asignado a la familia Nimaviridae y al género de *Whispovirus* (Mayo, 2002). El tamaño de su genoma es de aproximadamente 300 Kb y su distribución geográfica incluye Asia y América. Todos los crustáceos que

habitan ambientes marinos, salobres o dulceacuícolas presentan susceptibilidad a esta infección (Lightner, 1996); la epizootia se caracteriza por una rápida y creciente mortalidad, presentando un cuadro clínico muy corto antes de la muerte que incluye síntomas de anorexia, letargo así como la aparición de pequeñas manchas blancas de 0.5 a 2.0 mm de diámetro en la superficie del caparazón del cefalotórax (Bondad et al., 2001). Sin embargo en ocasiones no se aprecian estas manchas, lo cual se asume que podría ser a consecuencia de las condiciones asociadas a la temperatura (Ochoa et al., 2006), que de alguna manera intervienen en la subexpresión de la proteína DD9A que participa en la calcificación del exoesqueleto, perturbando de este modo el metabolismo del calcio en el camarón (Endo et al., 2004). Se piensa que una disminución en la regulación del calcio podría tener efectos graves en la homeostasis del camarón dado que varios factores relacionados a la respuesta inmune son calcio-dependientes, tales como las transglutaminasas (Wang et al., 2006; Bustillo et al., 2009).

En este contexto, es necesario monitorear el estado fisiológico de los camarones en cultivo como una medida del conocimiento del estado de salud y con ello, proporcionar elementos de decisión que ayuden a mejorar la rentabilidad de esta actividad productiva. En este sentido diversos grupos de investigación en varias partes del mundo se han dedicado a la búsqueda de indicadores del estado nutricional e inmunológico del camarón con el fin de contar con herramientas efectivas de diagnóstico. Sobre esto, destacan los trabajos llevados a cabo por Rodríguez et al. (2000) en donde se analizaron los efectos de la dieta sobre la respuesta inmune de juveniles de *Litopenaeus vannamei* y los estudios realizados con la presión osmótica como indicador fisiológico de salud y nutrición en *L. stylirostris* y *Penaesus japonicus* (Lignot et al., 1997; Lignot et al., 1999; Lignot et al., 2000). A su vez desde hace tiempo se han desarrollado investigaciones sobre metabolitos en camarón como son: glucosa, colesterol, acilglicéridos, proteínas, hemocianina, lactato y presión osmótica, además de la respuesta inmune (actividad de la profenol oxidasa, concentración y diferenciación de hemocitos) en hemolinfa de *L. vannamei*, *L. stylirostris* y *L. setiferus*, como indicadores del sano funcionamiento del organismo (Rosas et al., 2000; Sánchez et al., 2001; Rosas et al., 2001a; Rosas et al., 2001b; Rosas et al.,

2002a). Por otro lado, el monitoreo de la capacidad osmótica es un parámetro que sirve también como bioindicador del estado de salud de los crustáceos ya que este parámetro fisiológico se ve alterado a consecuencia del deterioro en órganos excretores y branquias repercutiendo en cambios en la actividad de la Na/K-ATPasa, flujos iónicos y en la permeabilidad de las membranas (Lignot et al., 2000). En investigaciones realizadas con *L. vannamei* y *Penaeus monodon* se han encontrado que parámetros fisicoquímicos del agua como la temperatura, salinidad, y concentración de hemocitos en su hemolinfa; juegan un importante papel en el sistema inmune (Vidal et al., 2001; Granja et al., 2003; Joseph y Philip, 2007; Carbajal et al., 2008). Estudios han dado mayor énfasis a que la elevada temperatura del agua (33°C) favorece el sistema inmune y que a su vez afecta la replicación viral, principalmente la del virus de la mancha blanca (Guan et al., 2003; Rahman et al., 2006; You et al., 2010). A pesar del cúmulo de información, los resultados de laboratorio no pueden ser aplicados directamente a las granjas debido a que, por un lado, los organismos cultivados frecuentemente experimentan condiciones muy diferentes a las que experimentan los animales del laboratorio, principalmente variaciones en los parámetros fisicoquímicos del agua y en la alimentación (Anderson et al., 1987) lo que hace difícil la comparativa; razón por la cual hasta el día de hoy no existe un registro patrón de referencias en los parámetros hemolinfáticos que permitan establecer con alguna certeza la variación normal de los parámetros fisiológicos e inmunológicos en los camarones. El presente trabajo pretende contribuir a este acervo de información para que en un futuro no muy lejano se pueda contar con estrategias eficaces para contrarrestar el virus de la mancha blanca.

II. ANTECEDENTES

Desde finales de los 90s, el virus de la mancha blanca ha sido el que más ha impactado económicamente a la mayoría de las granjas camaronícolas del mundo, ya que ha llegado a causar hasta el 100% de mortalidad acumulada dentro de los dos a diez días posteriores a la aparición de signos de la enfermedad (Lightner 2003). En un tiempo se pensó como estrategia ofensiva a esta enfermedad que el cultivo de *L. vannamei* a bajas salinidades afectaría el poder infeccioso del virus, pero al desarrollar estudios con juveniles de esta especie en ambientes con diferentes condiciones hipotónicas, los resultados mostraron lo inverso ya que se descubrió un mayor grado de infección en aquellos organismos cuyas salinidades se encontraban entre los 5 y 15 g/l (Carbajal et al., 2008; Ochoa et al., 2006); lo descubierto indica que el virus de la mancha blanca infecta al camarón aún en bajas salinidades. Además del virus de la mancha blanca existen virus que comparten hospedaje con crustáceos a cualquier salinidad como ejemplo se encuentran el virus HPV (Parvovirus hepatopancreático), PvNV (Nodavirus de *L. vannamei*) y MrNV (Nodavirus de *Macrobrachium rosenbergii*), esto señala que ningún ambiente cual fuere su salinidad, se encuentra exento de las infecciones virales para el cultivo de crustáceos (Bonami y Widada, 2011).

Por otra parte, investigaciones realizadas en los últimos años reportan que existe una relación entre el aumento de la temperatura del agua sobre el sistema inmune en juveniles de *L. vannamei* sujetos a una infección con el virus de la mancha blanca, demostrando que esta condición facilita la apoptosis de células infectadas además de reducir la replicación viral, permitiendo con esto que el camarón pueda controlar la enfermedad y sobrevivir (Rodríguez et al., 2003; Granja et al., 2006; Rahman et al., 2007; Reyes et al., 2007).

Por otra parte se han desarrollado estudios sin que la hipertermia del agua sea un parámetro establecido, en donde se han detectado alteraciones en hemocitos y de algunos metabolitos en la hemolinfa de camarón que han servido como indicadores del estado fisiológico y de salud en juveniles de *L. vannamei*, *L. setiferus* y *F. duorarum* (Rosas et al. 2001a; Rosas et al. 2001b; Rosas et al. 2007); así mismo, se han reportado cambios en la

concentración de glucosa, triacilglicéridos, colesterol y proteínas que se pueden utilizar como indicadores de estrés causado por agentes infecciosos en juveniles de *L. vannamei* (Pascual et al., 2003a). Entre los carbohidratos, la glucosa es la fuente principal de energía del organismo y es necesaria para la formación de quitina, glucoproteína que forma el exoesqueleto; a su vez es indicador del metabolismo de los carbohidratos y de su nivel en la dieta, además se ha observado que los niveles de éste suelen elevarse rápidamente cuando los camarones son sometidos a estrés sin importar el origen (Rosas et al., 2001c; Rosas et al., 2002b). Otro valioso indicador hemolinfático es la concentración de colesterol; de acuerdo con Rosas et al., (2002a), una mayor concentración de este metabolito en la hemolinfa indica una mayor necesidad del mismo para la conformación de la hormona de la muda, además que sirve como precursor de la vitamina D (controla la digestión y almacenamiento de calcio) y de hormonas esteroides (hormona de la muda y las involucradas en la reproducción (Rosas et al. 2007). Los triglicéridos, son la mayor fuente de energía de los camarones (molécula de almacenamiento de energía), una menor concentración de éste indica una mayor movilización de los mismos hacia la epidermis. Los triglicéridos son procesados y almacenados en la hemolinfa para su distribución en diferentes tejidos, esto ocurre cuando no es posible su almacenamiento en hepatopáncreas (Rosas et al. 2002a). El lactato, producto del metabolismo de carbohidratos y precursor de la glucosa, se asocia a condiciones de estrés, por la activación del metabolismo anaerobio. La lactato deshidrogenasa (LDH) es la enzima encargada de convertir el piruvato a lactato en condiciones anaerobias (Maekawa, 1988). Esta reacción sucede cuando el piruvato se acumula por disminución de la velocidad del ciclo de Krebs, por lo que las células obtienen la energía mediante el metabolismo anaerobio (Mathews, 2002); este proceso puede llevarse a cabo cuando un organismo es sometido a un estrés a consecuencia de una enfermedad (Ruan et al., 2010) o a condiciones de hipoxia-anoxia producto de lesiones en branquias. En condiciones de anaerobiosis causada por hipoxia el metabolismo anaerobio es una de las principales vías de obtención de energía o ATP (Adenosin trifosfato; en inglés: *Adenosine TriPhosphate*) (Mathews, 2002). Las proteínas, compuestos constituidos por unidades de

aminoácidos, no sólo ocupan una posición central por ser la base para la formación de enzimas, hormonas, componentes de la respuesta inmunitaria, sino que además intervienen directamente en la construcción de tejidos (crecimiento), y en la reparación y mantenimiento de estos. Asimismo, son fuente de energía en los procesos catabólicos y son esenciales en el metabolismo de carbohidratos y lípidos. La hemocianina es la principal proteína circulante en crustáceos, representando 60-97% de las proteínas plasmáticas en *L. vannamei* (Pascual et al., 2003a). Esta proteína principal de la hemolinfa de crustáceos, es una macromolécula metaloproteínica que tiene incorporado el cobre, el cual funciona como sitio activo acarreador de oxígeno (Rainer y Brouwer, 1993; Van Holde et al., 2001) contribuye a los mecanismos de defensa en los crustáceos (Nikerson y Van 1971; Desteumieux-Garzón et al., 2001). En el camarón como en el resto de los invertebrados las reacciones de defensa casi siempre están acompañadas de melanización. La fenoloxidasa es la enzima que cataliza la reacción de síntesis del pigmento de melanina; esta enzima se encuentra en forma inactiva dentro de los hemocitos y es el componente principal de un complejo sistema de reconocimiento y defensa llamado profenoloxidasa (Söderhäll y Cerenius, 1998). Existe mucha información referente a la determinación de la capacidad osmótica en crustáceos, sin embargo existe muy poca que señale el análisis de este parámetro fisiológico en juveniles de *L. vannamei* en desafío al virus de la mancha blanca. Uno de estos trabajos fue publicado por Ramos y Giffard (2009) en donde el objetivo del mismo fue conocer el efecto de la infección del virus de la mancha blanca en juveniles de *L. vannamei* adaptados a baja (5 y 15 g/l) y alta (28, 35, 54 g/l) salinidad a una temperatura de 28°C; detectando la mayor carga viral en la salinidad de 5 g/l a partir de las 35 horas post infección (hpi) con una concentración de 4.5×10^6 copias/ng DNA; a su vez observaron signos clínicos de la enfermedad a partir de las 24 hpi; el punto isosmótico registrado fue de 765 mmol/kg. El 100% de la mortalidad ocurrió a las 41, 43, 50, 56 y 61 hpi en 5, 54, 34, 28, 15 g/l, respectivamente.

El diagnóstico clínico e histopatológico de la enfermedad provocada por el virus de la mancha blanca señala la presencia o ausencia, de manchas o puntos blancos (0.5 a 3.0 mm) en la parte interior del cefalotórax y conforme

se desarrolla la enfermedad se distribuyen en todo el organismo; en ocasiones el organismo presenta un tono opaco o incluso rojizo por la expansión de los cromatóforos o rosado al igual que su hemolinfa, situación provocado por una inadecuada actividad de la fenoloxidasa plasmática, así como el incremento en la proporción de hemocitos hialinos y aparición en circulación de hemocitos con morfología alterada o atípicos (Motesdeoca et al., 2002), también presentan flacidez generalizada, pérdida de apéndices, antenas, pleópodos y pereiópodos, además de desprendimiento de cutícula (Tabar, 2010). Otros signos de la enfermedad incluyen anorexia, letargo y elevadas tasas de mortalidad del 70 al 100% en los primeros siete días de iniciada la infección (Kasornchandra et al., 1998, Sudha et al., 1998, Wang et al., 1999). Todos los crustáceos decápodos ya sean marinos, salobres y continentales, son considerados susceptibles a la infección (Tabar, 2010). A nivel microscópico existen cambios histopatológicos caracterizados por una amplia degeneración celular, severa hipertrofia nuclear y presencia de cuerpos de inclusión en tejidos principalmente de origen ectodérmico y mesodérmico, especialmente en pleópodos, branquias, epidermis cuticular, epitelio del intestino posterior (incluyendo el estómago), tejido conectivo, tejido hematopoyético, tejido nervioso, órgano linfoide, glándula antenal, músculo estriado, corazón, hemocitos y gónadas (Kasornchandra et al., 1998; Wang et al., 1999).

III. HIPÓTESIS

Dado el creciente desarrollo de la camaronicultura tierra adentro en ambientes con baja salinidad y el impacto del virus de la mancha blanca en los cultivos de camarón en ambientes salinos, se consideró necesario contribuir con información que permita conocer el efecto fisiológico y patológico en juveniles de *L. vannamei* en desafío al virus de la mancha blanca sujeto a diversas condiciones de salinidad y temperatura, por lo cual este estudio se fundamenta en las siguientes hipótesis de trabajo:

Hipótesis N°1 “Existe diferencia significativa en la concentración de metabolitos y capacidad osmótica detectada en hemolinfa de *L. vannamei* de organismos sanos y aquellos en desafío al virus de la mancha blanca”.

Hipótesis N° 2 “Existe una correlación positiva y significativa entre la sobrevivencia en ambientes hipertérmicos (33°C) y la concentración de copias virales en ambientes a baja salinidad (5 y 15 g/l)”.

Hipótesis N° 3 “Las condiciones de 33°C de temperatura y ambientes a baja salinidad (5 y 15 g/l) del medio acuático dificultan el desarrollo de la enfermedad provocada por el virus de la mancha blanca en juveniles de *L. vannamei*”.

IV. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Determinar el efecto de diferentes combinaciones de salinidad y temperatura del agua sobre las respuestas fisiológicas y patológicas de juveniles de *L. vannamei* infectados con el virus de la mancha blanca.

3.2 Objetivos específicos

1. Lograr la infección inducida por el virus de la enfermedad la mancha blanca en juveniles sanos de *L. vannamei* aclimatados a los diversos tratamientos de prueba.
2. Detectar y comparar en los diferentes tratamientos las concentraciones de DNA viral en los juveniles infectados con el virus de la mancha blanca.
3. Registrar las lesiones ocasionadas por el virus de la mancha blanca en juveniles de *L. vannamei* acondicionados a los diferentes tratamientos evaluados.
4. Evaluar la sobrevivencia de juveniles de *L. vannamei* en desafío al virus de la mancha blanca en los diversos tratamientos de prueba.
5. Determinar y comparar las respuestas metabólicas a partir del análisis de química hemolinfática y capacidad osmótica en juveniles de *L. vannamei*, sanos y en desafío al virus de la mancha blanca acondicionados a las diversas condiciones de temperatura y salinidad.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

Los experimentos se realizaron en el Laboratorio de Fisiología de Invertebrados Marinos de CIAD-Hermosillo, en donde se cuenta con una sala especial para el desarrollo de bioensayos bajo condiciones controladas, la cual consiste en una habitación pintada de color blanco con dimensiones de 3 x 5 m, con estructuras de metal, contenedores de fibra de vidrio, piedras difusoras, mangueras de diversos calibres y sistemas de recirculación de agua. Para el control de temperatura se utilizó un aire acondicionado de 24,000 BTU y calentadores de ambiente y sumergibles de titanio de 1000 watts. La sala cuenta con una red de distribución de aire conectada a un turbo soplador de 2 Hp (caballo de fuerza; en inglés: *Horsepower*). El aporte de agua de mar es almacenada en el exterior en tres tanques cerrados herméticamente y es distribuido al interior por una red de tuberías con la ayuda de una bomba de 1/2 Hp. El agua dulce provenía de un pozo profundo cuya red llega al interior de la sala. Para asegurar las condiciones de calidad de agua durante todo el experimento, el agua utilizada en los experimentos fue filtrada a través de un sistema de filtros de arena y cartucho asegurando con esto una capacidad filtrante de hasta 5 µm, para enseguida ser esterilizada por radiación UV (Anexo 1)

5.1. Diseño experimental

Los tratamientos de prueba fueron creados a partir de dos variables: Temperatura (20°C, 27°C y 33°C) y salinidad del agua (5 g/l, 15 g/l y 35 g/l), esto permitió llevar a cabo combinaciones para conformar nueve tratamientos de prueba, diseñándose un arreglo factorial 3x3 con cuatro repeticiones (Cuadro 1).

Cuadro 1. Conformación de los tratamientos de prueba a partir de la combinación de temperatura y salinidad

Temperatura °C	Salinidad (g/l)		
	5	15	35
20	20°C/5 g/l	20°C/15 g/l	20°C/35 g/l
27	27°C/5 g/l	27°C/15 g/l	27°C/35 g/l
33	33°C/5 g/l	33°C/15 g/l	33°C/35 g/l

5.2. Obtención de Juveniles de *Litopenaeus vannamei*

Para este experimento se utilizaron un total de 2880 juveniles de *L. vannamei* con un peso promedio 5.0 ± 1 gramos; estos ejemplares fueron amablemente donados por un centro de producción ubicado en la costa central del estado de Sonora. Previo al inicio del experimento los organismos se confinaron en un área aislada para confirmar su estado de salud a partir de análisis bacteriológicos y PCR para la detección de posibles agentes patógenos (WSSV, TSV, IHHNV y NHP). Una vez verificada la salud de los mismos, se procedió a introducirlos en los sistemas de recirculación en donde se llevó a cabo una aclimatación gradual.

5.3. Sistema de recirculación

Se emplearon sistemas con recirculación de agua independientes entre sí (Anexo 1). Cada sistema estaba compuesto por cuatro contenedores de fibra de vidrio de 100x50x30 cm conectadas en circuito; para recircular el agua se utilizaron bombas eléctricas de $\frac{1}{4}$ Hp las cuales permitían la circulación del agua a través de los tanques y de los filtros de grava y algodón diseñados para mantener la calidad de agua. En cada contenedor, el aporte de aire fue proporcionado por un par de piedras difusoras de poro mediano, conectada a la red de distribución de aire. La calidad de agua en todos los sistemas se logró gracias al monitoreo diario de los parámetros fisicoquímicos del agua, determinando temperatura, oxígeno disuelto y pH. El monitoreo de amonio y nitrito se realizó cada tercer día utilizando la técnica de Solórzano y Sharp (1980).

Se confinaron 40 juveniles por contenedor; durante todo el tiempo los organismos fueron nutridos con alimento balanceado con 35% de proteína (Camaronina 35, Purina®, México), suministrando el 10% según su biomasa repartida en dos raciones al día. Los restos del alimento, excretas y exubias se retiraron dos veces por día por sifoneo previo al suministro de alimento.

5.4. La cepa viral e inoculación

La cepa viral del virus de la mancha blanca fue donada por el Laboratorio de Fisiología de Invertebrados Marinos de CIAD-Hermosillo obtenida de organismos detectados por PCR (Reacción en cadena de la polimerasa; en inglés: *polymerase chain reaction*) como positivos a la infección. Para la preparación del inóculo viral se utilizó la técnica propuesta por Chou et al. (1998) (Anexo 2).

Previo a la inoculación, se cuantificó el inóculo viral mediante PCR en tiempo real (qPCR en inglés: *quantitative polymerase chain reaction*) detectándose 3.04×10^6 copias de DNA/ μ l.

Una vez alcanzadas las temperaturas de prueba y transcurridos diez días de acondicionamiento, se procedió a llevar a cabo el inicio de los experimentos mediante la inoculación con el virus en aquellos tratamientos que presentarían desafío a la enfermedad, para lo cual se utilizó una dilución de 2:1 con buffer TN 1X para infectar a los juveniles de *L. vannamei* por vía intramuscular con una jeringa para insulina de 0.5 ml con aguja de 0.33x12, inyectando entre el segundo y el tercer segmento abdominal, la dosis utilizada fue de 20 μ l por gramo de peso (Molina, 2009), equivalente a 60.8×10^6 copias de DNA/gramo de peso. Una vez inoculado el virus, los juveniles se retornaron a los tanques de procedencia.

Por otra parte, los organismos control (sin infección) también fueron sujetos a una inyección intramuscular, empleando la misma técnica y volumen de la solución de buffer que en la inoculación viral pero sin el agente patógeno; con esto se permitió igualar condiciones de manejo y estrés con los tratamientos infectados.

5.5. Muestreo y obtención de hemolinfa

La toma de muestra de hemolinfa se inició a partir de doce horas post infección (hpi). En cada sistema, tres de los cuatro tanques, sirvieron para determinar las variables metabólicas, extrayendo de cada repetición dos juveniles cada 12 h y así de manera consecutiva hasta el final del experimento, que fue determinado cuando la mortalidad acumulada del tanque de sobrevivencia (cuarto tanque de cada tratamiento) alcanzó al 100% de los organismos. En la toma de muestra sólo se contempló aquellos juveniles que se encontraban en intermuda identificando esta etapa según lo publicado por Robertson et al. (1987).

Es importante señalar que diez horas antes de la toma de muestra de hemolinfa, se suspendió la alimentación de los camarones, esto con el fin de evitar la interferencia del alimento en los resultados del análisis de parámetros sanguíneos (Rosas et al., 2002a).

Los juveniles se colocaron en cubetas con tapa cuyo interior contenía agua extraída de su mismo sistema de procedencia, con el fin de reducir el estrés durante la captura y el transporte al laboratorio.

Las muestras de hemolinfa fueron obtenidas utilizando una jeringa hipodérmica fría con 200 µl de solución fría de anticoagulante SIC-EDTA (Anexo 3) (Vargas-Albores et al., 1993) insertada en el seno ventral abdominal que irriga al quinto par de pereiópodos, extrayendo 100 µl de muestra para ser depositada y etiquetada en tubos eppendorf fríos de 1.7 ml.

La hemolinfa con el anticoagulante fue centrifugada a 800 g por tres min y el sobrenadante fue separado para la evaluación de la concentración de los metabolitos.

5.6. Análisis de la infección viral

Se realizaron análisis en la hemolinfa para determinar la cuantificación de la carga viral de la enfermedad de la mancha blanca por medio de PCR en tiempo real, con la ayuda del kit IQ REAL™ WSSV Quantitative System® (Farming IntelliGene) en cada uno de los tratamientos de prueba con sus respectivos controles positivos y negativos.

5.7. Análisis histopatológico

Los organismos sacrificados fueron fijados en solución Davidson (Anexo 4) por 48 h y transferidos a frascos con etanol al 70%. Los organismos se procesaron siguiendo el método convencional descrito por Bell y Lightner (1988) (Anexo 5). El diagnóstico de la infección, identificación de los cuerpos de inclusión y grado de severidad se basó en la descripción de Lightner (1996) (Anexo 6).

5.8. Sobrevivencia

La mortalidad se registró cada 12 horas en cada tanque de sobrevivencia. El final del experimento fue determinado cuando la mortalidad acumulada del tanque de sobrevivencia en desafío a la infección (cuarto tanque de cada tratamiento) alcanzó al 100% de los organismos.

5.9. Respuestas metabólicas

5.9.1 Análisis de bioquímico de hemolinfa

El análisis de la hemolinfa procedente de organismos sanos e infectados, se realizó determinando por espectrofotometría, la concentración de hemocianina (Hc) a partir de hemolinfa diluida en celdas de cuarzo de 1 ml con un espectrofotómetro con lámpara de luz ultravioleta a una absorbancia de 335 nm (Gómez-Jiménez, 1998). La concentración de glucosa, colesterol, triacilglicéridos (Tracilg.) lactato, proteínas totales (Prot. Tot.), se determinaron con el equipo Cobas Integra mod. 400 Plus, Roche Diagnostics®; siguiendo las especificaciones del fabricante.

5.9.2. Determinación de la capacidad osmótica

La capacidad osmótica se determinó en todos los tratamientos a partir de la diferencia entre la presión osmótica de la hemolinfa fresca y el medio externo (Rosas et al., 2007; Hurtado et al., 2007). La presión osmótica se determinó cada 12 h a partir de la extracción de 10 µl de hemolinfa fresca sin anticoagulante colectada en el seno ventral abdominal con la ayuda de una jeringa de insulina fría. La osmolaridad de la hemolinfa y del medio fueron determinadas con un osmómetro de presión de vapor marca

Wescor Vapro® modelo 5520; los datos fueron expresados en mmol/kg (Rosas et al., 2007; Hurtado et al., 2007).

5.10. Análisis de resultados

Los valores obtenidos fueron sometidos a las pruebas de normalidad de Lilliefors y de igualdad de Bartlett con la finalidad de decidir sobre el uso de los métodos estadísticos paramétricos o no paramétricos a emplearse (Conover, 1980; Zar, 1984). Una vez identificados se procedió a aplicar análisis de varianza (ANDEVA) entre las variables de respuesta a los tratamientos evaluados. En los casos donde existieron diferencias se aplicaron las pruebas de comparaciones múltiples de Tukey o de Student-Newman-Keuls para identificar los tratamientos homogéneos (Steel y Torrie, 1960; Conover, 1980; Zar, 1984). A su vez se aplicaron análisis de correlación de Pearson entre las diversas variables de respuesta para determinar el grado de asociación entre éstas y la influencia de los tratamientos de prueba. Los valores de sobrevivencia fueron transformados a Arcoseno antes de realizar el análisis de los datos. Todos los análisis se realizaron con el paquete estadístico Sigma plot ver. 11.0; utilizando un nivel de significancia de 0.05 (Zar, 1984).

VI. RESULTADOS

En esta sección se describen los resultados y discusiones obtenidas en la presente investigación de acuerdo al orden de los objetivos planteados, iniciando con el resultado confirmativo de la infección y continuando en los incisos subsecuentes con los resultados obtenidos en las pruebas al desafío al virus de la mancha blanca bajo las diferentes condiciones de temperatura y salinidad.

6.1. Análisis confirmativo de la infección viral

Es importante destacar que en esta investigación se logró la infección en los juveniles de *L. vannamei* en todos los tratamientos en desafío al virus de la mancha blanca, dado que el método de infección vía intramuscular fue muy efectivo para reproducir la enfermedad de la mancha blanca en todos los tratamientos de prueba, ya que se obtuvo el 100% de las infecciones, es decir todos los organismos inyectados (618) con el inóculo fueron positivos al virus. Esta forma de infección experimental tiene la ventaja de dosificar muy bien las cantidades de inóculo utilizadas, lo que reduce las variaciones debido a diferencias en el inóculo viral cuando se utilizan métodos orales. Previo a la cuantificación de las cargas virales por PCR en tiempo real se llevó a cabo la detección del virus de la mancha blanca por medio de PCR punto final usando el kit IQ WSSV 2000® (Farming IntelliGene), esto sirvió para detectar las etapas de la enfermedad según el grado de severidad basado en Lightner (1996) tales como inicio de la infección, fase de desarrollo, fase aguda y fase de muerte, (Anexos 7 y 8), y con esto cuantificar la carga viral por qPCR en dichas etapas. En la Figura 1 se presenta un ejemplo de una muestra con diversos grados de infección al virus de la mancha blanca

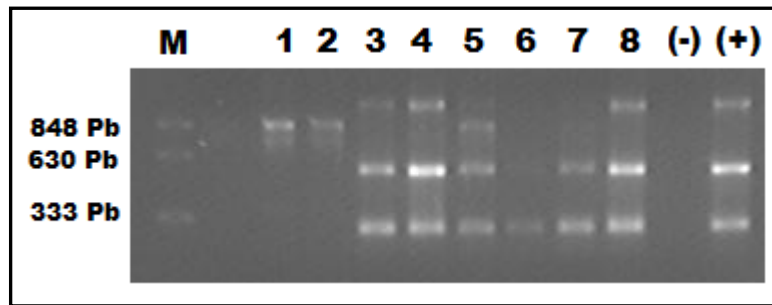


Figura 1. Análisis de los productos de PCR de *L. vannamei* infectado con el virus de la mancha blanca. (M): Marcador molecular; carriles 1 y 2 resultados negativos, carriles 3,4,5 y 8 muestras con grado severo de infección, carril 6 muestra con infección ligera, carril 7 muestra con infección moderada; control (-) y control (+).

A su vez se realizaron análisis confirmativos de presencia/ausencia del virus de la mancha blanca mediante histopatología. En la Figura 2 se aprecia un ejemplo en donde se detectó la presencia de cuerpos de inclusión intranuclear (CIIN) en epitelio gástrico y tejido conectivo, al igual que en otros órganos diana del virus como son: órgano linfoide, tejido hematopoyético, branquias, glándula antenal, epitelio gástrico, epitelio dérmico y tejido conectivo que son afectados por el virus de la mancha blanca (Pantoja y Lightner, 2003; Carbajal et al., 2008; Ochoa et al., 2006).

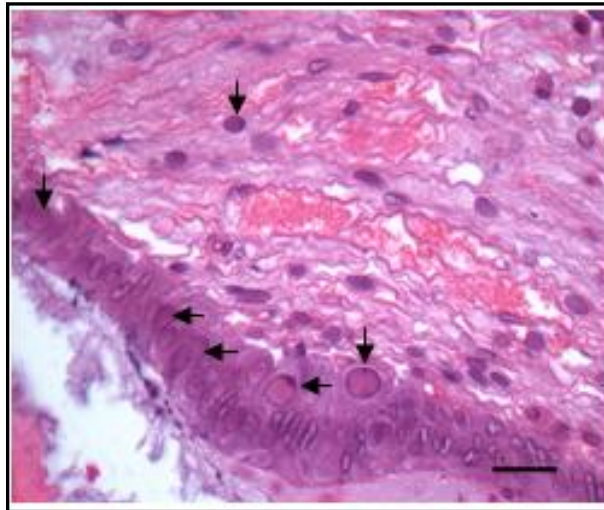


Figura 2. Corte histológico de epitelio gástrico y tejido conectivo de organismos en desafío al virus de la mancha blanca con grado severo de la enfermedad. Las flechas señalan algunos cuerpos de inclusión intranuclear (CIIN). Tinción H&E. Escala de la barra 10 μ m.

6.2. Análisis de la infección viral

En esta sección se contempla lo referente al segundo objetivo específico que consiste en la determinación por PCR en tiempo real (qPCR) de la concentración de la carga viral en muestras de hemolinfa de juveniles sujetos al desafío al virus de la mancha blanca, el cual se realizó en diversos tiempo según la etapa de la enfermedad. Se muestran los tratamientos por salinidades en orden de mayor a menor concentración.

En la Figura 3, se muestra la concentración viral de los tratamiento 20°C/35 g/l y 27°C/35 g/l, en donde a las 24 hpi (fase de inicio) se detectó una carga casi imperceptible, pero a las 60 hpi la carga detectada en este mismo tratamiento 20°C/35 g/l se incrementó (fase aguda) y se mantuvo entre un rango de 2.5×10^4 a 2×10^5 copias DNA/ μ l; esto mismo comportamiento se registró en el tratamiento 27°C/35 g/l en su etapa aguda a las 96 hpi, con un rango de 5×10^4 a 2×10^5 copias DNA/ μ l. Posteriormente la concentración se redujo hasta 1×10^5 copias DNA/ μ l en 20°C/35 g/l, en su fase de muerte; en 27°C/35 g/l no se analizó esta etapa ya que la mortalidad fue abrupta. En el tratamiento 33°C/35 g/l no se registró carga viral en ningún tiempo post infección.

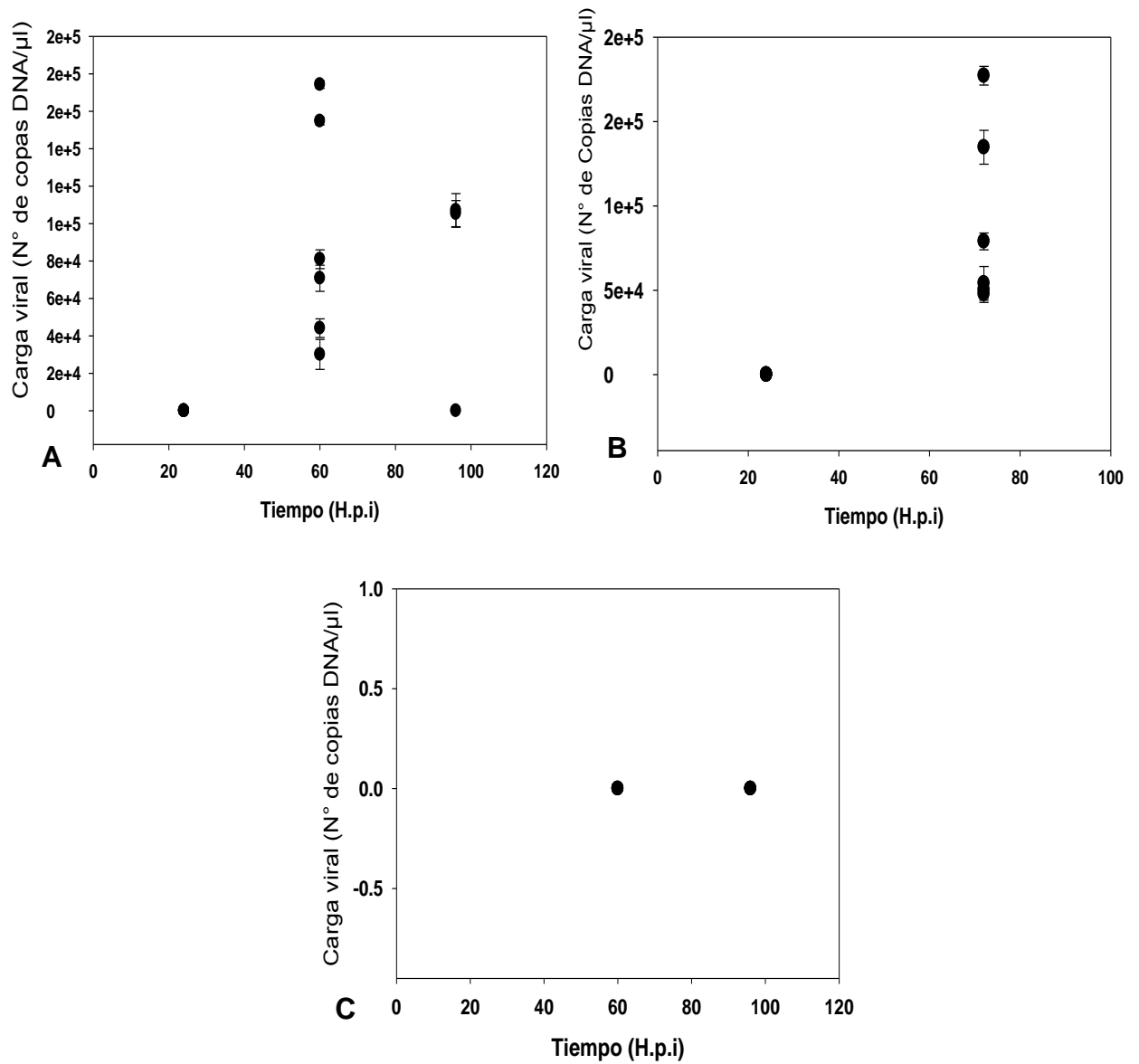


Figura 3. Análisis de qPCR en muestras de hemolinfa de juveniles de *L. vannamei* en desafío al virus de la mancha blanca.

A. Tratamiento 20°C/35 g/l

B. Tratamiento 27°C/35 g/l

C. Tratamiento 33°C/35 g/l

En la Figura 4 se observa que después de 24 hpi, los tratamientos 20°C/15 g/l y 27°C/15 g/l, se detectó una carga muy ligera en la etapa de inicio de la infección pero a las 60 hpi en el tratamiento 20°C/15 g/l se presentó la etapa aguda de la enfermedad, detectándose concentraciones entre 2×10^4 y 1.1×10^5 copias DNA/ μ l que se mantuvo hasta las 96 hpi con una concentración de 7×10^4 a 1.2×10^5 copias DNA/ μ l. Por otra parte en el tratamiento 27°C/15 g/l la etapa aguda se registró a las 72 hpi con una densidad viral entre 7×10^4 y 1.4×10^5 copias DNA/ μ l; y transcurridas las 120 hpi se inició la etapa de muerte reduciéndose la carga a 2×10^4 a 3×10^4 copias DNA/ μ l hasta valores mínimos detectados después de las 140 hpi. En el tratamiento 33°C/15 g/l no se registró carga viral en ningún tiempo post infección

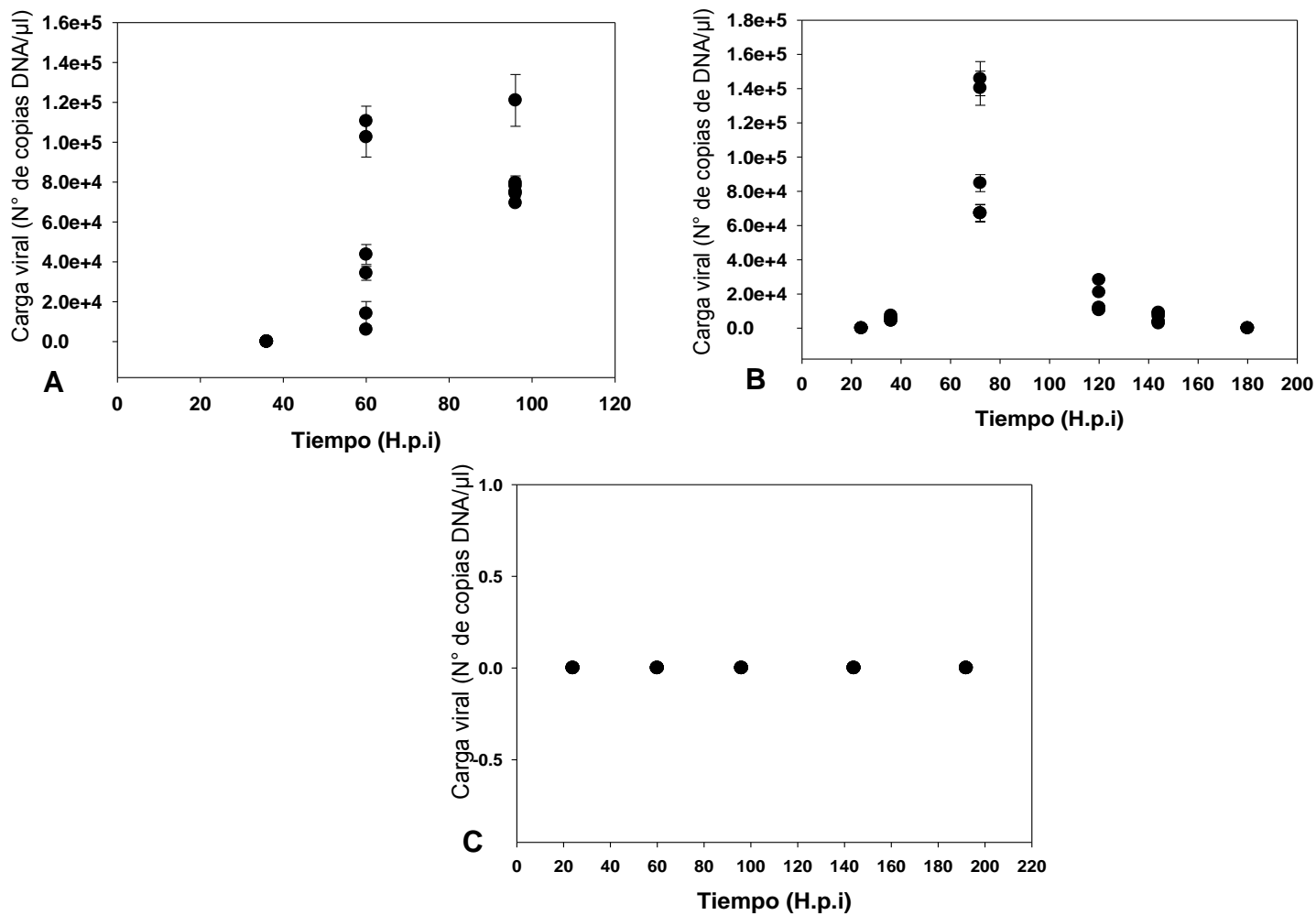


Figura 4. Análisis de qPCR en muestras de hemolinfa de juveniles de *L. vannamei* en desafío al virus de la mancha blanca

A. Tratamiento 20°C/15 g/l

B. Tratamiento 27°C/15 g/l

C. Tratamiento 33°C/15 g/l

En la Figura 5 se aprecia la concentración viral en los tratamientos 20°C/5 g/l y 27°C/5 g/l en donde la fase inicio de la enfermedad se detectó con un carga viral muy ligera para ambos tratamientos entre las 24 y 36 hpi, sin embargo a las 48 hpi la carga detectada en 27°C/5 g/l alcanzó la etapa aguda de la enfermedad detectándose una concentración superior a 2×10^6 copias de DNA/ μ l; por otra parte en el tratamiento 20°C/5 g/l a las 72 hpi el rango registrado en esta misma etapa fue entre 1×10^5 a 3.2×10^5 copias de DNA/ μ l. La etapa de muerte en el tratamiento 27°C/5 g/l se registró con la reducción en la carga viral con valores alrededor de 5×10^5 ; del mismo modo se observó en el tratamiento 20°C/5 g/l a las 144 hpi con la detección de una carga viral cercana a 5×10^4 . En el tratamiento 33°C/5 g/l no se registró carga viral en ningún tiempo post infección.

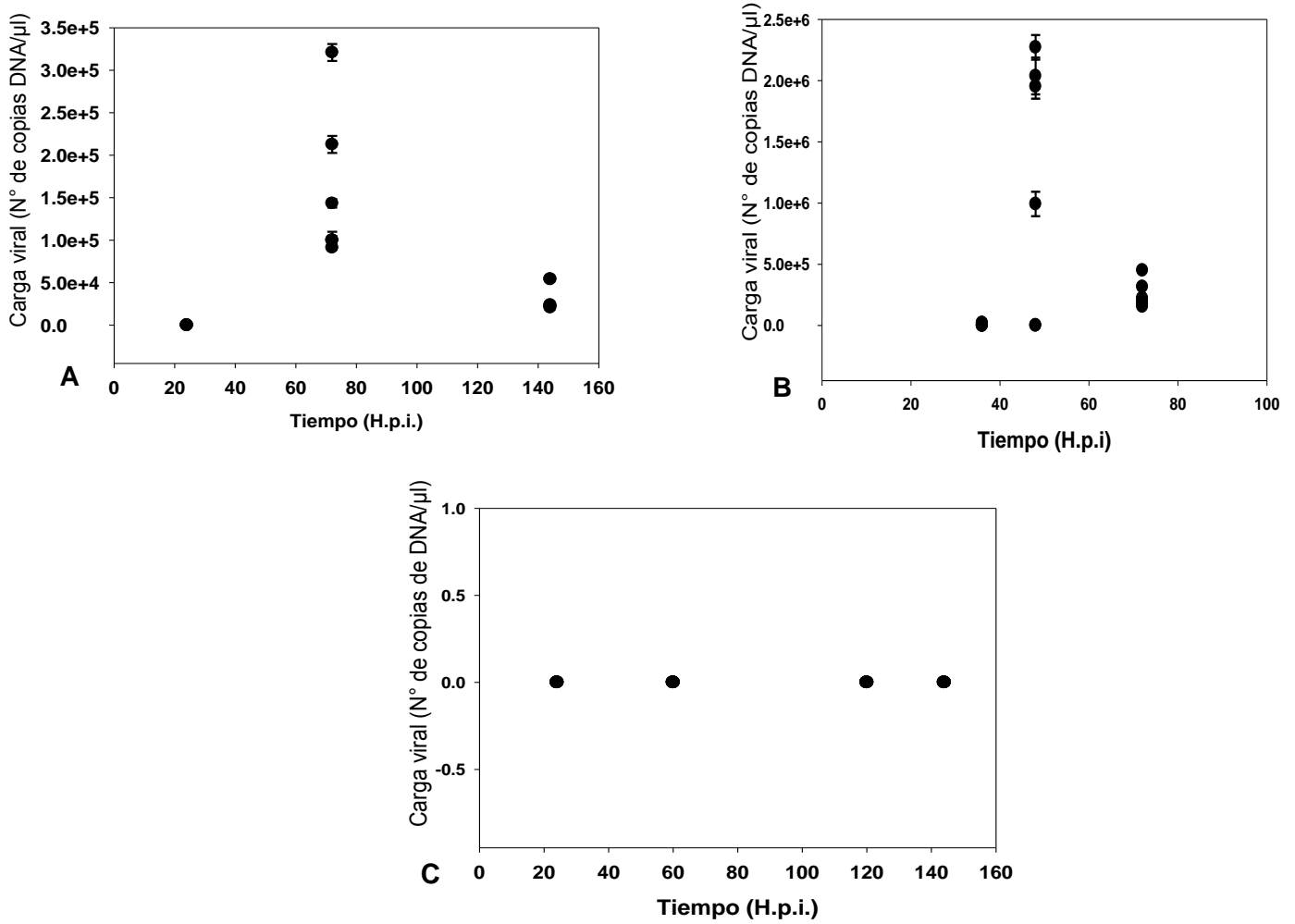


Figura 5. Análisis de qPCR en muestras de hemolinfa de juveniles de *L. vannamei* en desafío al virus de la mancha blanca.

A. Tratamiento 20°C/5 g/l

B. Tratamiento 27°C/5 g/l

C. Tratamiento 33°C/5 g/l.

6.3. Desarrollo de la enfermedad de la mancha blanca bajo condiciones controladas de temperatura (20, 27 y 33°C) y salinidad (5, 15 y 35 g/l) en juveniles de *L. vannamei*.

En este apartado se desarrolla lo referente al tercer objetivo específico que señala el aspecto de lesiones a nivel macroscópico y microscópico provocadas por el virus de la mancha blanca, a su vez se incluye una panorámica general del desarrollo de la enfermedad por cada tratamiento de prueba.

En el Cuadro 2 se muestran los resultados del tratamiento 20°C/35 g/l a diferentes tiempos post infección, se presenta la morbilidad (% de juveniles enfermos en un tiempo determinado) que se inició a las 24 hpi con nado errático y anorexia en el 10% de la población; el proceso infeccioso fue incrementándose paulatinamente junto con la presencia de organismos con intestino vacío, deformidad de antenas, coloración rojiza de cutícula a las 60 hpi con el 25% de la morbilidad, hasta llegar al letargo y postración, después de 96 hpi. Al paso de los signos de la enfermedad observados se presentaron lesiones a nivel macroscópico y microscópico en diversos órganos y tejidos con grados de lesiones G1-G2 que se iniciaron desde las 24 hpi, aumentándose paulatinamente a grado G2 a G3 a partir de las 60 hpi y hasta el final del experimento que fue de 144 hpi. Estos resultados concuerdan con la carga viral detectada en donde se registró a la mayor concentración de copias virales (superior a las 2×10^5 copias DNA/ μ l) a partir de las 60 hpi.

Cuadro 2. Desarrollo de la enfermedad de la mancha blanca en juveniles de *L. vannamei* sujetos a condiciones de 20°C y 35 g/l.

Tratamiento N° 1 20/35 N= 120	HORAS POST INFECCIÓN						
	24	36	48	60	72	84	≥96
Morbilidad (%)	10			25		50	100
Mortalidad (%)	20	27	50	57	75	82	100
Signos							
1. Nado errático	+	+	+				
2. Anorexia	+	+	+	+			+
3. Intestino vacío				+	+	+	+
4. Def. de antenas				+	+	+	+
5. Coloración de cutícula					+	+	+
6. Letargo/postración							+
Lesiones Macroscópicas							
G0							
G1 (Leve)	G1						
G2 (Moderado)	G2			G2			G2
G3 (Severo)							
Lesiones Microscópicas							
G0							
G1 (Leve)							
G2 (Moderado)	G2			G2			
G3 (Severo)				G3			G3

En el Cuadro 3, se muestra el tratamiento 27°C/35 g/l, en donde el inicio de la enfermedad se detectó con una morbilidad registrada de 10% a las 24 hpi, con signos de nado errático y principio de anorexia, comportamiento que se preservó hasta después de las 36 hpi tiempo en el cual se presentó una mortalidad acumulada del 50%. A las 48 hpi la morbilidad alcanzaba el 80% de la población con intestino vacío, deformidad de antenas, en esta etapa la mortalidad ya alcanzaba el 78% de la población, situación que se agravó hasta el letargo y la postración una vez alcanzada las 72 hpi. Durante este tiempo que duró el desafío se registraron a la par de los signos de la enfermedad la presencia de lesiones a nivel macroscópico y microscópico en diversos órganos y tejidos con niveles G1-G2 a las 24 hpi, empeorándose paulatinamente a G3 a las 72 hpi. La carga viral detectada en la etapa severa de la enfermedad alcanzó las 2×10^5 copias DNA/ μ l.

Cuadro 3. Desarrollo de la enfermedad de la mancha blanca en juveniles de *L. vannamei* sujetos a condiciones de 27°C y 35 g/l.

Tratamiento N° 2 27/35 N= 120	HORAS POST INFECCIÓN				
	24	36	48	60	72
Morbilidad (%)	5	50	80		100
Mortalidad (%)	30	50	78	85	100
Signos					
1. Nado errático	+	+	+	+	+
2. Anorexia	+	+			
3. Intestino vacío			+	+	+
4. Def. de antenas			+	+	+
5. Coloración de cutícula				+	+
6. Letargo/postración				+	+
Lesiones Macroscópicas					
G0					
G1 (Leve)	G1				
G2 (Moderado)	G2				
G3 (Severo)					G3
Lesiones Microscópicas					
G0					
G1 (Leve)					
G2 (Moderado)	G2				
G3 (Severo)					G3

El Cuadro 4 señala que en el tratamiento 33°C/35 g/l a las 24-36 hpi se observaron organismos con nado errático y anorexia, a las 48 hpi se observó una mortalidad del 50% de la población, sin signos aparentes de la enfermedad, sólo nado errático y anorexia en un 5% de la población; sin embargo las lesiones a nivel macroscópico y microscópico señalaban lesiones desde ligeras a severas (G1, G1-G2, G2, G2-G3 y G3) a las 84 hpi de iniciado el contagio, y después observarse grados ligeros a severos (G1-G2) en tiempos posteriores a 96 hpi. En la etapa aguda de la enfermedad se registraron organismos con deformidad en antenas y coloración rojiza en la cutícula, la mortalidad presentada en este tiempo era del 68%. La mortalidad alcanzó el 100% de la población a las 144 hpi. Es necesario destacar que no se detectó carga viral en hemolinfa en ninguna etapa del experimento.

Cuadro 4. Desarrollo de la enfermedad de la mancha blanca en juveniles de *L. vannamei* sujetos a condiciones de 33°C y 35 g/l.

Tratamiento N° 3 33/35 N= 120	HORAS POST INFECCIÓN						
	24	36	48	60	72	84	≥96
Morbilidad (%)			5	5		20	100
Mortalidad (%)	10	30	50	50	55	68	100
Signos							
1. Nado errático	+	+	+	+		+	+
2. Anorexia		+	+	+			
3. Intestino vacío						+	+
4. Def. de antenas						+	+
5. Coloración de cutícula							+
6. Letargo/postración							+
Lesiones Macroscópicas							
G0	G0						
G1 (Leve)	G1			G1			
G2 (Moderado)				G2			G1
G3 (Severo)							
Lesiones Microscópicas							
G0							
G1 (Leve)	G1						
G2 (Moderado)				G2			
G3 (Severo)				G3			G2

El Cuadro 5 muestra el tratamiento 20°C/15 g/l, el cual indica que la morbilidad y la mortalidad se iniciaron a las 24 hpi con 4 y 5% respectivamente, son signos de nado errático y anorexia, después de las 48 hpi se observaron organismos con el tracto completamente vacío, en este tiempo la mortalidad acumulada era del 37%; lo signos de la enfermedad pasaron se incrementaron, presentando deformidad de antenas y coloración rojiza a las 72 hpi, la morbilidad alcanzaba ya el 80% de la población y la mortalidad acumulada era cercana a 70%. Durante el proceso de infeccioso se registraron las lesiones a nivel macroscópico y microscópico en diversos órganos y tejidos que hicieron latentes desde las 36 hpi con grados G1-G2, agravándose paulatinamente a G3 a las 72 hpi, en donde la carga viral detectada en la etapa severa de la enfermedad alcanzó las 1.2×10^5 copias de DNA/μl. La duración total de este experimento fue de 120 hpi.

Cuadro 5. Desarrollo de la enfermedad de la mancha blanca en juveniles de *L. vannamei* sujetos a condiciones de 20°C y 15 g/l

Tratamiento N° 4 20/15 N= 120	HORAS POST INFECCIÓN						
	24	36	48	60	72	84	≥96
Morbilidad (%)	4	10		50	80		100
Mortalidad (%)	5	30	37	57	69	75	100
Signos							
1. Nado errático	+	+	+	+	+	+	+
2. Anorexia	+	+					
3. Intestino vacío			+	+	+	+	+
4. Def. de antenas					+	+	+
5. Coloración de cutícula					+	+	+
6. Letargo/postración						+	+
Lesiones Macroscópicas							
G0							
G1 (Leve)		G1		G1			
G2 (Moderado)		G2		G2	G2	G2	G2
G3 (Severo)							
Lesiones Microscópicas							
G0							
G1 (Leve)		G1					
G2 (Moderado)		G2		G2	G2		
G3 (Severo)					G3	G3	G3

El tratamiento 27°C/15 g/l se presenta en el Cuadro 6, en donde se aprecia que la morbilidad se inició a las 24 hpi, con signos de nado errático y anorexia en el 2% de la población la cual se fue incrementando a la par con la mortalidad presentándose en mayor escala a las 60 hpi en donde se registraron organismos con intestino vacío, coloración rojiza y deformidad de antenas, en esta etapa la mortalidad acumulada alcanzaba ya el 30% de la población incrementándose hasta colapsar el tratamiento a las 120 hpi. La presencia de lesiones a nivel macroscópico y microscópico en diversos órganos y tejidos se registró a partir de las 24 hpi con un grado de lesión G1, aumentándose gradualmente de G1-G2 a las 36 hpi y severo en lesiones microscópicas a las 72 hpi. La carga viral detectada en la etapa severa de la enfermedad alcanzó las 1.5×10^5 copias de DNA/ μ l.

Cuadro 6. Desarrollo de la enfermedad de la mancha blanca en juveniles de *L. vannamei* sujetos a condiciones de 27°C y 15 g/l

Tratamiento N° 5 27/15 N= 120	HORAS POST INFECCIÓN						
	24	36	48	60	72	84	≥96
Morbilidad (%)	2	10			30		100
Mortalidad (%)	0	2	5	30	33	37	100
Signos							
1. Nado errático	+	+	+	+	+	+	+
2. Anorexia	+	+	+	+	+	+	
3. Intestino vacío				+	+	+	+
4. Def. de antenas				+	+	+	+
5. Coloración de cutícula				+	+	+	+
6. Letargo/postración							+
Lesiones Macroscópicas							
G0							
G1 (Leve)	G1	G1					
G2 (Moderado)		G2			G2		G2
G3 (Severo)							
Lesiones Microscópicas							
G0							
G1 (Leve)	G1	G1					
G2 (Moderado)		G2					
G3 (Severo)					G3		G3

El desarrollo infeccioso de la enfermedad de la mancha blanca en el tratamiento 33°C/15 g/l se presenta en el Cuadro 7. Los signos de la enfermedad fueron perceptibles a partir de las 48 hpi en un porcentaje reducido, incrementándose lentamente al igual que la mortalidad acumulada. Durante este tiempo se registraron signos ligeros de la enfermedad al igual que la presencia de lesiones a nivel macroscópico y microscópico en diversos tejidos con grados de lesiones que se iniciaron desde las 60 hpi con G0-G1 hasta las 144 hpi en donde el grado de lesiones fue de G2-G3, en la etapa aguda de la enfermedad, en este tiempo se registró una mortalidad acumulada del 10% de población. Después de las 144 hpi se observó que las lesiones a nivel macro y microscópico fueron entre G0-G1 hasta las 444 hpi que fue el tiempo en el cual se detuvo el experimento presentándose un 65% de sobrevivencia. En este tratamiento nunca se detectó carga viral en hemolinfa.

Cuadro 7. Desarrollo de la enfermedad de la mancha blanca en juveniles de *L. vannamei* sujetos a condiciones de 33°C y 15 g/l

Tratamiento N° 6 33/15 N= 120	HORAS POST INFECCIÓN							
	24	48	60	72	84	96	144	≥192
Morbilidad (%)	3	5				5	15	20
Mortalidad (%)	0	5	5	5	5	10	10	14
Signos 1. Nado errático 2. Anorexia 3. Intestino vacío 4. Def. de antenas 5. Coloración de cutícula 6. Letargo/postración		+	+	+	+	+	+	+
Lesiones Macroscópicas G0 G1 (Leve) G2 (Moderado) G3 (Severo)	G0		G1			G1	G2	G1
Lesiones Microscópicas G0 G1 (Leve) G2 (Moderado) G3 (Severo)	G0		G0 G1			G0 G1	G2 G3	G0 G1

Se muestra en el Cuadro 8 el desarrollo de la enfermedad de la mancha blanca en juveniles de *L. vannamei* en el tratamiento 20°C/5 g/l, en donde la morbilidad y mortalidad se iniciaron a las 24 hpi, y paulatinamente fueron incrementándose hasta el colapso de la población. Se registraron signos de la enfermedad como nado errático y anorexia en las primeras 48 hpi, pero al llegar a las 60 hpi la mortalidad alcanzó a más de la mitad de la población, en este tiempo se observaron juveniles con el tracto vacío y algunos con principios de deformidad de antenas y cambios en la coloración. A la par se observaron lesiones a nivel macroscópico y microscópico, registrándose en las primeras horas grados leves a moderados. A las 72 hpi se registró un grado mayor de lesiones de G2-G3 y posteriormente a nivel G3 en tiempo mayor a las 96 hpi. La carga viral detectada en la etapa severa de la enfermedad se alcanzó a las 72 hpi con una concentración de 3×10^5 copias de DNA/μl. La duración total de este experimento fue de 144 hpi.

Cuadro 8. Desarrollo de la enfermedad de la mancha blanca en juveniles de *L. vannamei* sujetos a condiciones de 20°C y 5 g/l.

Tratamiento N° 7 20/5 N= 120	HORAS POST INFECCIÓN						
	24	36	48	60	72	84	≥96
Morbilidad (%)	5	10		10	15	20	100
Mortalidad (%)	15	30	52	57	80	82	100
Signos							
1. Nado errático	+	+	+	+	+	+	+
2. Anorexia		+	+	+			
3. Intestino vacío				+	+	+	+
4. Def. de antenas						+	+
5. Coloración de cutícula							+
6. Letargo/postración							+
Lesiones Macroscópicas							
G0							
G1 (Leve)	G1						
G2 (Moderado)	G2				G2		
G3 (Severo)					G3		G3
Lesiones Microscópicas							
G0							
G1 (Leve)							
G2 (Moderado)	G2						
G3 (Severo)					G3		G3

El Cuadro 9 señala que en el tratamiento 27°C/5 g/l la morbilidad se inició a las 24 hpi con el 2% de la población, la cual se fue incrementando a la par con la mortalidad a una gran velocidad, alcanzando el 50% a las 48 horas de iniciada la infección, con signos graves de la enfermedad como es deformidad de antenas y coloración rojiza, hasta el letargo y postración a las 60 hpi. El colapso de la población se presentó a las 72 hpi. La presencia de lesiones a nivel macroscópico y microscópico en diversos órganos y tejidos se registró a partir de las 36 hpi con un grado de lesión G2-G3, aumentándose gradualmente a G3 a las 72 hpi. La mayor carga viral detectada fue en la etapa severa de la enfermedad y alcanzó una concentración cercana a las 2.5×10^6 copias de DNA/ μ l en la etapa aguda de la enfermedad.

Cuadro 9. Desarrollo de la enfermedad de la mancha blanca en juveniles de *L. vannamei* sujetos a condiciones de 27°C y 5 g/l.

Tratamiento N° 8 27/5 N= 120	HORAS POST INFECCIÓN				
	24	36	48	60	72
Morbilidad (%)	2	20	60		100
Mortalidad (%)	30	45	50	75	100
Signos					
1. Nado errático	+	+	+	+	+
2. Anorexia	+	+			
3. Intestino vacío		+	+	+	+
4. Def. de antenas			+	+	+
5. Coloración de cutícula			+	+	+
6. Letargo/postración				+	+
Lesiones Macroscópicas					
G0					
G1 (Leve)					
G2 (Moderado)		G2	G2		
G3 (Severo)		G3	G3		G3
Lesiones Microscópicas					
G0					
G1 (Leve)					
G2 (Moderado)					
G3 (Severo)		G3	G3		G3

Se reporta en el Cuadro 10 el tratamiento 33°C/5 g/l en donde la presencia de los signos de la enfermedad al igual que la morbilidad se inició a las 24-36 hpi en un porcentaje reducido, registrándose nado errático y anorexia, al llegar el experimento a las 48 hpi se detectaron juveniles con el tracto digestivo vacío, en esta etapa la mortalidad acumulada presentaba un 32% de la población. La enfermedad continuó su desarrollo aumentando la morbilidad y mortalidad en la población y al cabo de las 84 hpi, se observó deformidad en antenas y coloración rojiza en la cutícula la cual se incrementó paulatinamente al igual que la mortalidad hasta alcanzar el 100% de la población a las 168 hpi. Durante este tiempo se registraron la presencia de lesiones a nivel macroscópico y microscópico en diversos tejidos con grados de lesiones las cuales se iniciaron desde las 24 hpi con nivel G1, agravándose lentamente de G1-G2, a partir de las 60 hpi. Al igual que en otros experimentos en hipertermia no se detectó carga viral en ninguna etapa del bioensayo.

Cuadro 10. Desarrollo de la enfermedad de la mancha blanca en juveniles de *L. vannamei* sujetos a condiciones de 33°C y 5 g/l.

Tratamiento N° 9 33/5 N= 120	HORAS POST INFECCIÓN						
	24	36	48	60	72	84	≥96
Morbilidad (%)	5		10		15		100
Mortalidad (%)	10	26	32	48	68	78	100
Signos							
1. Nado errático	+	+	+	+	+	+	+
2. Anorexia	+	+	+	+			
3. Intestino vacío			+	+	+	+	+
4. Def. de antenas						+	+
5. Coloración de cutícula						+	+
6. Letargo/postración							+
Lesiones Macroscópicas							
G0							
G1 (Leve)	G1			G1			G1
G2 (Moderado)							
G3 (Severo)							
Lesiones Microscópicas							
G0							
G1 (Leve)	G1			G1			
G2 (Moderado)				G2			G1
G3 (Severo)							G2

6.3.1. Lesiones a nivel macroscópico

En este apartado se describen las lesiones a nivel macroscópico observadas en los juveniles de *L. vannamei* sujetos al desafío al virus de la mancha blanca en distintas condiciones ambientales de temperatura y salinidad, en donde los organismos con lesiones graves (G3) fueron registrados en los tratamientos 27°C/35 g/l, 20°C/5 g/l y 27°C/5 g/l.

Lesiones moderadas (G2) se observaron en los tratamientos 20°C/35 g/l, 20°C/15 g/l, 27°C/15 g/l y lesiones ligeras (G1) fueron registradas en 33°C/35 g/l, 33°C/15 g/l y 33°C/5 g/l.

A continuación se presentan figuras que señalan ejemplos de las lesiones observadas en los bioensayos realizados.

En la Figura 6 se puede apreciar que los organismos con grado G1 o ligero presentan muy pocas lesiones, las existentes se encuentran distribuidas de forma aleatoria, con tamaños entre 1 y 2 mm, varían en el color de la pigmentación que van del café claro al café oscuro



Figura 6. Lesiones macroscópicas en cutícula y epidermis con daño de melanización leve (G1) multifocal, observadas en juveniles de *L. vannamei* en desafío al virus de la mancha blanca.

En la Figura 7 se puede apreciar que en los organismos con grado de lesiones ligero a moderadas (G1-G2), presentan lesiones en cutícula y epidermis de color café oscuras en cefalotórax y segmentos abdominales de forma irregular que podrían corresponder a zonas melanizadas con bordes irregulares cuyo centro es deprimido con pérdida de epidermis.

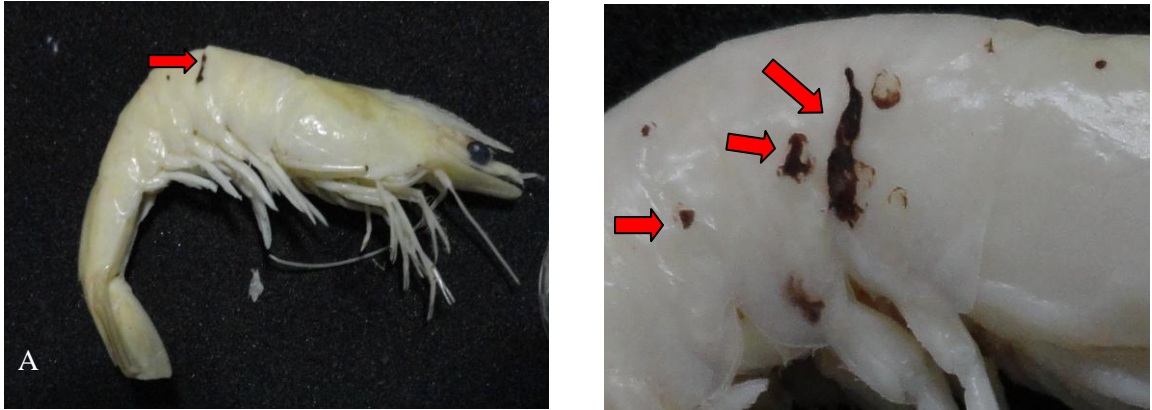


Figura 7. Lesiones macroscópicas en cutícula y epidermis con daño de melanización leve a moderada multifocal coalescente (G1-G2), observadas en juveniles de *L. vannamei* en desafío al virus de la mancha blanca.
A. Melanización en segmentos abdominales en la sección dorsal.
B. Lesiones multifocales coalescentes en cutícula y epidermis con melanización leve a moderado. Imagen con acercamiento 2x.

En la Figura 8, se puede apreciar que en los organismos con grado de lesión moderado (G2), presentan pequeñas lesiones en cutícula y epidermis de aproximadamente 1 a 3 mm de color café oscuras en cefalotórax y segmentos abdominales de forma irregular. En observación estereoscópica la cutícula presenta cortes irregulares con centro deprimido, en algunos casos éste es más oscuro, a su vez las lesiones se organizan en sufusiones y coalescen con otras lesiones

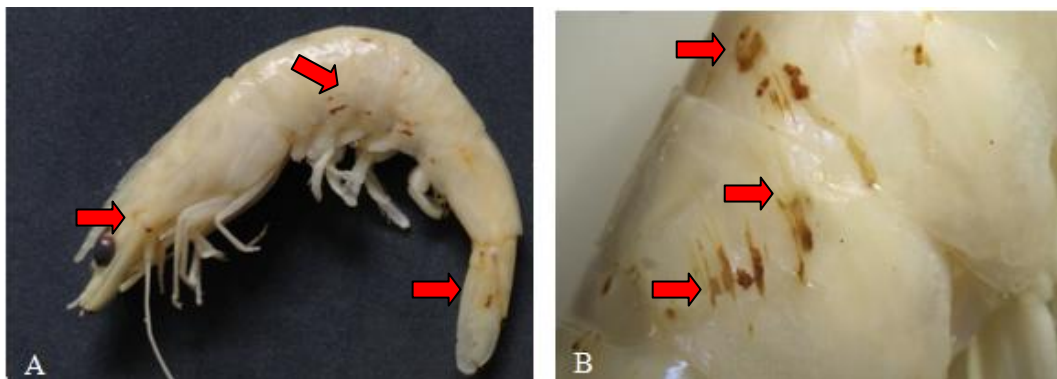


Figura 8. Lesiones macroscópicas en cutícula y epidermis con daño de melanización moderada multifocal (G2), observadas en juveniles de *L. vannamei* en desafío al virus de la mancha blanca.

A. Melanización en cefalotórax, segmentos abdominales en la sección ventral, media y dorsal y télson.

B. Lesiones multifocales coalescentes y sufusiones en cutícula y epidermis con melanización moderada. Imagen con acercamiento 2x.

En la Figura 9 se puede apreciar que en los organismos con grado de lesión moderada a severa (G2-G3), se observan áreas melanizadas y blancas que podría corresponder a zonas mineralizadas, distribuidas de forma aleatoria en segmentos abdominales y en cefalotórax, la observación estereoscópica, las áreas melanizadas y mineralizadas son deprimidas, en algunas secciones las áreas blancas se encuentran sobre relieve con superficie irregular.

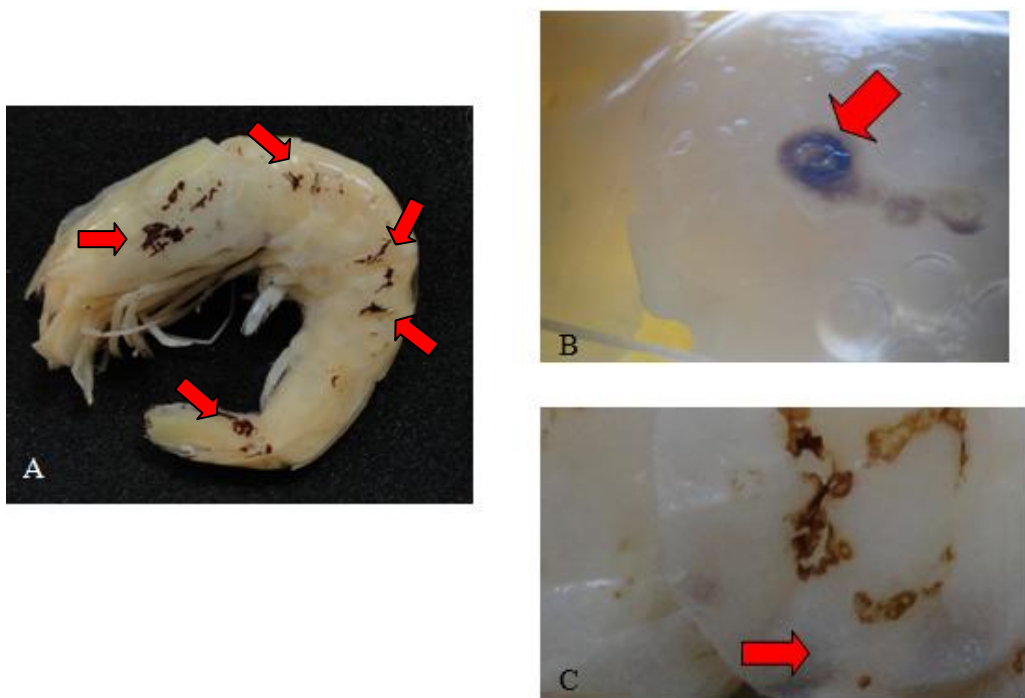


Figura 9. Lesiones en cutícula y epidermis con daño de melanización multifocal moderada-severa (G2-G3) observadas en juveniles de *L. vannamei* en desafío al virus de la mancha blanca.

A. Melanización en cefalotórax y segmentos abdominales en la sección ventral, media y dorsal.

B. Lesiones multifocales coalescentes y puntuales en cutícula y epidermis con melanización moderada. Acercamiento 2x.

C. Área de mineralización. Acercamiento 2x.

En la Figura 10 se puede apreciar que en los organismos con grado de lesión severa (G3), existe daño en exoesqueleto áreas café claras de bordes irregulares posiblemente melanizadas a sí mismo se aprecian zonas de color blanco que podría corresponder a mineralización; en observación estereoscópica se observan lesiones deprimidas con pérdida de la continuidad de la epidermis, a si mismo el borde de urópodos se aprecia desprendimiento de tejido.

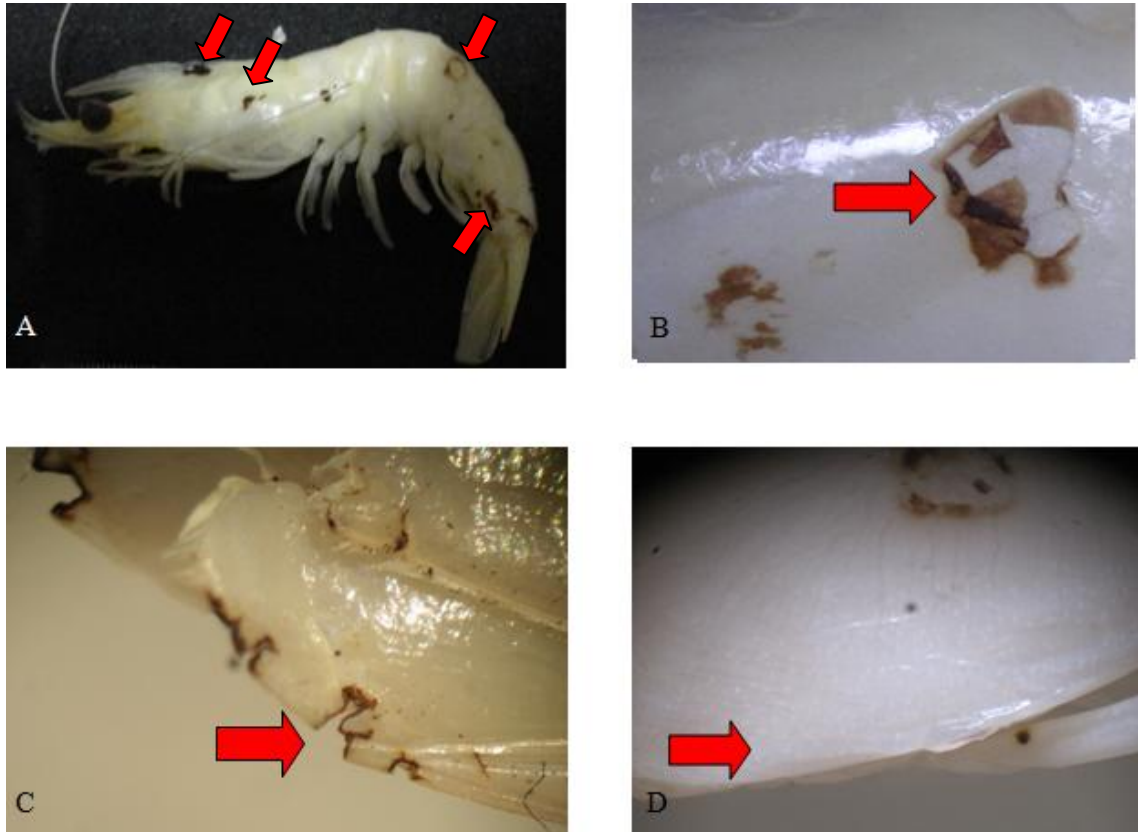


Figura 10. Lesiones macroscópicas en cutícula y epidermis con daño de melanización y mineralización multifocal con áreas de necrosis focal severa (G3) observadas en juveniles de *L. vannamei* en desafío al virus de la mancha blanca.

A. Melanización en cefalotórax y segmentos abdominales en la sección ventral, media y dorsal.

B. Lesiones multifocales coalescentes en cutícula y epidermis con melanización severa; imagen con acercamiento 2x.

C. Zonas de necrosis con pérdida de cutícula y epidermis; imagen con acercamiento 4x.

D. Área de mineralización, acercamiento 4x.

6.3.2. Lesiones a nivel microscópico

En la presente sección se describen las lesiones a nivel microscópico observadas en los experimentos realizados, los daños que se registraron fueron detectados en tejido conectivo, epitelio gástrico, epitelio dérmico, branquias, tejido hematopoyético, órgano linfoide y glándula antenal. Las lesiones causadas por el virus de la mancha blanca se caracterizan por la hipertrofia de los núcleos en células infectadas, similar a los cuerpos de inclusión eosinófilos denominados Cowdry A, observados en la etapa temprana de la infección. Cuando la infección es avanzada estos cuerpos de inclusión son basófilos (Lightner y Chen, 2000).

Los organismos con lesiones graves (G3) fueron registrados en los tratamientos 27°C/35 g/l, 20°C/15 g/l y 27°C/15 g/l, 20°C/5 g/l, 27°C/5 g/l, en el tratamiento 33°C/15 g/l se observó este grado de lesión sólo en la fase aguda de la enfermedad, la cual se registró a las 144 hpi; posterior a esta etapa, los organismos sobrevivientes presentaron lesiones ligeras hasta después de las 192 hpi. El registro de lesiones moderadas (G2) se observó en los tratamientos 20°C/35 g/l, 33°C/35 g/l y lesiones ligeras (G1) fueron registradas en 33°C/15 g/l y 33°C/5 g/l.

A continuación se presentan figuras que señalan algunos ejemplos de las lesiones observadas en diversos tejidos de los juveniles en desafío al virus de la mancha blanca en los biensayos realizados.

6.3.2.1 Lesiones ligeras (G1)

En Figura 11 se aprecia la presencia cuerpos de inclusión intranuclear (CIIN) en menos del 25% del tejido. Este grado de lesión se observó en todos los tratamientos evaluados al inicio de la infección entre las 24 y 36 hpi.

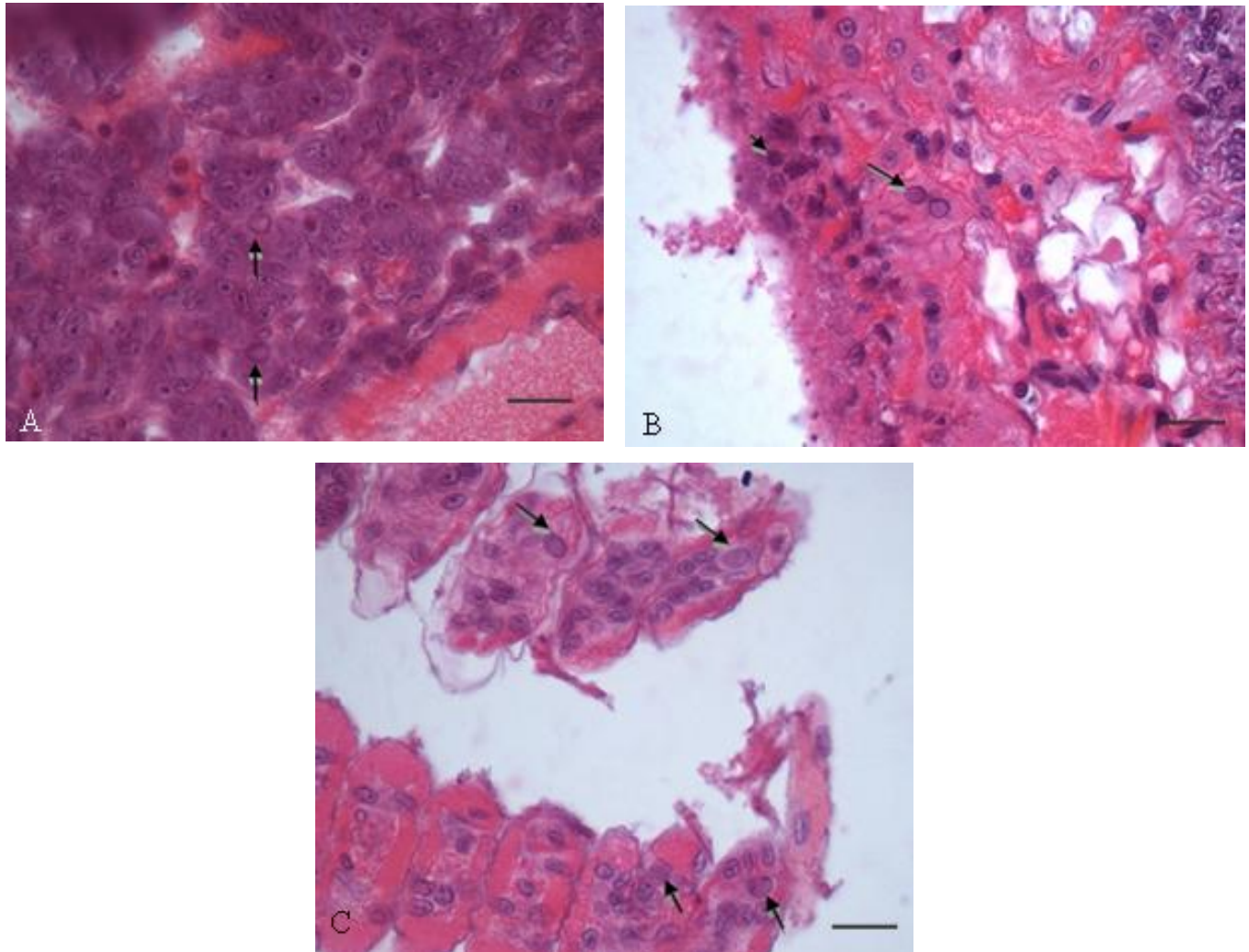


Figura 11. Lesiones microscópicas grado ligero (G1) observadas en juveniles de *L. vannamei* en desafío al virus de la mancha blanca; se señalan con flechas la presencia de CIIN. Tinción H&E. Escala de la barra 10 μ m.

A. Tejido Hematopoyético 40x

B. Tejido conectivo de epitelio dérmico 40x

C. Branquias 40x

6.3.2.2 Lesiones G2 (Moderadas)

En Figura 12 se aprecian cuerpos de inclusión intranuclear (CIIN) presentes en el 50% del tejido; estos CIIN no muestran halo y son de color basófilo (Wang et al., 1999).

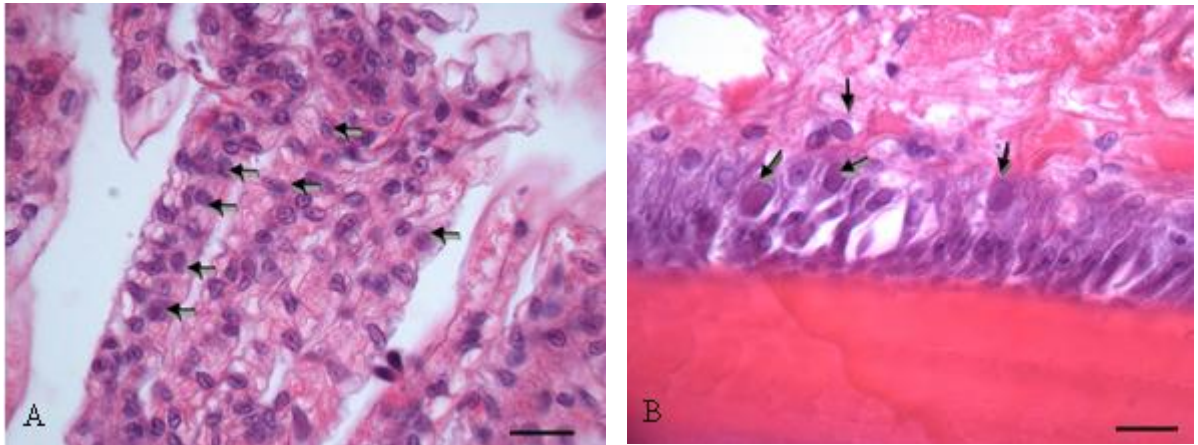


Figura 12. Lesiones microscópicas (G2) observadas en juveniles de *L. vannamei* en desafío al virus de la mancha blanca; se señalan con flechas la presencia de CIIN. Tinción H&E. Escala de la barra 10 μ m.

A. Branquias 40x

B. Epitelio dérmico 40x

6.3.2.3 Lesiones G3 (Severas)

En Figura 13 se aprecian cuerpos de inclusión intranuclear (CIIN) presentes en más del 75% del tejido, estos CIIN más desarrollados con mayor tamaño, color basófilo pálido a oscuro (Wang et al., 1999).

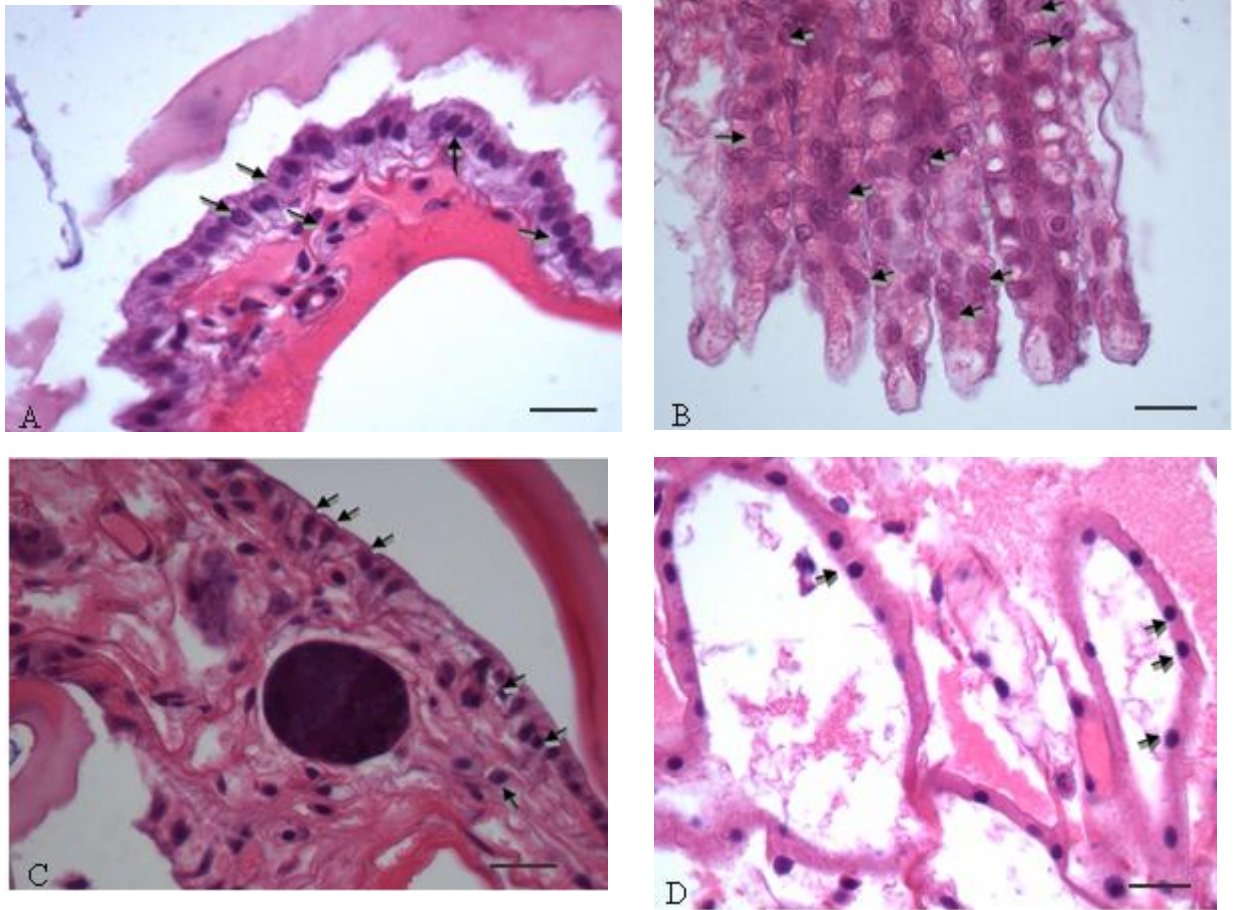


Figura 13. Lesiones microscópicas (G3) observadas en juveniles de *L. vannamei* en desafío al virus de la mancha blanca; se señalan con flechas la presencia de CIIN. Tinción H&E. Escala de la barra 10 μ m.

A. Epitelio dérmico 40x

B. Branquias 40x

C. Tejido conectivo epidermis 40x

D. Glándula antenal 40x.

6.4. Sobrevivencia

La sobrevivencia en los tratamientos control fué entre 98% y 100%. Por el contrario, los tratamientos en donde se llevó a cabo el desafío al virus de la mancha blanca se vieron seriamente afectados, principalmente en los tratamientos 27°C/35 g/l y 27°C/5 g/l, en donde la sobrevivencia se colapsó a las 72 hpi. En el tratamiento 33°C/15 g/l se presentó una sobrevivencia del 65% al desafío a la enfermedad después de sobrepasar la etapa aguda de la enfermedad. En Figura 14 se aprecia la sobrevivencia registrada en los tratamientos cuya salinidad fue de 35 g/l; en donde existieron diferencias significativas entre los tratamientos de prueba, un grupo homogéneo fue formado por todos los tratamientos control que mostraron una sobrevivencia del 97-99%. Otro grupo identificado esta formado por los tratamientos en desafío con 33°C y 20°C, los cuales alcanzaron 144 hpi de duración. El valor que presentó menor sobrevivencia fue el tratamiento a 27°C cuya duración fue sólo de 72 hpi.

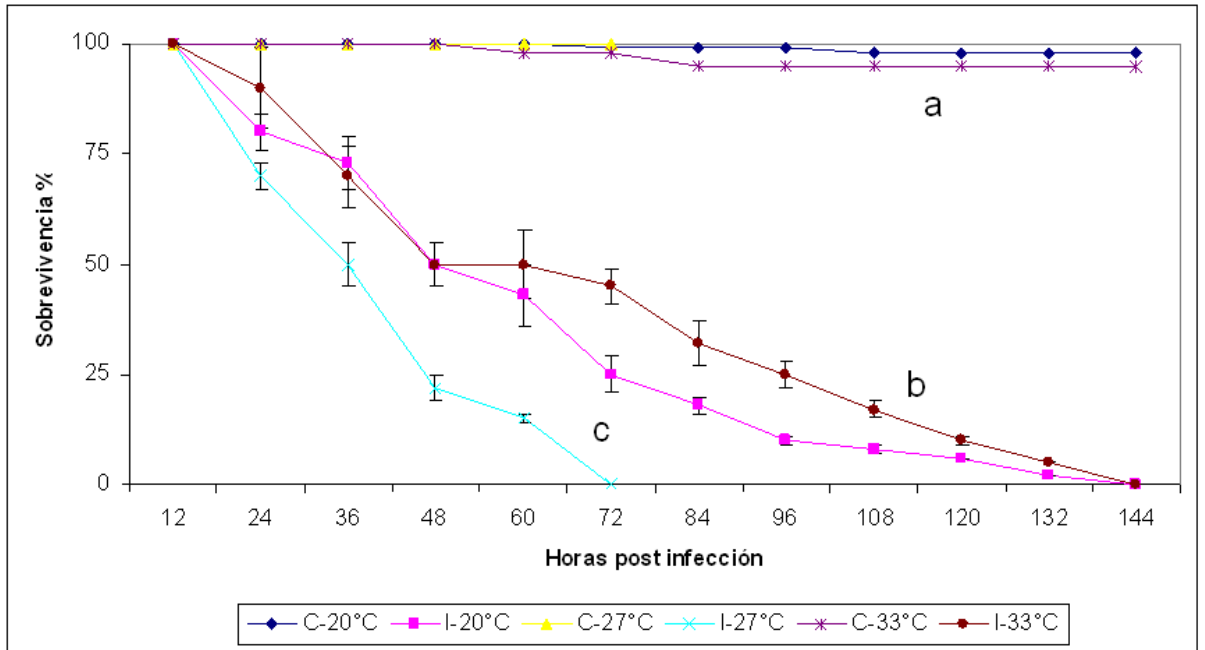


Figura 14. Tasa de sobrevivencia de juveniles de *L. vannamei* sanos (C) e infectados con el virus de la mancha blanca (I), registrada en diferentes temperaturas (20, 27 y 33°C) a 35 g/l de salinidad.

En Figura 15 se aprecia la sobrevivencia registrada en los tratamientos cuya salinidad fue de 15 g/l; en donde existieron diferencias significativas entre los tratamientos de prueba, un grupo homogéneo fue formado por todos los tratamientos control que mostraron una sobrevivencia del 86-100%. El tratamiento en desafío con la temperatura 33°C figuró como un grupo diferente, presentando una sobrevivencia final del 65% a las 444 hpi; cabe señalar que los juveniles en este tratamiento una vez alcanzado este tiempo fueron sacrificados. Un tercer grupo que presentó homogeneidad estuvo formado por los tratamientos con temperaturas de 20 y 27°C, cuya sobrevivencia se colapsó alcanzada las 115 hpi y 240 hpi respectivamente.

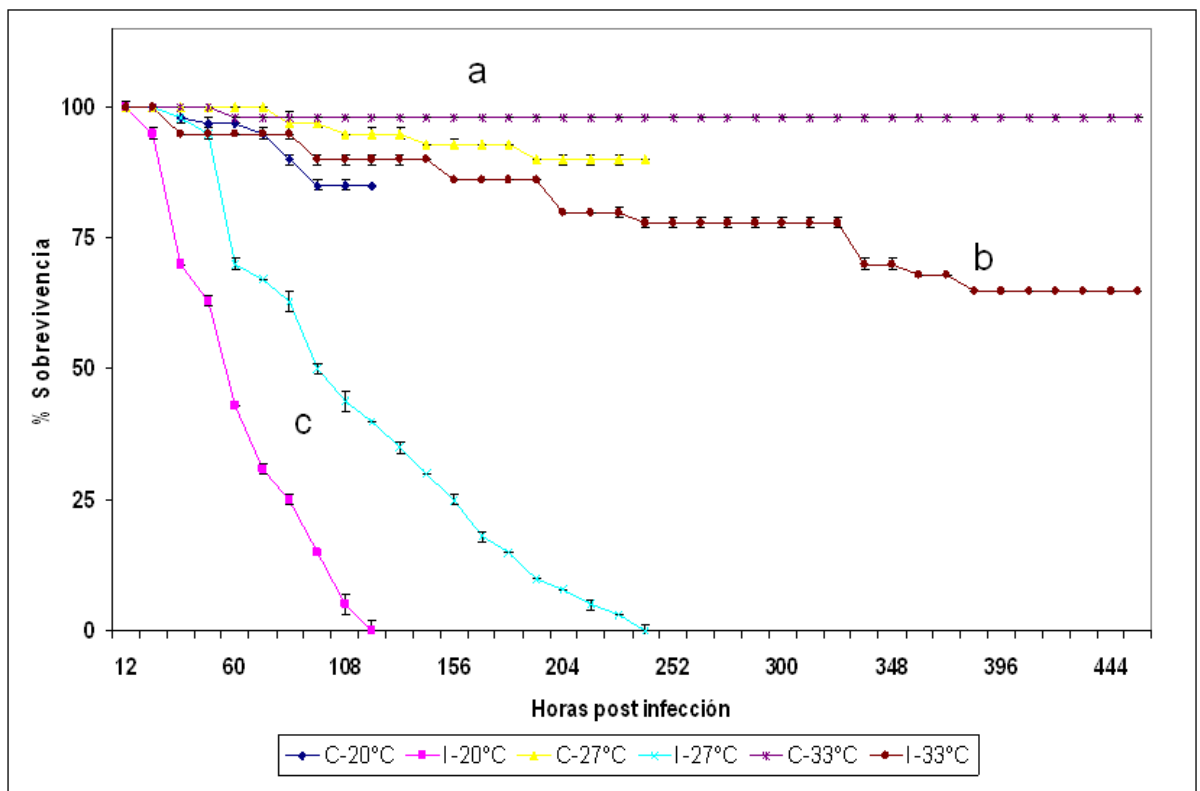


Figura 15. Tasa de sobrevivencia de juveniles de *L. vannamei* sanos (C) e infectados con el virus de la mancha blanca (I), registrada en diferentes temperaturas (20, 27 y 33°C) a 15 g/l de salinidad.

En Figura 16, se aprecia la sobrevivencia registrada en los tratamientos cuya salinidad fue de 5 g/l; en donde existieron diferencias significativas entre los tratamientos, un grupo homogéneo fue formado por los tratamientos control de las temperaturas 27 y 33°C que mostraron una sobrevivencia del 88-90%.

Otro grupo identificado esta formado por el tratamiento control con la temperatura de 20°C el cual alcanzó el 60% de sobrevivencia a las 144. Los tratamientos en desafío al virus; con las temperaturas de 20°C y 33°C, no presentaron diferencias entre sí, los cuales alcanzaron 144 y 168 hpi respectivamente. El valor que presentó menor sobrevivencia fue el tratamiento en desafío a 27°C cuya duración fue sólo de 72 hpi,.

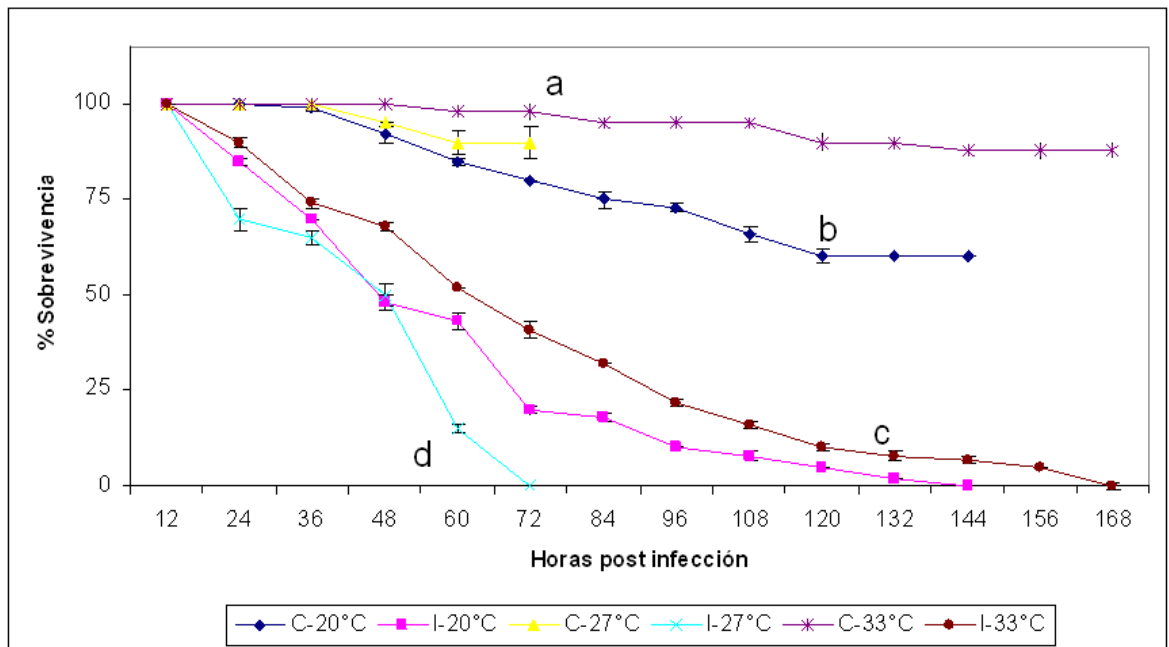


Figura 16. Tasa de sobrevivencia de juveniles de *L. vannamei* sanos (C) e infectados con el al virus de la mancha blanca (I), registrada en diferentes temperaturas a 5 g/l de salinidad.

6.4.1. Correlación de Pearson entre la carga viral y sobrevivencia

Este análisis se llevó a cabo para determinar que tratamiento presentó mayor correlación entre la carga viral y la sobrevivencia. Se puede observar en el Cuadro 11, que no existió correlación en los tratamientos en donde la temperatura del agua fue de 33°C, pues en estas, la detección de cargas virales fue nula. Por otra parte el resto de los tratamientos evaluados presentaron una correlación negativa entre la carga viral y la sobrevivencia al desafío al virus de la mancha blanca, lo cual significa que al aumentar la carga viral la sobrevivencia disminuyó, siendo más significativa esta asociación en los tratamientos 27°C/35 g/l y 20°C/15 g/l.

Cuadro 11. Matriz de correlación entre la tasa de sobrevivencia y carga viral de *Litopenaeus vannamei* en desafío al virus de la mancha blanca sujetos a diferentes temperaturas (20, 27 y 33°C) y concentraciones de salinidad (5, 15 y 35 g/l)

Tratamiento	R	P	N
20°C/35 g/l	-0.463	0.0531	18
27°C/35 g/l	-0.644	0.0238*	18
33°C/35 g/l	Sin Correlación	----	36
20°C/15 g/l	-0.782	0.000128*	18
27°C/15 g/l	-0.058	0.736	36
33°C/15 g/l	Sin Correlación	----	36
20°C/5 g/l	-0.437	0.0699	18
27°C/5 g/l	-0.0265	0.917	18
33°C/5 g/l	Sin Correlación	----	36

*Valores relacionados significativamente (P<0.05)

6.5. Respuestas metabólicas

6.5.1. Análisis bioquímicos de hemolinfa

En este apartado se presentan los resultados que cubren el último objetivo específico que fue el de evaluar y comparar las respuestas metabólicas, utilizando como criterio los análisis de la química hemolinfática (Cuadro 12). En términos de concentraciones de los diversos metabolitos se descubrió que existe una influencia de la salinidad y temperatura del medio sobre los metabolitos analizados.

En los apartados siguientes se analizan los resultados del análisis bioquímico de hemolinfa por cada metabolito, comparando entre los resultados de juveniles sanos (control) y juveniles en desafío al virus de la macha blanca (I).

6.5.1.1. Glucosa

Existieron diferencias significativas entre los juveniles sanos e infectados en todos los tratamientos de prueba. La mayor concentración de glucosa se observó en los tratamientos con una salinidad de 35 g/l; en donde los análisis a juveniles sanos alcanzaron valores superiores a los 70 mg/dl, presentando diferencias significativas con los juveniles en desafío al WSSV a esta misma salinidad. En los tratamientos en desafío al WSSV sujetos a 15 y 5 g/l de salinidad, se observó una tendencia en la disminución en la concentración de glucosa, descubriéndose que conforme la salinidad es menor la concentración de glucosa se reduce.

6.5.1.2. *Colesterol*

Se presentaron diferencias significativas en las concentraciones de colesterol entre juveniles sanos y en desafío a WSSV en los tratamientos sujetos a la salinidad de 35 y 5 g/l. La mayor concentración de este metabolito se detectó en la salinidad de 35 g/l en los juveniles infectados. La tendencia de los análisis señala que a menor salinidad la concentración de colesterol disminuye tanto en juveniles sanos como en aquellos en desafío al virus de la mancha blanca WSSV.

6.5.1.3. *Triacilglicéridos*

Se registraron diferencias significativas en todos los tratamientos a todas las salinidades, la mayor concentración de triacilglicéridos se detectó en tratamientos a 35 g/l de salinidad, tanto en juveniles control como en infectados, a su vez la menor concentración se obtuvo en juveniles sanos y enfermos sujetos a una salinidad de 5 g/l. Estos resultados señalan la misma tendencia a la disminución según la salinidad se reduce y a incrementarse según mayor salinidad.

6.5.1.4. *Lactato*

Existieron diferencias significativas sólo en tratamientos cuyas salinidades fueron de 15 y 5 g/l con temperatura de 27°C. La mayor concentración de lactato se registró a una salinidad de 15 g/l en hemolinfa de juveniles sanos y en desafío al virus de la mancha blanca WSSV; a su vez la menor concentración fue detectada en aquellos juveniles expuestos a la salinidad de 35 g/l. Se puede deducir que al comparar entre juveniles sanos e infectados con el virus de la mancha blanca WSSV conforme la salinidad sea menor, la concentración de lactato circulante en hemolinfa de juveniles de *L. vannamei* es mayor que en aquellos acondicionados a salinidades oceánicas.

6.5.1.5. *Proteínas totales*

Se encontraron diferencias significativas entre juveniles sanos y enfermos en los tratamientos cuyas salinidades fueron de 15 y 5 g/l; la mayor concentración se presentó en la salinidad de 15 g/l y la menor fue

detectada en la salinidad de 5 g/l. En general, las proteínas circulantes en hemolinfa de juveniles de *L. vannamei* permanecen en proporciones similares entre juveniles sanos y en desafío al virus de la mancha blanca WSSV en salinidades de 15 y 35 g/l, sin embargo en salinidades de 5 g/l la concentración además que disminuye, también reduce su diferencia entre la concentración registrada en juveniles sanos y aquellos en desafío a la enfermedad.

6.5.1.6. Hemocianina

Existieron diferencias significativas entre juveniles sanos y aquellos en desafío al WSSV acondicionados a tratamientos cuyas salinidades fueron de 35 y 15 g/l. La mayor concentración de hemocianina se detectó en los tratamientos con la salinidad de 15 g/l. La tendencia en la concentración de hemocianina en hemolinfa de camarones infectados con el virus señala que en salinidades de 35 y 15 g/l, la concentración de esta proteína permanece constante, sin embargo tiende ligeramente a incrementarse conforme la salinidad es menor.

Cuadro 12. Concentraciones promedio \pm desviación estándar de metabolitos en hemolinfa de juveniles de *L. vannamei* sanos (C) e infectados (I) a diferentes temperaturas (20, 27 y 33°C) y salinidades (5, 15 y 35 g/l) del agua (n=618). Unidades de Glucosa, Colesterol, Triacilglicéridos y Lactato en mg/dl; unidades de Proteínas totales en g/dl y Hemocianina en mmol/l.

Metabolito	TRATAMIENTOS								
	20°C/35 g/l	27°C/35 g/l	33°C/35 g/l	20°C/15 g/l	27°C/15 g/l	33°C/15 g/l	20°C/5 g/l	27°C/5 g/l	33°C/5 g/l
Glucosa (C)	72.5 \pm 7 ^a	72.1 \pm 6.8 ^a	74.4 \pm 8.2 ^a	39.3 \pm 1.3 ^b	59.4 \pm 1.1 ^a	31.7 \pm 1.1 ^b	27.3 \pm 0.9 ^a	28.7 \pm 1.2 ^a	18.7 \pm 1.0 ^b
Glucosa (I)	58.3 \pm 3.1 ^b	36.5 \pm 2.6 ^c	41.2 \pm 2.6 ^{bc}	33.5 \pm 1.3 ^b	62 \pm 2.0 ^a	37 \pm 1.45 ^b	30.9 \pm 1.0 ^a	30.5 \pm 1.2 ^a	18.8 \pm 0.8 ^b
Colesterol(C)	23.1 \pm 5.5 ^a	9.4 \pm 1.5 ^b	8.9 \pm 1.8 ^b	8.0 \pm 0.0 ^a	10.6 \pm 0.3 ^a	10.7 \pm 0.4 ^a	10.3 \pm 0.2 ^a	5.5 \pm 0.1 ^b	7.5 \pm 0.0 ^a
Colesterol(I)	28.8 \pm 2.4 ^a	10.7 \pm 2.4 ^b	8.5 \pm 1.8 ^b	9.0 \pm 0.0 ^a	12.9 \pm 0.3 ^a	9.1 \pm 0.8 ^a	10.4 \pm 0.4 ^a	12.0 \pm 0.2 ^a	4.5 \pm 0.1 ^b
Triacilg.(C)	69.5 \pm 9.8 ^a	19.0 \pm 1.3 ^b	18.8 \pm 1.7 ^b	20.2 \pm 0.5 ^b	33.2 \pm 1.2 ^a	35.6 \pm 1.3 ^a	43.8 \pm 1.7 ^a	21.6 \pm 0.4 ^b	20.8 \pm 0.5 ^b
Triacilg.(I)	66.6 \pm 4.7 ^a	17.9 \pm 3.9 ^b	19.8 \pm 3.7 ^b	20.4 \pm 0.7 ^b	31.7 \pm 0.8 ^a	25.5 \pm 1.4 ^b	31.0 \pm 0.8 ^a	26.0 \pm 0.6 ^b	12.0 \pm 0.5 ^c
Lactato (C)	9.6 \pm 2.8 ^a	6.3 \pm 1.3 ^a	7.5 \pm 2.13 ^a	13.7 \pm 2.4 ^b	13.8 \pm 4.8 ^b	9.9 \pm 4.3 ^b	9.4 \pm 1.9 ^a	5.8 \pm 1.5 ^b	9.3 \pm 3.3 ^a
Lactato (I)	7.4 \pm 2.5 ^a	7.6 \pm 1.8 ^a	6.2 \pm 1.9 ^a	13.4 \pm 1.8 ^b	18.6 \pm 4.4 ^a	11.0 \pm 4.1 ^b	12.7 \pm 1.9 ^a	13.0 \pm 1.9 ^a	9.7 \pm 1.7 ^a
Prot. Tot.(C)	7.2 \pm 2.5 ^a	7.9 \pm 2.7 ^a	5.7 \pm 1.8 ^a	5.4 \pm 0.1 ^b	9.9 \pm 0.2 ^a	6.4 \pm 0.34 ^b	6.9 \pm 0.43 ^a	5.3 \pm 0.3 ^a	5.3 \pm 0.1 ^a
Prot. Tot. (I)	6.7 \pm 2.2 ^a	5.2 \pm 1.8 ^a	6.3 \pm 1.6 ^a	5.7 \pm 0.1 ^b	10 \pm 0.5 ^a	9.3 \pm 0.9 ^a	3.7 \pm 0.5 ^b	7.3 \pm 0.7 ^a	4.6 \pm 0.3 ^b
Hc. (C)	1.3 \pm 0.0 ^a	1.1 \pm 0.0 ^a	1.1 \pm 0.0 ^a	1.7 \pm 0.5 ^a	1.2 \pm 0.3 ^a	1.6 \pm 0.5 ^a	1.3 \pm 0.3 ^a	1.0 \pm 0.18 ^a	1.2 \pm 0.3 ^a
Hc. (I)	1.5 \pm 0.0 ^a	0.2 \pm 0.0 ^b	0.9 \pm 0.0 ^a	0.6 \pm 0.2 ^b	1.2 \pm 0.0 ^a	0.6 \pm 0.3 ^b	1.4 \pm 0.3 ^a	1.0 \pm 0.3 ^a	0.9 \pm 0.2 ^a

Análisis por salinidad, literales desiguales indican diferencias significativas (P<0.05).

6.5.2. Comportamiento osmótico

En este apartado se presentan los resultados del comportamiento osmótico de los juveniles sanos y en desafío al virus de la mancha blanca (WSSV) expuesto a los diferentes tratamientos de prueba. Se sabe que el trabajo osmótico de un organismo es mínimo y gasta menos energía cuando el medio externo y los fluidos corporales están en equilibrio, por lo cual bajo condiciones isosmóticas el organismo se desarrolla mejor.

6.5.2.1 Presión osmótica

En el Cuadro 13, se observa la presencia de diferencias significativas entre la concentración osmótica detectada en hemolinfa de juveniles en desafío al WSSV y juveniles sanos. Los juveniles experimentales de los tratamientos 20°C/35 g/l, 27°C/15 g/l, 20°C/5 g/l 27°C/5 g/l y 33°C/5 g/l revelaron valores 827,604, 566, 537 y 570 mmol/kg respectivamente, figurando por encima a los obtenidos en estos mismos tratamientos en los juveniles control (787, 637, 626, 571 y 557 mmol/kg). Por otra parte no se observaron diferencias significativas en el tratamiento 27°C/35 g/l, 33°C/35 g/l, 20°C/15 g/l, 33°C/ 15 g/l entre juveniles control y experimentales. En los tratamientos 27°C/15 g/l y 20°C/5 g/l las concentraciones osmóticas en juveniles control fueron superiores en 30 y 60 unidades respectivamente a las registradas en juveniles infectados.

Cuadro 13. Comparación de la presión osmótica (mmol/kg) de hemolinfa y medio acuático entre juveniles de *L. vannamei* en desafío al virus de la mancha blanca (WSSV) y sanos, sujetos a diversas condiciones de temperatura (20, 27 y 33°C) y salinidad (5, 15 y 35 g/l).

Tratamientos	20°C/35 g/l	27°C/35 g/l	33°C/35 g/l	20°C/15 g/l	27°C/15 g/l	33°C/15 g/l	20°C/5 g/l	27°C/5 g/l	33°C/5 g/l
Hemolinfa									
N	36	18	36	30	45	48	36	18	42
P. Osmo (C)	787±30.3 ^b	641±26 ^c	780±32.4 ^b	613±24 ^{bc}	637±19.4 ^b	680±14 ^a	626±14 ^a	571±11.1 ^b	557±13.2 ^c
P. Osmo (I)	827±25.8 ^a	690±36.6 ^c	760±27.4 ^b	603±17 ^c	604±18.9 ^c	692±20 ^a	566±11 ^{bc}	537±13.4 ^c	570±14.2 ^b
Agua									
N	12	6	12	10	15	16	12	6	14
P. Osmo (I)	905±61	857±16.8	924±65.5	542±34.6	530±25.8	565±16.7	332±23.8	333±26.3	352±28.7
P. Osmo (C)	884±54	858±20.8	917±48.3	551±13.5	532±23.1	568±14.4	336±25.7	315±11.3	335±23.1

Análisis por salinidad, literales desiguales indican diferencias significativas (P<0.05).

6.5.2.2. Capacidad osmótica

En la Figura 17 se aprecia que los organismos tuvieron un comportamiento hiperosmótico en tratamientos con salinidades de 5 y 15 g/l, sin embargo en tratamientos a una salinidad de 35 g/l el comportamiento fue hiposmótico. Los juveniles que fueron expuestos a una condición hiposmótica (5 g/l) mantuvieron una capacidad osmótica entre los 200 y 289 mmol/kg, por otra parte los acondicionados a 15 g/l presentaron valores apenas por encima de 100 mmol/kg. En el caso de los tratamientos expuestos a 35 g/l los valores figuraron en un rango desde -77 a -216 mmol/kg. Cabe señalar que aunque existieron diferencias estadísticas en la concentración osmótica entre juveniles sanos e infectados, no se obtuvieron diferencias significativas entre la capacidad osmótica de juveniles sanos y en desafío al virus de la mancha blanca en ningún tratamiento evaluado.

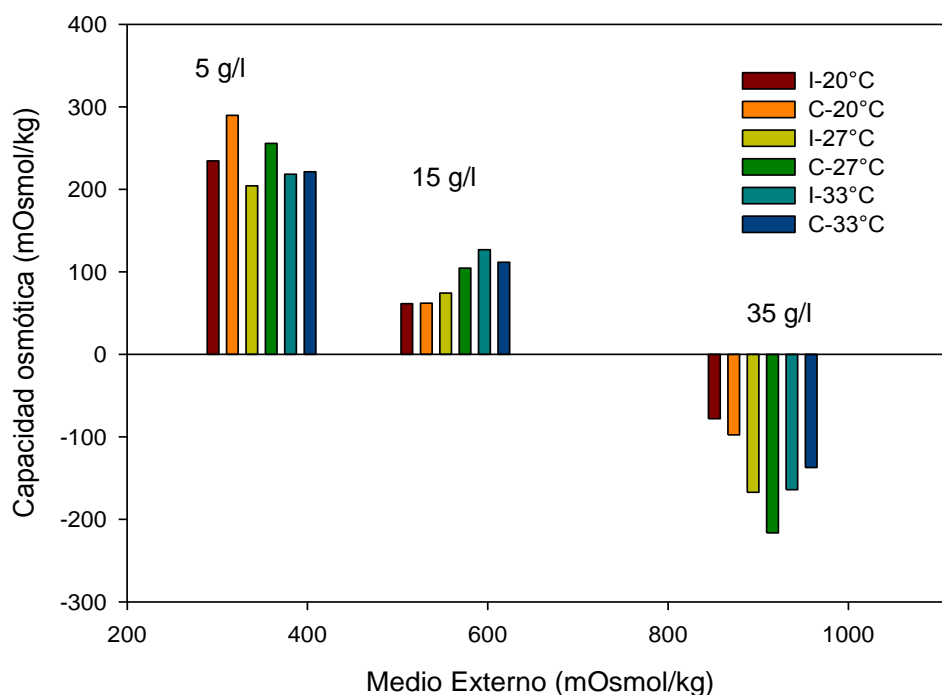


Figura 17. Capacidad osmorreguladora de juveniles sanos (C) y en desafío al virus de la mancha blanca (I) de *L. vannamei* en diferentes condiciones de temperatura (20, 27 y 33°C) y salinidad (5, 15 y 35 g/l).

6.5.2.3. Determinación de puntos isosmóticos

En la Figura 18 se presenta la osmolaridad de la hemolinfa la cual se relacionó de manera lineal con respecto a la del medio externo, obteniéndose las ecuaciones:

$$\text{OH a } 20^{\circ}\text{C} = 353.42 + (0.503 \times \text{OM}), r^2 = 0.95$$

$$\text{OH a } 27^{\circ}\text{C} = 438.48 + (0.261 \times \text{OM}), r^2 = 0.88$$

$$\text{OH a } 33^{\circ}\text{C} = 394.54 + (0.417 \times \text{OM}), r^2 = 0.94$$

En donde OH representa la osmolaridad de la hemolinfa y OM la osmolaridad del medio externo. Los valores de las pendientes de la relación entre la concentración osmótica del medio y de hemolinfa de juveniles de *L. vannamei* en desafío al virus de la mancha blanca WSSV aclimatados a 20, 27 y 33°C y expuestos a diferentes salinidades fueron 0.5, 0.26 y 0.41 respectivamente. Una desviación de la pendiente de la línea isosmótica refleja el grado de la capacidad de regulación (pendiente=0 osmorregulador, pendiente=1 osmoconformador), organismos con pendientes elevadas como los obtenidos con juveniles infectados, presentaron una regulación hiperosmótica. Los puntos isosmóticos obtenidos en los juveniles infectados aclimatados a 20, 27 y 33°C, tuvieron un intervalo de 601.83 a 708.93 mmol/kg (21.12-24.8 g/l).

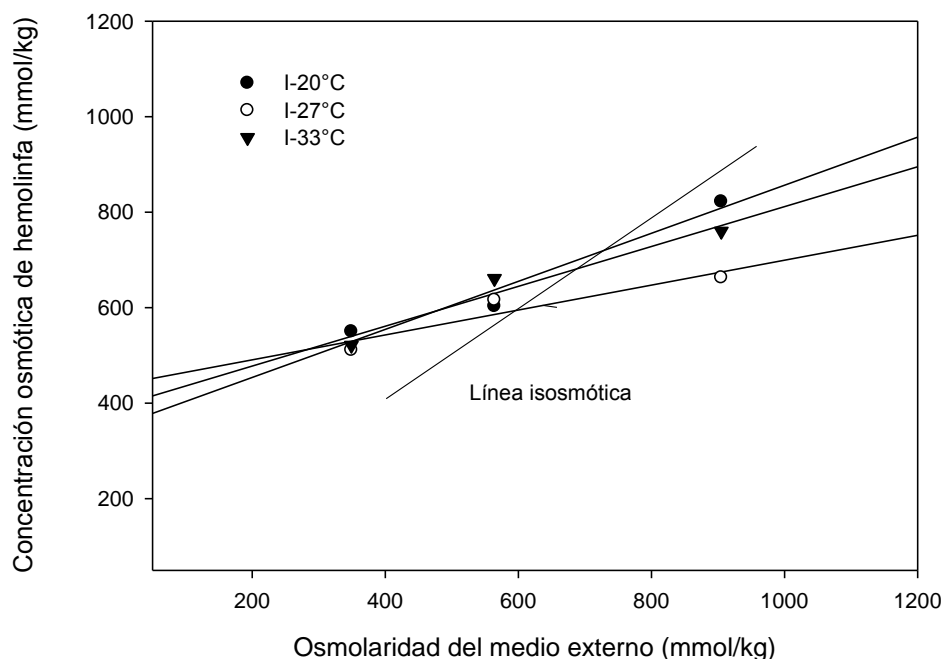


Figura 18. Relación entre la osmolaridad de la hemolinfa y osmolaridad del medio en juveniles de *L. vannamei* en desafío al virus de la mancha blanca (I) a diferentes condiciones de temperatura (20, 27 y 33°C) y salinidad (5, 15 y 35 g/l).

En la Figura 19 se muestra el análisis entre la osmolaridad de hemolinfa de juveniles sanos (C) con la osmolaridad del medio externo, obteniéndose las ecuaciones siguientes:

$$\text{OH a } 20^{\circ}\text{C}=487.79+(0.310 \times \text{OM}), r^2=0.80$$

$$\text{OH a } 27^{\circ}\text{C}=545.77+(0.117 \times \text{OM}), r^2=0.88$$

$$\text{OH a } 33^{\circ}\text{C}=435.18+(0.392 \times \text{OM}), r^2=0.96$$

Los valores de las pendientes de la relación entre la concentración osmótica del medio y de hemolinfa de juveniles de *L. vannamei*, aclimatados a 20, 27 y 33°C y expuestos a diferentes salinidades fueron 0.31, 0.11 y 0.39 respectivamente, por lo cual organismos con pendientes elevadas como los obtenidos en 20 y 33°C presentaron una regulación hiperosmótica. El valor de la pendiente para los organismos mantenidos a 27°C reflejó la característica de fuerte regulador. Los puntos isosmóticos obtenidos en los juveniles sanos aclimatados a 20, 27 y 33°C, tuvieron un intervalo de 619 a 720.3 mmol/kg (21.7-25.2 g/l).

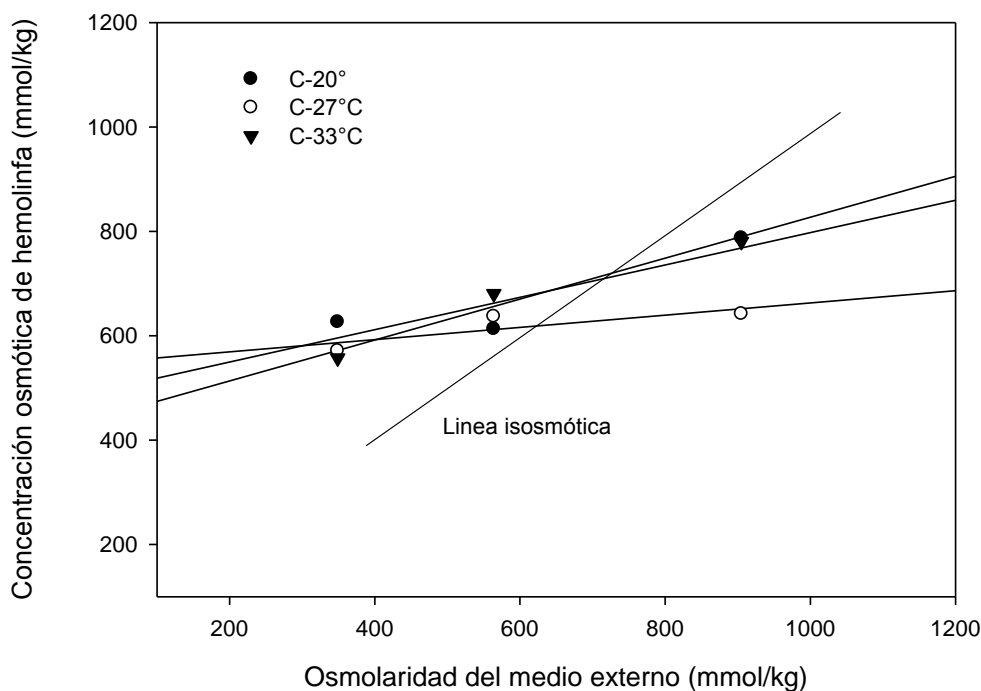


Figura 19. Relación entre la osmolaridad de la hemolinfa y osmolaridad del medio en juveniles sanos (C) de *L. vannamei* a diferentes condiciones de temperatura (20, 27 y 33°C) y salinidad (5, 15 y 35 g/l).

6.5.2.4. Análisis de Correlación de Pearson entre sobrevivencia y capacidad osmótica.

Este análisis se realizó para conocer el grado de asociación entre la tasa de sobrevivencia y la capacidad osmótica y determinar si la combinación de la salinidad y la temperatura del agua influyó sobre la sobrevivencia de los juveniles además del desafío a la enfermedad; resultando que en la mayoría de los tratamientos existió una mínima asociación entre estas variables. Sólo en dos tratamientos se observa correlación; estos resultados los podemos ver en el Cuadro 14, en donde se detectó que el efecto de las condiciones de temperatura y salinidad de los tratamientos: 20°C/35 g/l y 33°C/35 g/l; 20°C/15 g/l, 27°C/15 g/l y 33°C/15 g/l, no influyó en gran medida en el resultado de la sobrevivencia, sino que la capacidad osmótica presentó una tendencia a incrementarse como una medida del organismo para mantener la homeostasis, situación que no fue suficiente y la sobrevivencia se fue disminuyendo. En los tratamientos 27°C/5 g/l y 33°C/5 g/l la asociación entre ambas variables fue muy reducida y con tendencia mínima al incremento de ambas. Por otra parte se encontró que en los tratamientos 27°C/35 g/l y 20°C/5 g/l ($r = 0.628$ y 0.753), el efecto de los

tratamientos del medio acuático aunado al desafío a la infección influyó en la sobrevivencia de los juveniles de camarón.

Cuadro 14. Matriz de correlación entre la tasa de sobrevivencia y capacidad osmótica de juveniles de *Litopenaeus vannamei* en desafío al virus de la mancha blanca WSSV sujetos a diferentes temperaturas (20, 27 y 33°C) y concentraciones de salinidad (5, 15 y 35 g/l)

Tratamiento	R	P	N
20°C/35 g/l	-0.229	0.180	36
27°C/35 g/l	0.628	0.00395*	18
33°C/35 g/l	-0.216	0.206	36
20°C/15 g/l	-0.308	0.0982	36
27°C/15 g/l	-0.0256	0.867	45
33°C/15 g/l	-0.129	0.381	48
20°C/5 g/l	0.753	0.000000115*	36
27°C/5 g/l	0.291	0.241	18
33°C/5 g/l	0.0141	0.929	42

*Valores relacionados significativamente ($P < 0.05$).

VII. DISCUSIÓN

La industria del cultivo de camarón esta sufriendo pérdidas ocasionadas por enfermedades infecciosas virales y bacterianas, esto ha ocasionado que en los últimos años se desarrolle investigación sobre el mejoramiento en la inmunidad del camarón y así aumentar su resistencia y sobrevivencia en su cultivo (Hsieh et al., 2008). La alta virulencia del virus de la mancha blanca (WSSV) y su rápida diseminación dentro del organismo, ha conducido al establecimiento y manejo de herramientas eficaces para diagnosticar esta enfermedad en un menor tiempo antes que el virus cause daños celulares e invada los órganos (Tan et al., 2001); a su vez se han propuesto otras herramientas bioquímicas de evaluación para apoyar en el diagnóstico de salud y estado nutricional de los camarones (Pascual et al., 2003a), sólo que esto no suele ofrecer resultados claros y seguros como sucede con el examen de sangre en mamíferos dado que aún no existen valores estandarizados de referencia para los diferentes parámetros hematológicos en crustáceos, siendo estos patrones muy variables hasta dentro de una misma población, mismo sexo o mismo estadio de desarrollo (Barracco et al., 2008). En este sentido este trabajo aporta referencias presentando el desarrollo de la enfermedad de la mancha blanca en juveniles de *L. vannamei* al estar sujeto a diversas condiciones de temperatura y salinidad, cuantificando carga viral, señalando lesiones macro y microscópicas en diversos tejidos de las diversas etapas de la enfermedad, al igual que el seguimiento de la sobrevivencia y concentraciones de metabolitos; por lo cual estos resultados complementan algunos ya reportados por otros investigadores con diversas especies de camarón en diversas condiciones experimentales e incluso en diferentes tejidos analizados.

7.1. Análisis de la infección viral

Como se describió anteriormente el grado de infección por el virus de la mancha blanca se detectó por PCR (punto final y tiempo real) en muestras de hemolinfa en los tratamientos experimentales (excepto aquellos en donde la temperatura del agua fue de 33°C), identificándose las etapas de la enfermedad, al igual que lo reportaron Tan et al. (2001), quienes determinaron la curva de replicación viral del virus de la mancha blanca en *P. monodon* mediante un análisis de qPCR competitivo, en donde se identificaron tres fases; la primera la llamaron fase eclipse (ligera) que figuró desde las 0 a las 24 hpi; la segunda se registró como fase logarítmica (moderada) de las 24 a las 48 hpi y la tercera la denominaron fase estable (grave) registrada a partir de las 48 a las 120 hpi en la cual los organismos ya presentaban signos clínicos de la enfermedad y moribundos.

En experimentos presentados por Yoganandhan et al. (2003b), con *P. indicus* a una temperatura de 28°C y 25 g/l de salinidad, detectaron el virus de la mancha blanca (WSSV) en hemolinfa a las 6 hpi y en otros órganos como branquias, pedúnculo ocular, apéndices y tejido conectivo a las 12 hpi, por medio de PCR punto final; sin embargo en nuestro experimento los tratamientos mantenidos a 33°C, en todas las salinidades evaluadas, el virus no fue detectado al realizar PCR punto final ni PCR cuantitativo en muestras de hemolinfa, esto se cree que se debió a un efecto del sistema inmune del camarón en donde la liberación de lisozima o células inmunocompetentes tipo interferón (Sotelo et al. 2003; He et al. 2005) y/o la ejecución de muerte celular tipo II no apoptótica por parte de los hemocitos halinos (Bergamini et al. 2007), pudo haber sido la causa que no existiera detección por métodos moleculares en la hemolinfa de los juveniles en desafío al WSSV. Esta misma situación sucedió en experimentos realizados por Vidal et al. (2001) con *L. vannamei* en infecciones realizadas con el mismo virus a 32°C y 29 g/l, en donde se registraron daños severos y presencia de esferoides y lesiones en órgano linfoide, presentando una detección negativa por PCR en hemolinfa, esto se puede atribuir a que la hipertermia además de afectar la replicación viral (You et al., 2010), estimula el sistema inmune del camarón para solventar el desafío a la infección liberando citoquinas en la hemolinfa (Abbas et al., 1997). Las citoquinas son glicoproteínas de pequeño peso molecular entre 10 y

20 kDa, sintetizadas por las células del sistema inmune o neuroendocrino durante la fase efectora de la respuesta inmune, sus funciones principales son actuar como moduladores de los principales procesos inmunes tales como la inflamación, proliferación, citotoxicidad y apoptosis, así como participar en cascadas de señalización celular (Nisticó, 1993; Blalock, 1994; Brozek y Ley, 1991). A su vez en investigaciones llevadas a cabo por Motesdeoca et al. (2002) con la respuesta inmunitaria celular con juveniles de *L. vannamei* en desafío al virus de la mancha blanca (WSSV) formularon un modelo para dar respuesta a la nula detección por PCR en hemolinfa rosada de juveniles infectados, indicando que ante el desafío al camarón este respondería generando hemocitos e infiltrándolos en los tejidos infectados y/o tejidos donde se incrementen las posibilidades de encuentro con el patógeno. Los hemocitos hialinos combatirían la agresión viral mediante fagocitosis, en tanto que los hemocitos semigranulares y los granulares encapsularían células infectadas y hemocitos desgastados. Cuando la proliferación celular se detiene por infección del tejido hematopoyético por ejemplo, el virus gana terreno, en tanto que se acumularán en circulación hemocitos desgastados, los mismos que al liberar su peligroso contenido en la hemolinfa, melanizarán el plasma tornándolo rosado, a su vez se señala que no todos los organismos con hemolinfa rosada mueren, sino que existe una recuperación una vez transcurrida la etapa aguda de la enfermedad. Estos resultados indican que el camarón presenta una excelente respuesta inmunitaria celular para combatir al virus de la mancha blanca, incluso para llegar a eliminarlo siempre y cuando el organismo se encuentre bajo las condiciones fisiológicas adecuadas y aclimatado a una temperatura del agua de 33°C, que serviría como un inmunoestimulante ambiental previo a la infección (Sonnenholzner et al., 2002). Por otra parte la hipotermia en otras especies funciona de la misma forma; dado que en un estudio reciente realizado por Gao et al. (2011), en donde evaluaron diferentes temperaturas (15, 20, 25, 30 y 35°C), salinidades (15, 20, 25, 30 y 35 g/l) y pH (6.5, 7.5, 8.0, 8.5 y 9.0) con *Fenneropenaeus chinensis* en desafío al virus de la mancha blanca; se observó que en hipotermia (15°C), a las 72 hpi, disminuía considerablemente la replicación del virus, descubriendo con la ayuda de PCR cuantitativo (qPCR) que a esta temperatura se obtuvo la menor concentración viral, obteniendo 0.626 copias/ng de muestra; contrastando con las registradas

en 25°C, que fue la temperatura óptima de replicación en donde se alcanzaron 11,102.48 copias/ng.

7.2. Desarrollo de la enfermedad de la mancha blanca

En la presente investigación se observaron daños en tejidos a nivel macro y microscópicamente en los juveniles de *L. vannamei* expuestos a los diversos tratamientos de prueba. Se observó una mayor incidencia de severidad en aquellos tratamientos a 27°C y en menor escala en donde la temperatura del agua fue de 33°C. Caso contrario sucedió en experimentos desarrollados por Vidal et al. (2001) con *L. vannamei* en desafío a este mismo virus a 32°C/29 g/l de salinidad, observaron daño severo en glándula antenal y la presencia de esferoides y lesiones severas en órgano linfoide., en similares condiciones, Motesdeoca et al. (2002) detectaron daños severos en tejido conectivo esponjoso, bajo el epitelio cuticular del estómago, en corazón glándula antenal y en los espacios intertubulares de la periferia del hepatopáncreas en donde se descubrieron nódulos de forma circular a oval, constituidos por un número de 3 hasta 19 hemocitos, los cuales rodeaban materiales que al parecer eran células infectadas y/o núcleos picnóticos. Un signo histológico del virus de la mancha blanca encontrado en nuestro estudio fue la necrosis que presentaron las muestras de los camarones con infección y que se fue agravando en los camarones hasta la etapa aguda. En estudios realizados por Wongteerasupaya et al. (1995), los camarones infectados por el virus de la mancha blanca; presentan una necrosis variable en la mayoría de los tejidos de origen ectodérmico y mesodérmico. Todos los camarones que desarrollaron una infección severa, murieron presentando lesiones de tipo G3 en la mayoría de sus tejidos y coloración rojiza del cuerpo. En los mismos, el epitelio de estómago, seguido de la glándula antenal mostraron grados muy severos de infección. Estos camarones presentaron además un alto grado de necrosis, lo cual está de acuerdo a los resultados reportados por Wang et al. (1999), quienes describieron que la mayoría de los órganos y tejidos de camarones fuertemente infectados por el virus de la mancha blanca muestran una necrosis focal que conduce a la pérdida de la estructura tisular. Las observaciones histopatológicas siguieron esta misma tendencia, revelando la aparición de células con inclusiones eosinófilas en desarrollo (células tipo

Cowdry A) así como cuerpos de inclusión intranucleares basófilas observadas en tejido conectivo, epitelio gástrico, epitelio dérmico, branquias, tejido hematopoyético, órgano linfoide y glándula antenal. Todos estos resultados concuerdan con lo descrito por otros autores con especies como *P. monodon* (Chang et al., 1996; Karunasagar et al., 1997; Kou et al., 1998; Lo et al., 1997) *P. japonicus* (Chou et al., 1995) y *P. indicus* (Yoganandhan et al., 2003b) en los cuales se han empleado varias vías de infección, la intramuscular, inmersión y oral, coincidiendo todos que independientemente de la forma en que ingrese el virus en las diferentes especies de camarones, los órganos son igualmente afectados. Los organismos infectados en el presente trabajo, no mostraron daños celulares característicos de la infección en hepatopáncreas, como la formación de cuerpos de inclusión, en referencia a esto, no se tienen reportados hasta el momento la aparición de inclusiones celulares en hepatopáncreas (Chang et al., 1996; Yoganandhan et al., 2003b).

Los resultados aquí obtenidos sugieren que los camarones mueren con una infección avanzada en los tejidos, dado que un extenso daño en los tejidos puede ser suficiente para reducir la eficiencia fisiológica y funcional de los hospederos, provocando que aumenten los signos clínicos de la epizootia por el virus de la mancha blanca (Rajan et al. 2000).

7.3. Sobrevivencia

Se sabe que el camarón es un organismo poiquilotermo, por lo cual la temperatura del agua es uno de los parámetros más significativos en su metabolismo, influyendo directamente en la sobrevivencia, estado de salud, crecimiento y respuesta inmune (Pan et al., 2008). Se han realizado investigaciones donde se reporta que existe una relación entre el aumento de la temperatura del agua y el virus de la mancha blanca; condición que le permite al camarón “controlar” la enfermedad y sobrevivir a este desafío; se piensa que esto se debe a que la temperatura del agua influye en el sistema inmune del organismo, alterando la concentración de hemocitos en la hemolinfa, los cuales juegan un papel fundamental pues tienen la tarea de reconocer y fagocitar patógenos, además de melanizar tejido infectado (Le Moullac y Haffner, 2000; Vidal et al., 2001; Granja et al., 2003; Rodríguez et al.,

2003; Granja et al., 2006; Rahman et al., 2007; Reyes et al., 2007; Rodríguez et al., 2009). Se reporta que a temperaturas inferiores a 30°C *L. vannamei* presenta una mayor vulnerabilidad a la infección por el virus de la mancha blanca; (Rahman et al., 2007; Esparza et al., 2010). Vidal et al. (2001) obtuvieron una sobrevivencia del 100% en aquellos tratamientos con juveniles de *L. vannamei* en desafío al virus de la mancha blanca a temperaturas promedio de 32°C, alcanzando más de 960 hpi. Por otra parte Guan et al. (2003), señalaron que la temperatura del agua afectó varios pasos del ciclo replicativo del virus de la mancha blanca provocando absorciones irreversibles y una variabilidad en la tasa de absorción y síntesis de moléculas como proteínas y ácidos nucleicos. Acorde a esto, unos años más tarde Rahman et al. (2006) concluyeron que temperaturas por encima de 16°C y debajo de 32°C permiten que la replicación del virus de la mancha blanca sea más eficiente en hospederos como camarones, cangrejos y langostinos afectando gravemente la sobrevivencia; confirmando esta situación en estudios realizados por You et al. (2010) y Mosera et al. (2011), quienes ratificaron que altas temperaturas impidieron la aparición de la enfermedad reduciendo significativamente la mortalidad de los camarones infectados con el virus (WSSV); demostrando que la alta temperatura del agua inhibe la replicación del virus. Lo descrito anteriormente señala que la temperatura del agua influye sobre la replicación viral del virus de la mancha blanca; pero no es la única causa. Todos estos resultados ya descritos, permiten asumir el postulado que llevó a Flegel y Pasharawipas (1998) a formular el concepto de “acomodación viral” (en inglés: *Active Viral Accommodation*), el cual se refiere a una respuesta de los crustáceos a patógenos virales caracterizada por una “acomodación activa” (en inglés: *Active Accommodation*) más que una resistencia al virus, señalando que una epizootia viral en camarones podría conducir a una “tolerancia” a los virus. Los resultados encontrados en esta investigación testifican este postulado, sin embargo es necesario continuar desarrollando esta línea de investigación evaluando otros crustáceos la sobrevivencia al virus bajo diversas condiciones térmicas.

7.4. Respuestas metabólicas

El análisis de metabolitos en hemolinfa según los resultados obtenidos en el presente estudio indicaron que una mayor concentración de glucosa, colesterol, triacilglicéridos, lactato, proteínas totales y hemocianina, el camarón presenta mayor resistencia para enfrentar el desafío al virus de la mancha blanca. Las condiciones de salinidad de 15 g/l y temperaturas 27 y 33°C favorecen a que exista un mejor perfil de metabolitos en hemolinfa de juveniles de *L. vannamei*, encontrándose que el tratamiento a una temperatura de 20°C con una salinidad de 35 g/l presentó los valores más elevados en glucosa, colesterol, triacilglicéridos, proteínas totales; que los registrados a esta misma temperatura con 15 y 5 g/l de salinidad, mostrando diferencia en la concentración de hasta el 60%. En los tratamientos sujetos a una temperatura de 27°C; el tratamiento 27°C/15 g/l presentó las concentraciones más elevadas de todos los metabolitos analizados al compararse con la salinidad de 35 y 5 g/l. Estos resultados podrían indicar que la concentración registrada en 27°C/15 g/l les permitió a los juveniles en desafío al WSSV alcanzar las 180 hpi respecto a 27°C/35 g/l y 27°C/5 g/l que no sobrevivieron más de 72 hpi. Reiterando esta situación, se observó que en el tratamiento a hipertermia (33°C) y salinidad de 15 g/l, la concentración de metabolitos fue mayor que en los tratamientos 33°C/35 g/l y 33°C/5 g/l; señalándose que estos dos tratamientos lograron alcanzar las 144 y 168 hpi respectivamente, sin embargo el tratamiento 33°C/15 g/l presentó una sobrevivencia del 65% después de las 444 hpi. Estos resultados permiten asumir que una salinidad cercana al punto isosmótico (26 g/l) presenta el menor gasto energético derivado a metabolismo de rutina y la excreción de productos nitrogenados (Valdez et al., 2008) aunado a temperaturas cercanas a su preferendum térmico que se sitúa entre 27 y 30°C, (Hernández et al., 2006) favoreciendo al organismo para concentrar en mayor medida los principales metabolitos que le permitirán transformarlos en energía (cual fuere su ruta) para mantener el sistema de defensa activo contra el desafío al virus de la mancha blanca. Por su parte González, (2010), quien encontró que la glucosa se incrementó hasta tres veces el valor basal en tan sólo diez minutos después de someter a los camarones a estrés térmico al igual que la actividad de la fenoloxidasas se activó rápidamente como respuesta a estrés para amortiguar el efecto del estresor. Vernberg (1983) indica que los

crustáceos cuentan con sistemas enzimáticos y fisiológicos que funcionan mejor cuando están cercanos a su óptimo de temperatura.

Glucosa

En ensayos reportados por Rosas et al. (2002a) en juveniles sanos de *L. vannamei* sujetos a temperaturas de 27 a 30°C, con un rango de salinidades de 15 y 40 g/l, reportaron una concentración de 38 mg/dl de glucosa; por otro lado Suseela et al. (2007) con *P. monodon* en desafío al virus de la mancha blanca en iguales condiciones de temperatura pero diferente salinidad (20 a 25 g/l); encontraron valores cercanos a 30 mg/dl de glucosa en tratamientos controles y 10 mg/dl en organismos infectados. Al confrontar todos estos resultados con los encontrados en nuestro experimento en los tratamientos 33°C/15 g/l (31.7 mg/dl) y 20°C/15 g/l (39.3 mg/dl), sólo existe cierta concordancia en las concentraciones de glucosa en los tratamientos control reportados por Rosas et al. (2002a) y Suseela et al. (2007). Hay que destacar que en tratamientos control en las tres temperaturas en 35 g/l de salinidad, las concentraciones figuraron por encima de 74 mg/dl, valores con más del 50% a los reportados por estos autores. En el caso de la concentración de glucosa en hemolinfa de juveniles en desafío al virus de la mancha blanca; el valor más reducido de este metabolito se registró en nuestro experimento en el tratamiento 33°C/5 g/l con 18.8 mg/dl, casi el doble de lo reportado por Suseela et al. (2007). Cabe recordar que las reducciones en la concentración de glucosa en hemolinfa de juveniles enfermos podría ser debido al estrés resultante por las condiciones ambientales además del estrés ocasionado por el patógeno. Racotta y Palacios (1998) reportaron que los niveles de glucosa y el lactato en la hemolinfa se ven fuertemente afectado por el estrés consumiendo mayor energía para tratar de lograr el equilibrio orgánico, aunado al déficit de glucosa producto de la anorexia, síntoma característico de la enfermedad, lo que posiblemente originó que la actividad de las aldolasas se encuentren al borde de la inhibición total de la gluconeogénesis por la pérdida de la actividad de la fructuosa 1-6 difosfatasa, que contribuye a la crisis de energía en un organismo enfermo (Suseela et al., 2007; Mathews et al., 2002). En respuesta al incremento en la demanda de energía para la compensación fisiológica por el estrés ocasionada por una patología en camarón, se han

observado cambios en formas de hiperglucemia, hiperlactemia e hiperlipidemias (Hsieh et al., 2008). Estas observaciones sugieren que la demanda metabólica de energía en el camarón blanco después de una infección puede ser derivada del metabolismo glucolítico y anaeróbico de los lípidos. Por otra parte, en la mayoría de los casos, cuando el camarón se encuentra sujeto a estrés o en desafío a un patógeno, el organismo tiende a aumentar el nivel de glucosa para repeler la infección y compensar el estrés (Hsieh et al., 2008); esto ocurre cuando existe el aumento de la actividad de glucosa-6-fosfato que promueve la producción de más NADPH (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato). La importancia de esto es que NADPH requiere de niveles adecuados de glutatión (GSH) para ayudar a superar el estrés oxidativo. El significativo aumento en la actividad enzimática en camarones infectados con WSSV; puede ser parte del mecanismo de defensa general frente al estrés oxidativo presentado durante la infección. Suseela et al. (2007) observaron que algunas enzimas que participan en el metabolismo de la glucosa en *P. monodon* se ven afectados durante la infección por virus de la mancha blanca. Es posible que los niveles de estas enzimas pudieran servir como indicadores de la gravedad de la infección y ser utilizados como marcadores en el diagnóstico. En general los datos encontrados en esta investigación muestran un comportamiento muy variable en la concentración de glucosa en hemolinfa de juveniles de *L. vannamei* debido a la compensación osmótica y térmica que el organismo debe de compensar para mantener su homeostasis, a su vez el desafío al patógeno afecta los balances a nivel de la hormona hiperglucémica de crustáceos (CHH), la cual está involucrada principalmente en la regulación de los niveles de glucosa en la hemolinfa, así como en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y en la osmorregulación (Ponce et al., 2005).

Colesterol y triglicéridos

Los valores de referencia de colesterol y triacilglicéridos reportados por Rosas et al., (2002a) con *L. vannamei* a temperatura de 27-30°C y 15 y 40 g/l, fluctuaron entre el 44 mg/dl y 104 mg/dl; valores por encima del 50% a los reportados en nuestra investigación en organismos sanos; situación similar se observó con juveniles de camarón sujetos a un rango de temperaturas entre los

24 y 27°C, y 15 g/l de salinidad de la especie *P. monodon* infectados con el virus de la mancha blanca, en donde se reportaron valores de colesterol de 57 mg/dl. (Joseph y Philip, 2007). Sin embargo Flores et al. (2008), descubrieron en sus experimentos con juveniles sanos de *L. vannamei* acondicionados a una temperatura de 28°C y 3 g/l de salinidad, que los valores encontrados de colesterol fueron 12.2 mg/dl, valor superior que el descubierto en el tratamiento control a 27°C/5 g/l (5.5 mg/dl), valor superado en más del 50%, sin embargo valores muy similares fueron registrados a los tratamientos control a 27°C/35 g/l, 33°C/35 g/l, 27°C/15 g/l, 33°C/15 g/l y 20°C/5 g/l con concentraciones cercanas a los 10 mg/dl. En experimentos realizados por Racotta y Palacios (1998) a una temperatura de 28°C y 35 g/l de salinidad, con juveniles sanos de *L. vannamei*, los valores de colesterol fueron 24 mg/dl, muy similares a los registrados en 20°C/35 g/l con organismos sanos e infectados con 23 mg/dl y 28 mg/dl respectivamente; en las concentraciones de triacilglicéridos, estos mismos autores reportaron concentraciones entre 40 mg/dl, hasta 29 mg/dl; en nuestro trabajo se detectaron concentraciones menores hasta en un 50% en 27°C/35 g/l en juveniles sanos y en desafío al virus de la mancha blanca; según lo descrito se puede inferir que las variaciones entre estas concentraciones de metabolitos se debe probablemente a diferencias en las especies analizadas, las tallas de los organismos y a las diferentes condiciones de temperatura y salinidad; además que en condiciones de hipotermia e hipertermia, aunado a la salinidad, la presión hidrostática cambia, y con esto, la conformación de las membranas celulares se modifica estructuralmente, presentándose una mayor concentración de fosfolípidos, afectando con esto el metabolismo de lípidos, carbohidratos y proteínas (Randall et al., 1998). A su vez cabe señalar que la reducción significativa de los metabolitos de la hemolinfa de camarones infectados bajo condiciones ambientales extremas podría explicarse como una desviación en el flujo de energía para apoyar esta compensación ya que están bajo una doble tensión: estrés patogénico y estrés metabólico (Joseph y Philip 2007). Pascual et al. (2003a) mencionan que conforme aumenta la temperatura el metabolismo de *L. setiferus* tiende a incrementarse, necesitando un aumento en el consumo de energía. Una temperatura elevada, puede alterar la permeabilidad de la membrana a iones que incrementan la pérdida de agua y/o el ingreso de iones afectando el balance osmótico (Weber y Spaargaren, 1970).

Como respuesta, los triglicéridos, colesterol y proteínas podrían utilizarse para reparar membranas y la glucosa usarse como fuente de energía para controlar la concentración interna de iones a través de la bomba Na/K-ATPasa.

Lactato

Respecto a la concentración de lactato, Arcos et al. (2003), evaluaron respuesta fisiológicas de camarones sanos de *L. vannamei* a 28°C y 37 g/l de salinidad en donde reportaron valores entre 10 y 11 mg/dl, similar a los detectados en el tratamiento 20°C/35 g/l con 9.6 (mg/dl). A su vez Racotta y Palacios (1998) a 28°C de temperatura del agua y 35 g/l de salinidad, los juveniles sanos de *L. vannamei* mostraron una concentración de lactato de 20 mg/dl, valor que al contrastar con las condiciones similares de nuestro experimento (27°C/35 g/l) presentó una diferencia menor al 70%. Por otra parte en juveniles de *L. vannamei* en desafío al virus de la mancha blanca (WSSV); en 27°C y 32 g/l de salinidad, Ruan et al. (2010), determinaron una concentración de lactato por encima de 22 mg/dl, valor que supera al encontrado en nuestro experimento en el tratamiento 27°C/35 g/l en desafío al virus de la mancha blanca; el cual registró 7.6 mg/dl, sin embargo la concentración obtenida en 27°C/15 g/l presentó un valor de 18.6 mg/dl, resultado muy cercano al reportado por estos autores; concentración que a su vez se repitió en investigaciones realizadas por Hsieh et al. (2008) bajo condiciones de cultivo con una temperatura a 27°C y 32 g/l de salinidad con *L. vannamei* en desafío a *Vibrio alginolyticus*, reportando concentración de lactato de 20 mg/dl. La concentración de lactato en hemolinfa de juveniles de camarón infectados puede atribuirse a la movilización de las reservas de energía de hepatopáncreas a tejidos para satisfacer la energía requerida para compensar la osmorregulación, compensación metabólica por efecto de la temperatura y la infección (Joseph y Philip, 2007). El aumento de la concentración de lactatos ocurre generalmente cuando la demanda de energía en tejidos sobrepasa la disponibilidad de oxígeno en hemolinfa, esto a consecuencia de alteraciones en la concentración de hemocianina; bajo estas condiciones la piruvato deshidrogenasa no alcanza a convertir el piruvato en Acetil-CoA lo suficientemente rápido y el piruvato comienza a acumularse. Esto generalmente inhibiría la glucólisis y con esto la reducción en la producción de

ATP (Joseph y Philip, 2007). La función de la producción de lactato es oxidar $\text{NADH} + \text{H}$ para regenerar la nicotinamida adenina dinucleótido (NAD^+) necesaria para la glucólisis y por consiguiente que continúe la producción de ATP (Mathews et al., 2002); el lactato producido sale de la célula muscular y circula por la hemolinfa hasta el hepatopáncreas en donde se vuelve a transformar en glucosa por gluconeogénesis (Rodríguez, 2007).

Existen otras moléculas como el glicerol y diversos aminoácidos además del lactato involucrados en la gluconeogénesis y que son alterados como resultado del desequilibrio metabólico a consecuencia de la infección (Suseela, 2007). Los camarones peneidos para obtener reservas energéticas y distribuirlas de manera efectiva entre los requerimientos de mantenimiento y crecimiento depende del efecto de los factores ambientales, la salinidad es uno de los que influye sobre el metabolismo de estos organismos (Rosas et al., 2001a; Zhu et al., 2006). Se ha reportado por Lemos et al. (2001) que la variación de la salinidad causó cambios en la composición bioquímica en postlarvas de *Farfantepenaeus paulensis* lo que provocó modificaciones en el contenido energético de los organismos; Así mismo, Rosas et al. (2002b) mencionaron que en juveniles de *L. vannamei* la salinidad es capaz de influenciar el metabolismo y utilizar algunos metabolitos para compensar el balance iónico.

Proteínas totales

La concentración de proteínas registradas en trabajos realizados por Racotta y Palacios (1998), con juveniles sanos a 28°C y 35 g/l de salinidad, fueron de 13 g/dl, valor que superó en tres unidades al valor máximo alcanzado en este experimento en tratamiento control de 27°C/15 g/l, seguido por 7.9 g/dl registrado en el grupo control en 27°C/35 g/l. El resto de los tratamientos fluctuaron entre 5.3 y 7.9 g/dl. En experimentos realizados por Yoganandhan et al., (2003a) con juveniles de *P. indicus* infectados con el virus de la mancha blanca y sujetos a un rango de temperatura entre 27 y 30°C e intervalos de salinidad entre 20 y 25 g/l; observaron un aumento del 20% en la concentración de proteínas en los juveniles sujetos al desafío a la infección. Este aumento en la concentración de proteínas totales en hemolinfa es debido a que la respuesta inmune en invertebrados está definida por la falta de memoria inmunológica y por la carencia de anticuerpos, por lo cual las proteínas multifuncionales en circulación forman un sistema de defensa muy eficaz para responder ante la presencia de cualquier patógeno. Otra explicación del aumento de proteína detectadas en la hemolinfa de camarones infectados puede ser debido a la actividad de proteasas y otras enzimas que "funden" literalmente algunos tejidos (músculo y hepatopáncreas) (Beckage, 1996), esta degradación se incorpora en la hemolinfa del camarón (Yoganandhan et al., 2003a).

Misma condición que se comparte con los resultados reportados por Joseph y Philip (2007) con *P. monodon*, en desafío al virus de la mancha blanca y sujetos a temperaturas entre los 24 y 27°C y 35 g/l de salinidad, en donde se registró un incremento significativo en la concentración de proteínas totales de 11 g/dl, valor por encima del 50% al encontrado en esta investigación. Es necesario indicar que en nuestro experimento se esperaba que los valores detectados de proteínas totales principalmente en aquellos organismos en desafío a la infección, fuesen mucho más elevados que los encontrados en organismos control dada la respuesta inmunitaria del organismo, pero esto sólo sucedió en los juveniles en el tratamiento 33°C/15 g/l (9.3 g/dl), presentando diferencias significativas respecto a los juveniles control (6.4 g/dl); lo que probablemente sucedió fue que los camarones utilizaron a las proteínas como fuente de energía, condición señalada por Rosas et al. (2002b),

indicando que éstas son empleadas no sólo para la formación de músculo o para producir glucógeno y glucosa a través de la ruta gluconeogénica, sino también en la osmorregulación por los ajustes de las membranas celulares. En el presente estudio el decremento de las proteínas totales fue acompañado por una disminución de la hemocianina.

Hemocianina

El análisis de la concentración de hemocianina en hemolinfa de juveniles de camarón arrojó diferencias significativas en el 67% de los tratamientos analizados, revelando que la concentración en tratamiento 20°C/15 g/l en organismos sanos, mostró diferencias significativas respecto a su tratamiento homólogo y antagonista, superándolo con más de un mmol/l.

La concentración más reducida de esta proteína se encontró en el tratamiento formado a partir de 27°C/35 g/l, registrándose un valor de 0.2 mmol/l en hemolinfa de juveniles en desafío al virus de la mancha blanca (WSSV); exponiendo una diferencia significativa de 0.9 mmol/l con el registrado en ese mismo tratamiento en juveniles sanos. En concentraciones de hemocianina, Pascual et al., 2003a; reportaron valores de 1.91 mmol/l en juveniles de *L. vannamei* sanos, datos que superan en un 27% al valor máximo alcanzado en este ensayo en organismos sanos a una temperatura de 20°C; por otra parte Rosas et al. (2002a), reportó 1.84 mmol/l de hemocianina, concentración superior al encontrado en este documento con valor cercano a la media unidad. En el caso de organismos en desafío al virus de la mancha blanca; Yoganandhan et al. (2003a), con juveniles de *F. indicus* a un rango de temperatura entre 27 y 30°C y salinidad entre 20 y 25 g/l, obtuvieron como mayor concentración 1.21 mmol/l reduciéndose hasta 0.67 mmol/ con juveniles moribundos; al contrastar estas concentraciones con los resultados de esta investigación, se aprecia en los organismos infectados en hipotermia que superó ligeramente esta concentración, alcanzando 1.5 mmol/l; sólo 0.3 mmol/l de diferencia; comportamiento muy similar se registró en organismos a normotermia con 0.21 mmol/l con una diferencia de 0.46 mmol/l.

La hemocianina es una proteína presente en la hemolinfa de los camarones, responsable del transporte de por lo menos el 90% del oxígeno hacia los órganos y tejidos, además constituye mas del 60 al 90% de las proteínas

circulantes (Pascual et al., 2003a). Esto puede indicar que en los juveniles infectados existió problemas de hipoxia en los tejidos por la reducción de oxígeno (Citarasu et al., 2006). Es importante recordar que esta proteína también presenta influencia en actividades inmunológicas del camarón, ya que los hemocitos cuentan con la facultad de convertir partes de la hemocianina en una enzima similar a la fenoloxidasa (Cuéllar-Anjel, 2008); a su vez se considera que las proteínas totales circulantes, y en particular la hemocianina, pueden ser utilizadas como reserva energética bajo situaciones de incremento en la demanda de energía provocado por la enfermedad, esto en apoyo a la respuesta del sistema inmune (Racotta y Palacios, 1998; Paul y Pirow, 1998; Destoumieux-Garzón et al., 2001; Adachi et al., 2001). También se puede considerar que la disminución de las proteínas en hemolinfa se debió a la hidrólisis de proteínas generando a los aminoácidos libres, los cuales influyen en el balance osmótico cuando el camarón se encuentra en ambientes hipo e hiperosmóticos (Dalla, 1986; Marangos et al., 1989).

Presión y capacidad osmótica

Los mecanismos que se activan cuando los crustáceos se encuentran sujetos a cambios de salinidad y temperatura son la captación o el intercambio de iones y agua, cambios en la permeabilidad de las membranas en branquias e intestino y el transporte de aminoácidos desde el músculo hacia la hemolinfa; estos ajustes en el comportamiento osmótico le permite a los crustáceos penetrar en distintos ambientes halinos (Rosas et al., 2003). La capacidad osmótica depende en gran medida de la actividad de la Na/K-ATPasa a nivel de la membrana celular, así como de la concentración de amonio, sales e iones en el medio externo (Rosas et al., 2007) siempre conservando la integración en su volumen y solutos celulares, que es uno de los problemas principales que sufren los crustáceos para obtener el balance intra y extracelular, el líquido intracelular y extracelular varían en la concentración de solutos orgánicos e inorgánicos (Panikkar, 1968), el medio extracelular tiene principalmente iones de sodio (Na⁺) y cloruro (Cl⁻), y el medio intracelular ofrece baja concentración de Na⁺ y una alta concentración de K⁺, fosfato y proteínas (Hurtado et al., 2007); sin embargo, la cantidad total de solutos isosmóticamente activos es básicamente la misma entre los dos compartimientos, como resultado de ello,

entre el medio intracelular y extracelular, es posible la existencia de diferencias osmóticas leves y transitorias (Latournerié, 2008). Cuando se presentan diferencias significativas entre ambos, se genera un flujo de agua osmótico a través de la membrana celular (Barba, 1999; Foster 2006). La relación fisiológica entre la salinidad del medio acuático y el metabolismo de los crustáceos es el punto en el cual la hemolinfa es isosmótica respecto con su medio ambiente, lo cual permite que no exista pérdida de energía a causa de la osmorregulación (Chen y Nan, 1995).

Se han registrado en trabajos realizados por Valdez et al., 2008 que la mayor demanda energética de juveniles de *L. vannamei* la detectaron en la salinidad de 32 g/l, en la que los organismos fueron hiposmóticos, y se obtuvieron valores intermedios en 20 g/l de organismos que fueron hiperosmóticos. De manera similar Rosas et al. (2001b) describieron en juveniles de esta especie que las mayores demandas energéticas para cubrir el metabolismo de rutina ocurrieron cuando fueron expuestos a condiciones de salinidad de 40 g/l. A su vez, en investigaciones posteriores, Rosas et al. (2002b) descubrieron que juveniles de *L. vannamei* obtuvieron un mayor consumo de energía a través del alimento ingerido en los organismos mantenidos en condiciones de 15 g/l, esto indicó que esta especie opera en su óptimo fisiológico en salinidades cercanas a su punto isosmótico, acumulando el máximo de energía para canalizarlo posteriormente. Se tiene registro en donde se demuestra que *L. vannamei* presenta su punto isosmótico en 24.7 a 26 g/l (Castille y Lawrence, 1981; Valdez et al. 2008); en nuestros experimentos, los juveniles sanos e infectados de *L. vannamei* presentaron una relación típica de muchos crustáceos eurihalinos ya que figuraron como hiporreguladores e hiperreguladores en salinidades por arriba y por abajo del punto isosmótico respectivamente (Mantel y Farmer, 1983). Los puntos isosmóticos registrados en juveniles infectados en el presente trabajo presentan un rango de 601 a 708 mmol/kg y 619 a 720 mmol/kg en juveniles sanos, estos valores se encuentran dentro del intervalo de puntos isosmóticos reportados para varias especies de crustáceos (Barba, 1999); al contrastar estos valores con los reportados por Re et al. (2004) con juveniles sanos de *L. stylirostris* en donde el intervalo fue de 676.8 a 700.7 mmol/kg, producto de tratamientos de la conjugación de salinidades (10 a 40 g/l) y temperaturas

(23,28 y 33°C) como resultado se detectó un comportamiento muy similar entre ambas especies dado que la capacidad osmorreguladora en ambos experimentos se mostró de la misma forma siendo hiporreguladores a salinidades por encima del punto isosmótico e hiperreguladores por debajo de su punto isosmótico. Por otra parte el comportamiento observado en nuestra investigación concuerda con los experimentos llevados a cabo por Ferraris et al. (1986) con organismos sanos de *P. monodon* en donde la osmolaridad de la hemolinfa tuvo una función lineal respecto a la osmolaridad del medio en un rango de salinidad de 8 a 40 g/l; el punto isosmótico detectado en los juveniles de 10 g fue en 698 mmol/kg y 752 mmol/kg en organismos de 30 g. Los organismos tuvieron un comportamiento hiperosmótico respecto al medio en valores debajo de la línea isosmótica y en valores por encima a ésta el comportamiento fue hiposmótico. Estos antecedentes con ambas especies de camarones comerciales muestran que la diferencia entre capacidad osmótica entre organismos sanos y en desafío no son muy dispersos, aún dadas las diferencias encontradas en la concentración osmótica en el 67% de los tratamientos. Las diferencias observadas con otros experimentos se pueden atribuir a las diferentes condiciones experimentales utilizadas en estos estudios ya que se conoce que diversos factores como la especie, el estadio de muda, la talla de los organismos y el estado nutricional presentan una influencia sobre la osmolaridad de la hemolinfa. Olivas (2008), reportó que la exposición de un crustáceo a fuentes de agua contaminada, estresores ambientales y agentes patógenos, promueven una disminución de la capacidad de osmorregulación, la cual depende en gran medida de la actividad de la Na/K-ATPasa, así como de la concentración de amonio, sales e iones en el medio externo (Latournerié, 2008). A su vez la melanosis y necrosis a nivel branquial que se observó en algunos juveniles infectados con el WSSV; pudo influir en el proceso de respiración y osmorregulación, de aquí las diferencias significativas en los tratamientos 20°C/35 g/l, 27°C/35 g/l, 33°C/15 g/l y 33°C/5 g/l; con este daño se pensó que la capacidad osmorreguladora se vería afectada, sin embargo, esto no ocurrió como en experimentos llevados a cabo por Wang y Chen (2006) con *P. monodon*, en donde se reveló que la respuesta inmune en diferentes ambientes salinos predispuso a los camarones hacia una baja en los mecanismos de defensa y debilitamiento general del estado fisiológico, estos

autores descubrieron que los camarones expuestos a 5 y 15 g/l presentaron una reducción en los mecanismos de defensa y disminuyeron su resistencia contra las infecciones bacterianas provocando mayor mortalidad. En nuestros experimentos los medios cuya salinidad fue de 5 y 15 g/l, los organismos sanos y experimentales hiperosmoconformaron; en particular el tratamiento 33°C/15 g/l, por estar cercano a su punto isosmótico entre 21 y 25 g/l, detectado, y a su temperatura preferida, aunado a que el virus restringe en su replicación por la hipertermia del agua (You et al., 2010), por lo anterior, se logró que el organismo sobreviviera a la etapa aguda de la enfermedad, el mismo caso sucedió en el tratamiento 27°C/15 g/l, sólo que el virus no se vió afectado en su replicación, sin embargo el organismo se mantuvo más tiempo gracias a lo cercano de sus condiciones favorables de temperatura y salinidad para su cultivo. En 33°C/5 g/l por encontrarse en condiciones hiposmóticas, le faltó energía para sobrevivir al desafío; el virus a consecuencia de la hipertermia se vió afectado en su replicación, pero el organismo no pudo sobrevivir por el gasto energético que significa la osmoregulación aunado al gasto para mantener la respuesta inmune. Por otra parte en tratamientos con 35 g/l, los juveniles presentaron un comportamiento hipo osmoconformador. En el caso del tratamiento 33°C/35 g/l, al igual que el 33°C/5 g/l, la mortalidad acumulada alcanzó a la totalidad de los organismos por gasto energético del metabolismo a consecuencia de los tratamientos; el mismo caso en aquellos en hipotermia que, aunado al estrés por la baja temperatura, y la energía canalizada en el sistema inmune consumió energía en hipoosmoconformar.

VIII. CONCLUSIONES

Según las hipótesis de trabajo formuladas al inicio se puede concluir que:

Hipótesis N°1 “Existe diferencia significativa en la concentración de metabolitos y capacidad osmótica detectada en hemolinfa de *L. vannamei* de organismos sanos y aquellos en desafío al virus de la mancha blanca (WSSV)”.

Esta hipótesis se acepta parcialmente dado que existieron diferencias significativas entre las concentraciones de metabolitos analizadas en hemolinfa de juveniles sanos y en desafío al virus de la mancha blanca, sin embargo no existieron diferencias significativas en la capacidad osmótica entre juveniles sanos y en desafío a la infección.

Hipótesis N° 2 “Existe una correlación positiva y significativa entre la sobrevivencia en ambientes hipertérmicos (33°C) y la concentración de copias virales en ambientes a baja salinidad (5 y 15 g/l)”.

Esta hipótesis se rechaza ya que existió una correlación negativa y no significativa en los tratamientos 33°C/15 g/l y 33°C/5 g/l entre la sobrevivencia y la concentración de copias virales detectadas.

Hipótesis N° 3 “Las condiciones de 33°C de temperatura y ambientes a baja salinidad (5 y 15 g/l) del medio acuático dificultan el desarrollo de la enfermedad provocada por el virus de la mancha blanca (WSSV) en juveniles de *L. vannamei*”.

Esta hipótesis se acepta parcialmente pues sólo el tratamiento cuya combinación de 33°C de temperatura y 15 g/l de salinidad fue en donde se registró una sobrevivencia del 65% de juveniles de *L. vannamei* al desafío del virus de la mancha blanca.

Además se concluye que la temperatura y la salinidad del medio acuático intervinieron en la concentración de metabolitos en hemolinfa de juveniles de *L. vannamei* sanos y en desafío al virus de la mancha blanca. A su vez la necesidad del organismo por mantener la homeostasis frente a las condiciones expuestas de temperatura y salinidad, aunado al desafío al virus de la mancha blanca le obligaron a utilizar toda la energía posible consumiéndose todas sus reservas y utilizando rutas alternas para solventar su déficit de energía. Se

detectó la mayor concentración de carga viral en hemolinfa de juveniles de *L. vananmei* en desafío al virus de la mancha blanca; en el tratamiento formado por 27°C y 5 g/l alcanzando una concentración de 2.5×10^6 copias de DNA viral/ μ l después de las 48 hpi. Los análisis histopatológicos realizados a los juveniles acondicionados a 33°C presentaron lesiones leves a moderadas sin la detección de cargas virales por PCR en hemolinfa; el daño ocasionado por la enfermedad se incrementa en mayor medida en los camarones acondicionados a 27°C.

IX. LITERATURA CITADA

Abbas, A.K., Litchman A.H. y Pober J.S. 1997. Cellular and molecular immunology. Third edition. W.B Saunders, New York, USA. 215 pp.

Adachi, K., Hirata T., Nagai, K. y Sakaguch M. 2001. Hemocyanin a most likely inducer of black spots in kuruma prawn *Penaeus japonicus* during storage. J. Food Sci. 66: 1130-1136.

Aguirre, G., y Valle F. 2000. Infectious disease in shrimp species with aquaculture potential. Recent Res. Devl. Microbiol. 4:333-348.

Anderson, R.K., Parker LP., Lawrence A. 1987. A $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ tracer study of the utilization of presented feed by a commercial important shrimp *Penaeus vannamei* in pond growout system. J. World Aquacult Soc. 18:148-155.

Angulo, J.A., Mejía A. y Engel R. 2005. Cultivo experimental de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* en el valle del Mezquital, Hidalgo, México. Panorama Acuícola. 10(2):10-15.

Arcos, F., Ibarra A.M., Palácios, E., Vazquez-Boucard, C. y Racotta I.S. 2003. Feasible predictive criteria for reproductive performance of white shrimp *Litopenaeus vannamei*: egg quality and female physiological condition. Aquaculture 228: 335-349.

Barba, M.E. 1999. El comportamiento osmorregulador de los crustáceos. Contactos. 34: 23-28.

Barracco, A., Perazzolo L.M y Rosa R.D. 2008. Inmunología del Camarón pp. 169-224. En: Morales V y J Cuéllar-Anjel (eds.). 2008. Guía Técnica- Patología e Inmunología de Camarones Penaeidos. Programa CYTED Red II-D Vannamei, Panamá, Rep. de Panamá. 270 pp.

Beckage, N.E. 1996. Interactions of viruses with invertebrate cells. In: Soderhall, K., Iwanaga S. y Vasta G.R. (Eds.), New Directions in Invertebrate Immunology. SOS Publication, New York, pp. 375–399.

Bell, T.A y Lightner D. 1988. A handbook of normal shrimp histology. Special publication no.1. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA.

Bergamini, E., Cavallini G., Donati A. y Gori Z. 2007. The role of autophagy in aging: its essential part in the anti-aging mechanism of caloric restriction. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1114: 69-78.

Blalock, J.E. 1994. The syntax of immune-neuroendocrine communication. *Immunol. Today*. 15, 504-511.

Bonami, J.R y Widada S.J. 2011. Viral diseases of the giant fresh water prawn *Macrobrachium rosenbergii*: A review. *J. Invert. Pathol*. 106: 131-142.

Bondad, M., McGladdery S. East I. y Subasinghe R. 2001. Asia Diagnostic Guide to Aquatic Animal Diseases. FAO Fisheries Technical Paper. 402(2) 237 pp.

Brozek, C.M y Ley R.D. 1991. Production of interleukin-1 in a South American opossum (*Monodelphis domestica*). *Dev. Comp. Immunol*. 15, 401-412.

Bustillo, M., Escobedo-Bonilla C. y Sotelo M.R. 2009. Revisión de patogénesis y estrategias moleculares contra el virus del síndrome de la mancha blanca en camarones peneidos. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*. 44:1-11.

Carbajal, I., Castro R. y Grijalva M. 2008. Experimental white spot syndrome virus challenge of juvenile *Litopenaeus vannamei* (Boone) at different salinities. *Aquaculture Research*. 39:1588-1596.

Castille, F. y Lawrence L. 1981. The effect of salinity on the osmotic, sodium and chloride concentrations in the hemolymph of euryhaline shrimp of the genus *Penaeus*. *Comp. Bio. Physiol. Part A*. 68:75-8.

Cerenius, L., Lee B.L y Söderhäll K. 2008. The proPO-system: pros and cons for its role in invertebrate immunity. *Trends in Immunology*. 29(6):263-271.

- Chang, P.S., Lo C.F., Wang Y.C y Kou G.H. 1996. Identification of white spot syndrome associated baculovirus (WSBV) in experimental infected wild shrimp, crabs and lobsters by in situ hybridation. *Diseases of Aquatic Organisms*, 27:131-139.
- Chou, H.Y, Huang C.Y, Wang Y.C Chiang H.C y Lo C.F. 1995. Pathogenicity of a baculovirus infection causing white spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Taiwan. *Diseases of Aquatic Organisms*, 23: 165-173.
- Chen, C. y Nan F. 1995. Oxygen consumption and ammonia-n excretion of *Penaeus chinensis* (Osbeck, 1765) juveniles at different salinity levels (Decapoda, Penaeidae). *Crustaceana*. 68: 712-719.
- Chou, H., Huang C. Lo C. y Kou G. 1998. Studies of transmission of white spot syndrome associated baculovirus (WSB) in *Penaeus monodon* and *Penaeus japonicus* via water-borne contact and oral ingestion. *Aquaculture*. 164: 263-276.
- Citarasu, T., Sivaram T. Grasian I. Rout N. y Murugan V. 2006. Influence of selected Indian immunostimulant herbs against white spot syndrome virus (WSSV) infection in black tiger shrimp, *Penaeus monodon* with reference to haematological, biochemical and immunological changes. *Fish & Shellfish Immunology*. 21: 372-384.
- Conover, W.J. 1980. *Practical nonparametric statistic* 2nded. John Wiley & Sons. New York. 495 pp.
- Côté, I., Navarro S. Tang K. Noble B. Lightner D. 2008. Taura syndrome virus from Venezuela is a new genetic variant. *Aquaculture* 284: 62-67.
- Cuéllar-Anjel, J. 2008. Métodos de diagnóstico de enfermedades en camarones marinos de cultivo pp. 1-52. En: Morales V y J Cuéllar-Anjel (eds.). *Guía Técnica-Patología e Inmunología de Camarones Penaeidos*. Programa CYTED Red II-D Vannamei, Panamá, Panamá. 270 pp.

Dalla, G.J.1986. Salinity responses of the juvenile penaeid shrimp *Penaeus japonicus*. II. Free amino acids. *Aquaculture* 55: 307-316.

De la Vega, E., Bernard M. Degnan M. Hall K. y Wilson J. 2007. Differential expression of immune-related genes and transposable elements in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) exposed to a range of environmental stressors. *Fish and Shellfish Immunology*. 23:1072-1088.

Destoumieux-Garzón, D., Saulnier D. Garnier J. Jouffrey C. Bulet P. y Bachère E. 2001. Crustacean Immunity: Antifungal peptides are generated from the C terminus of shrimp hemocyanin in response to microbial challenge. *J. Biol Chem*. 276(50):47070-47077.

Echeverría, F., Otero V. Cornejo F. y Rodríguez J. 2002. WSSV y ciclo de muda en el camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. *El mundo acuícola*. 8 (1): 43-46.

Endo, H., Takagi Y. Ozaki N. Kogure T. Watanabe T. 2004. A crustacean Ca^{2+} binding protein with a glutamate-rich sequence promotes $CaCO_3$ crystallization. *Biochem J*. 384: 159-167.

Esparza, H., Magallón F. Portillo G. Pérez R. Álvarez P. Escobedo C, Méndez J. Mañón N. Valerio R. Hernández J. Vibanco N. y Casillas R. 2010. Infection of WSSV-negative shrimp, *Litopenaeus vannamei*, cultivated under fluctuating temperature conditions. *J. World Aquacult. Soc.* 41(6):912-922.

Ferraris, R.P., Parado-Esteva F. Ladjá J. y De Jesus E.1986. Effect of salinity on osmotic, chloride, total protein and calcium concentrations in the hemolymph of the prawn *Penaeus monodon* (Fabricius). *Comp. Bio. Physiol.* Part A. 83:701-708.

Flegel, T.W y Pasharawipas T. 1998. Active viral accommodation: A new concept for crustacean response to viral pathogen en: Flegel, TW (Eds.). *Advances in Shrimp Biotechnology*. National Center for Genetic Engineering y Biotechnology. Bangkok. 245-250 pp.

Flores, M., Díaz F. Medina R. Re A.D. y Licea A. 2008. Physiological, metabolic and haematological responses in white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) juveniles fed diets supplemented with astaxanthin acclimated to low-salinity water. *Journal of fisheries International*. 3(3):75-82.

Foster, C. 2006. Crustaceos osmoconformadores possuem maior capacidade de regular o volume de suas células do que crustáceos osmorreguladores?. Tesis de maestría en Biología celular y molecular. Universidad Nacional de Paraná. Curitiba, Paraná. Brasil. 62 pp.

Gao, H., Kong J. Zhanjun L. Xiao G. y Meng X. 2011. Quantitative analysis of temperature, salinity and pH on WSSV proliferation in Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* by real-time PCR. *Aquaculture*. 312:26-31.

Godínez, D., Chávez M.C y Gómez S. 2011. Acuicultura epicontinental del camarón blanco del Pacífico, *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). *Trop. Subtrop. Agroecosyst*. 14: 55-62.

Gómez-Jiménez, S. 1998. Some physiological and immunological responses of the spiny lobster *Panulirus interruptus* (Randall, 1840), to practices used in its live marketing in the Baja California fishery. Thesis submitted for the degree of Doctor of Philosophy. University of Hull, UK. 111 pp.

González, S.R.A. 2010. Fisiología térmica y despliegue diferencial en adultos de *Litopenaeus vannamei* sometidos a estrés térmico. Tesis. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. Ensenada, Baja California, México. 68 pp.

Granja, C., Aranguren L. Vidal O. Aragón L. y Salazar M. 2003. Does hyperthermia increase apoptosis in white spot syndrome virus (WSSV)-infected *Litopenaeus vannamei*?. *Dis. Aquat. Org*. 54: 73-78.

Granja, C., Vidal O. Parra G. y Salazar M. 2006. Hyperthermia reduces viral load of white spot syndrome virus in *Penaeus vannamei*. Dis. Aquat. Org. 68: 175-180.

Guan, Y., Yu Z. y Li C. 2003. The effects of temperature on white spot syndrome infections in *Marsupenaeus japonicus*. J. Invert. Pathol. 83:257-260.

Hasson, K.W., Lightner D. Mohoney L. Redman R. Poulos B. y White B. 1999. Taura syndrome virus (TSV) lesion development and the disease cycle in the Pacific white shrimp *Penaeus vannamei*. Dis. Aquat. Org. 36:81-93.

He, N., Qin Q. y Xu X. 2005. Differential profile of genes expressed in hemocytes of white spot syndrome virus-resistant shrimp (*Penaeus japonicus*) by combining suppression subtractive hybridization and differential hybridization. Antiviral Research. 66:39-45.

Hernández, M., Bückle L.F. Palacios E. y Barón B. 2006. Preferential behavior of white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone,1931) by progressive temperature-salinity simultaneous interaction. Journal of Thermal Biology. 31(7): 565-572.

Hsieh, T., Wang J. Huc C. Li C. Kuo C. y Hsieh S. 2008. Effects of Rutin from *Toona sinensis* on the immune and physiological responses of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) under *Vibrio alginolyticus* challenge. Fish & Shellfish Immunology. 25: 581-588.

Hurtado, M.A., Racotta I. Civera R. Ibarra L. Hernández M. y Palacios E. 2007. Effect of hypersaline conditions on osmolality and Na/K-ATPase activity in juvenile shrimp *Litopenaeus vannamei* fed low-and high-HUFA diets. Comp Biochem Physiol. 147: 703-710.

Joseph, A. y Philip R. 2007. Acute salinity stress the hemolymph metabolic profile of *Penaeus monodon* and reduces immunocompetence to white spot syndrome virus infection. Aquaculture. 87-97.

Karunasagar, I., Otta S. y Karunasagar I. 1997. Histological and bacteriological study of white spot syndrome of *Penaeus monodon* along the west coast of India. *Aquaculture*. 153: 9-13.

Kasornchandra, J., Boonyaratpalin S. y Itami T, 1998. Detection of white spot syndrome in culture penaeid shrimp in Asia: microscopic observation and polymerase chain reaction. *Aquaculture* 164: 243-251.

Kou, G.H., Peng S.E. Chiu L. y Lo C. 1998. Tissue distribution of white spot syndrome virus (WSSV) in shrimp and crabs. *Advances in shrimp biotechnology*. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok.

Latournerié, J.R. 2008. Influencia del manejo sobre la regulación del medio interno y canalización de energía del camarón azul *Litopenaeus stylirostris* en sistemas de cultivo. *Rev. Electrón. Vet.* 9(8):1-17.

Lemos, D., Phan V.N. y Álvarez G. 2001. Growth, oxygen consumption, ammonia-N excretion, biochemical composition and energy content of *Farfantepenaeus paulensis* (Pérez-Farfante) (Crustacea, Decapoda, Penaeidae) early postlarvae in different salinities. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 261: 55-74.

Le Moullac, G. y Haffner P. 2000. Environmental factors affecting immune responses in crustacea. *Aquaculture* 191: 121-13.

Lightner, D.V.1996. A handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures for diseases of cultured penaeid shrimp. *J. World Aquacult Soc.* Baton Rouge, Louisiana, USA.

Lightner, D.V. 2003. The penaeid shrimp viral pandemics due to IHHNV, WSSV, STV and YHV: history in the Americas and current status. *Aquaculture and Pathobiology of Crustacean and Other Species*. Proceedings of the thirty-second UJNR Aquaculture Panel Symposium. Davis and Santa Barbara, California. U.S.A. November 17-20th.

Lightner, D.V. 2011. Virus diseases of farmed shrimp in the Western Hemisphere (the Americas): A review. *Journal of Invertebrate Pathology*. 106:110–130.

Lightner, D.V y Chen P. 2000. Enfermedad de la Mancha Blanca. <http://www.oie.int> 1-3 p.

Lightner, D.V y Pantoja C. 2001. Bioseguridad en el cultivo de camarones Métodos para mejorar la Camaronicultura en Centroamérica. Ed. UCA.

Lightner, D.V. 1988. Muscle necrosis of penaeid shrimp In: Sindermann C.J y Lightner D.V. (Eds.). *Disease diagnosis and control in North America marine aquaculture. Developments in Aquaculture and Fisheries Science*. Elsevier Press, New York, USA. 17: 122-124.

Lightner, D.V. 1993. Diseases of penaeid shrimp Pp. 393-486 En: McVey J (ed.) *CRC Handbook of mariculture*, 2nd edition, volume 1 Crustacean aquaculture CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.

Lignot, J.H., Charmantier G. y Trilles J.P. 1997. Effects of an organophosphorous insecticide, fenitrothion, on survival and osmoregulation of various developmental stages of the shrimp *Penaeus japonicus* (Crustacea, Decapoda). *Mar. Biol.* 128: 307-316.

Lignot, J.H, Cochard J.C. Soyez C. Lemaire P. y Charmantier G. 1999. Osmoregulatory capacity according to nutritional status, molt stage and body weight in *Penaeus stylirostris*. *Aquaculture*. 170:79-92.

Lignot, J.H., Spanings-Pierrot C. y Charmantier G. 2000. Osmoregulatory capacity as a tool in monitoring the physiological condition and the effect of stress in crustaceans. *Aquaculture*. 191: 209-245.

Maekawa, M. 1988. Lactate dehydrogenase isoenzymes. *Journal of Chromatography*. 429:373-398.

- Mantel, L. y Farmer L. 1983. The biology of crustacea. vol 5: Internal anatomy and physiological regulation. Academic press, New York. 53-151.
- Marangos, C., Brogren C.H, Alliot E. y Ceccaldi H.J. 1989. The influence of water salinity on the free amino acid concentration in muscle and hepatopancreas of adult shrimps, *Penaeus japonicus*. Biochem. Syst. Ecol. 17: 589-594.
- Mariscal L.M., Páez-Osuna F. Váldez J. Llamas R. Esquer J.L. y Padilla R. 2007. Cultivo de camarón blanco. Industria Acuícola. 4(1):8-9.
- Martínez, A. y López I. 2007. Alternativas orgánicas en el control de enfermedades en acuicultura. Panorama acuícola. 12(2): 48-53.
- Martínez-Córdova, L.R, Martínez M. y Cortés J.E. 2009. Camaronicultura Mexicana y mundial: ¿Actividad sustentable o industria contaminante? Rev. Int. Contam. Ambient. 25 (3):181-196.
- Mathews, C., van Hole, K. y Ahern K. 2002. Bioquímica. Pearson Educación. Madrid, España. 1368 pp.
- Mayo, M.A. 2002. Virus Taxonomy. Archives of virology. 147(5):1071-1076.
- Molina, A. 2009. Tasa de excreción de amonio total en el camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931), experimentalmente infectado con el virus de la mancha blanca (WSSV) a dos salinidades extremas. Tesis Profesional, Licenciado en Ecología Marina. Universidad Autónoma de Guerrero. 71 pp.
- Motesdeoca, M., Amano Y. Echeverría F. Betancourt I. Panchana F. Sotomayor M. y Rodríguez J.2002. La respuesta inmunitaria celular del camarón *Litopenaeus vannamei* al WSSV y su utilidad en el control de la enfermedad en los estanques. El mundo acuicola. 8(1):38-42.
- Mosera, J., Galván D. Mendoza F. Encinas T. Coronado D. Portillo G. Risoleta M. Magallón F. y Hernández J. 2011. Water temperature influences viral load and detection of white spot syndrome virus (WSSV) in

Litopenaeus vannamei and wild crustaceans. Submitted to Aquaculture, Manuscript Number: AQUA-D-11-01114.

Nikerson, K. y Van K. 1971. A comparison of molluscan and arthropod hemocyanin-I. circular dichroism and absorption spectra. Comp. Biochem. Physiol. Vol. 39B 855-872.

Nisticó, G. 1993. Communications among central nervous system, neuroendocrine and immune systems: interleukin-2. Prog. Neurobiol. 40. 463-75.

Ñonthe, R.C. 2006. Validación tecnológica del cultivo de camarón en agua dulce en la zona de Tomatlán, Jalisco. Industria Acuícola 2(5):11-12.

Ochoa, A. Santos A. y Unzueta M. 2006. Efecto del WSSV sobre camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) cultivado experimentalmente a bajas salinidades. Industria acuícola. 2(3):4-8.

Olivas, V.J y Cáceres J. 2003. Observaciones sanitarias de camarones cultivados en aguas de baja salinidad. Boletín Programa nacional de sanidad acuícola y la red de diagnóstico. 3(23):6-8.

Olivas, V.J. 2008. Evaluación de la carga parasitaria del camarón cultivado en Baja California y efecto del virus de la mancha blanca (WSSV) a diferentes salinidades. Tesis Doctorado en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. 127 pp.

Pan, L., Hu F. Jing F. y Liu H. 2008. The effect of different acclimation temperatures on the prophenoloxidase system and other defence parameters in *Litopenaeus vannamei*. Fish & Shellfish Immunol. 25:137-142.

Panikkar, N.K. 1968. Osmotic behaviour of shrimps and prawns in relation to their biology and culture. FAO Fisheries Report 57: 527-538.

Pantoja, C.R y Lightner D. 2003. Similarity between the histopathology of white spot syndrome virus y yellow head syndrome virus y its relevance to diagnosis of YHV disease in the Americas. *Aquaculture*. 218: 47–54.

Pascual, C., Sánchez A y Rosas C. 2003a. Manual de métodos para la evaluación de componentes sanguíneos de camarones peneidos. UNAM. CYTED. 26 pp.

Paul, R.J y Pirow R. 1998. The physiological significance of respiratory proteins in invertebrates. *Zoology*. 100: 319–327.

Peña, M.E. 2009. El cultivo de camarón y la calidad ambiental: ¿Cómo disminuir sus efectos nocivos en las costas de Nayarit? . *Revista Fuente* 1:13-17.

Ponce, E., Lago A. Castro A. y Muñoz M.E. 2005. Estudio de la expresión de genes de la familia peptídica MIH/GIH/CHH de *Litopenaeus vannamei* en diferentes condiciones de estrés. Memorias XI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Mérida, Yucatán. México.

Racotta, I.S y Palacios E. 1998. Hemolymph metabolic variables in response to experimental manipulation stress and serotonin injection in *Penaeus vannamei*. *J. World Aquacult. Soc.* 29:351– 356.

Rahman, M., Corteel M. Wille M. Alday-Sanz V. Pensaert M.B. Sorgeloos P. y Nauwynck H.J. 2007. The effect of raising water temperature to 33°C in *Penaeus vannamei* juveniles at different stages of infection with spot syndrome virus (WSSV). *Aquaculture*. 272:240-245.

Rahman, M., Escobedo-Bonilla C.E. Corteel M. Dantas-Lima J.J. Wille M. Alday-Sanz V. Pensaert M.B, Sorgeloos P. y Nauwynck H.J. 2006. Effect of high water temperature (33°C) on the clinical and virological outcome of experimental infections with white spot syndrome virus (WSSV) in specific pathogen-free (SPF) *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*. 261:842-849.

Rainer, J. y Brouwer M. 1993. Hemocyanin synthesis in the blue crab *Callinectes sapidus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 104B (1):69-73.

Rajan, P.R., Ramasamy P. Purushothaman V. y Brennan G.P. 2000. White spot baculovirus syndrome in the Indian shrimp *Penaeus monodon* y *Penaeus indicus*. *Aquaculture* 184: 31-44.

Ramos, C.S y Giffard M.I. 2009. Effects of viral infection (WSSV) in white shrimp *Litopenaeus vannamei* adapted to extreme salinities. *World Aquaculture Society, World Aquaculture 2009, Veracruz (México), 25-29 septiembre 2009.*

Ramos, R., Vinatea L. Santos J. y Da Costa R. 2010. Tratamiento de efluentes del cultivo de *Litopenaeus vannamei* mediante procesos de sedimentación, filtración y absorción. *Lat. Am. J. Aquat. Res.* 38(2): 188-200.

Randall, D., Burggren W. y French K. 1998. *Fisiología animal*. 4a ed. Mc Graw Hill-Interamericana. 795 pp.

Re, D., Díaz F. Sierra E. y Gómez-Jiménez S. 2004. Oxygen consumption, ammonium excretion and osmoregulatory capacity of *Litopenaeus stylirostris* (Stimpson) exposed to different combinations of temperature and salinity. *Ciencias Marinas*. 30:443-453.

Rendón, A., Rojas A. Ponce J. y García M. 2008. Análisis de la implementación del cultivo de tilapia y camarón en tanques de geomembrana en el sector rural del estado de Guerrero, México. *Memorias del XVI taller de cultivo de camarón Instituto Nacional de la Pesca SAGARPA.*

Reyes, A., Salazar M. y Granja C. 2007. Temperature modifies gene expression in subcuticular epithelial cells of white spot syndrome virus infected *Litopenaeus vannamei*. *Dev. Comp. Immunol.* 31:23-29.

Robertson, L., Bray W. Leung-Trujillo J. y Lawrence A. 1987. Practical molt staging of *Penaeus setiferus* and *Penaeus stylirostris*. J. World Aquacult. Soc. 18 (3): 180-185.

Robles-Sikisaka, R., Bohonak A.J. McClenaghan L.R y Dhar A.K. 2010. Genetic Signature of Rapid IHNV (Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus) Expansion in Wild *Penaeus* Shrimp Populations. PLoS ONE 5(7): 1-11.

Rodríguez, J., Cedeño R. Molina C. Otero V. Valenzuela V. Sotomayor M.A. 2000. Efecto de la calidad de la dieta sobre la respuesta inmune del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. In: Cruz-Suarez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M. Olvera-Novoa M. y Civera R. (Eds.), Vol. V. Mérida Yucatán, México, 57-71 pp.

Rodríguez, J., Bayot B. Amano Y. Panchana F. de Blas I. Alday V. y Calderón J. 2003. White spot syndrome virus infection in cultured *Penaeus vannamei* (Boone) in Ecuador with emphasis on histopathology and ultraestructure. J. Fish Dis. 26:439-450.

Rodríguez, J., Espinosa Y. Echeverría F. Cárdenas G. Román R. y Stern S. 2009. La exposición a probióticos y β -13/1,6-glucanos en larvicultura modifica la respuesta inmune de los juveniles de *Litopenaeus vannamei* y la sobrevivencia al virus de la mancha blanca en estanques. Panorama acuícola magazine 14(2):10-19.

Rodríguez, A.C. 2007. Caracterización del gen de lactato deshidrogenasa (LDH) y expresión de genes en branquias de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* bajo cambios agudos de oxígeno y salinidad. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Hermosillo Son. México. 72 pp.

Rosas, C., Cuzon G. Arena L. Arena L. Lemaire P. Soyey C. y Van Wormhoudt A. 2000. Influence of dietary carbohydrate on the metabolism of juvenile *Litopenaeus stylirostris*. J. Exp Mar Biol Ecol. 249:181-198.

Rosas, C., Cuzon G. Taboada G. Pascual C. Gaxiola G. y Van Wormhoudt A. 2001a. Effect of dietary protein and energy levels on growth, oxygen consumption, haemolymph and digestive gland carbohydrates, nitrogen excretion and osmotic pressure of *Litopenaeus vannamei* (Boone) and *L. setiferus* (Linne) juveniles (Crustacea, Decapoda; Penaeidae). *Aquaculture Research*. 32:531-547.

Rosas, C., Cuzon G. Gaxiola G. Le Priol Y. Pascual C. Rossignol J. Contreras F. Sánchez A. y Van Wormhoudt A. 2001b. Metabolism and growth of juveniles of *Litopenaeus vannamei*: effect of salinity and dietary carbohydrate levels. *J Exp. Mar. Biol. Ecol.* 259:1-22.

Rosas, C., Lopez N. Mercado P. y Martínez E. 2001c. Effect of salinity acclimation on oxygen consumption of white shrimp *Litopenaeus vannamei* Juveniles. *J Crust. Biol.* 21(4):279-292.

Rosas, C., Pascual C. López N. y Sánchez A. 2002a. Metabolitos como herramientas para evaluar el estado nutricional de camarones peneidos. In: Cruz-Suárez LE, Ricque-Marie D, Tapia-Salazar M, Gaxiola-Cortés M y Simoes N. (Eds.). *Avances en Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI. Simposium Internacional de Nutrición Acuícola.* Cancún, Quintana Roo, México.

Rosas, C., Cuzon G. Gaxiola G. Pascual C. Taboada G. Arena L y Van Wormhoudt A. 2002b. An energetic and conceptual model of the physiological role of dietary carbohydrates and salinity on *Litopenaeus vannamei* juveniles. *J Exp. Mar. Biol. Ecol.* 268: 47-67.

Rosas, C., Brito R. Sánchez A. y Gaxiola G. 2003. Apuntes para el curso Bioenergética de crustáceos decápodos con énfasis en camarones peneidos. I Jornadas Iberoamericanas de Nutrición en Acuicultura. *Avances de la Nutrición de Camarones Peneidos: Hacia la Optimización de Alimentos y Estrategias de Alimentación para una Camaronicultura Sustentable.* Centro de Formación de la Cooperación Española en Cartagena de Indias (Colombia). 432 pp.

Rosas, C., Cooper E. Pascual C. Brito R. Gelabert R. Moreno T. y Sánchez A. 2007. Physiological and immunological conditions of wild populations of *Farfantepenaeus duorarum* from the Campeche sound (Crustacean, Penaeidae). Mar. Biol. 152:929-938.

Ruan, Y., Kuo C. Lo C. Lee M. Lian J. y Hsieh S. 2010. Ferritin administration effectively enhances immunity, physiological responses, and survival of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Fish & Shellfish Immunology. 28: 542-548.

Sakamoto, T., Van Phung C. Cotera A. Duy K. Nguyen N. y Yokozawa M. 2009. Analysis of rapid expansion of inland aquaculture and triple rice-cropping areas in a coastal area of the Vietnamese mekong delta using MODIS time-series imagery. Landscape and Urban Planning. 92: 34-46.

Sánchez, A., Pascual C. Vargas-Albores F. Lemullac G. y Rosas C. 2001. Haemolymph metabolic variables y immune response in *Litopenaeus setiferus* adult males: the effect of acclimation. Aquaculture 198: 13-28.

Saoud, I., Davis D. y Rouse D. 2003. Suitability studies of inland well waters for *Litopenaeus vannamei* culture. Aquaculture. 217: 373-383.

Söderhäll, K. y Cerenius L. 1998. Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. Curr. Opin. Immunol 10: 23-28.

Solórzano L y Sharp J. 1980. Determination of total dissolved organic nitrogen. Limnology and Oceanography. 25: 751-754.

Sonnenholzner, S., Rodríguez J. Pérez F. Betancourt I. Echeverría F. y Calderón J. 2002. Supervivencia y respuesta immune de camarones juveniles *Litopenaeus vannamei* desafiados por vía oral a WSSV a diferentes temperatures. El Mundo Acuícola 8 (1): 50-56.

Sotelo, M.R., Islas M. De La Re E. Hernández J. Vargas-Albores F. Yépez G. 2003. cDNA cloning of the lysozyme of the white shrimp *Penaeus vannamei*. Fish and Shellfish Immunology 15:325-331.

Steel, R. y Torrie J.H. 1960. Principles and procedures of statistics. McGraw Hill Book Company, New York. 481 pp.

Sudha, P., Mohan C. Shankar K. Hegde A. 1998. Relationship between white spot syndrome virus infection and clinical manifestation in Indian cultured penaeid shrimp. *Aquaculture* 167: 95-101.

Suseela, M., Kesavan A. Anandan R. y Gopalan P. 2007. Biochemical studies on changes associated with enzymes of glucose metabolism in White spot syndrome virus (WSSV) infected with *Penaeus monodon* (Fabricius). *African Journal of Biotechnology*. 6(16):1944-1948.

Tabar, A.K. 2010. A review on white spot disease in penaeid shrimp farms with a brief study on its occurrence in shrimp aquaculture zones. Code of practice in Iran. Consultado en la red mundial 13 de diciembre 2011. http://www.rrmiddleeast.oie.int/Aquatic_training_Dubai_Sep_10/Day%202/Khatibi_%20White%20Spot%20Disease%20in%20penaeid_Iran.pdf.

Tan, L.T., Soon S. Lee K. Shariff M. Hassan M. y Omar A. 2001. Quantitative analysis of an experimental white spot syndrome virus (WSSV) infection in *Penaeus monodon* (Fabricius) using competitive polymerase chain. *Journal of Fish Diseases*. 24: 315-323.

Valdez, G., Díaz F. Re A.D y Sierra E. 2008. Efecto de la salinidad sobre la fisiología energética del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (Boone). *Hidrobiológica*.18 (2): 105-115.

Valenzuela, W., Rodríguez G. y Esparza H. 2010. Cultivo intensivo de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (Boone) en agua de pozo de baja salinidad como alternativa acuícola para zonas de alta marginación. *Ra Ximhai* 6(1):1-8.

Van Holde, K., Miller K. y Decker H. 2001. Hemocianins and invertebrate evolution. *J. Biol. Chem*. 276 (19): 15563-15566.

Vargas-Albores, F., Guzmán M.A y Ochoa J.L. 1993 An anticoagulant solution for haemolymph collection and prophenoloxidase studies of penaeid shrimp (*Penaeus californiensis*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 106A: 299-303.

Vernberg, F.J. 1983. Respiratory adaptations. *The Biology of Crustacea, environmental adaptations*, vol. 8. Academic Press, New York, 1-44 pp.

Vidal, O., Granja C. y Aranguren F. 2001. A profound effect of hyperthermia on survival of *Litopenaeus vannamei* juveniles infected with white spot syndrome virus. *J. World Aquacult Soc.* 32(4):364-372.

Wang, Y.G, Hassan M.D. Shariff M. Zamri S.M y Chen X. 1999. Histopathology y cytopathology of white spot syndrome virus (WSSV) in cultured *Penaeus monodon* from peninsular Malaysia with emphasis on pathogenesis and the mechanism of white spot formation. *Dis. Aquat. Org.* 39: 1-11.

Wang, B., Li F. Dong B. Zhang X. Zhang C. y Xiang J. 2006. Discovery of the genes in response to white spot syndrome virus (WSSV) infection in *Fenneropenaeus chilensis* through cDNA microarray. *Mar. Biotechnol.* 8:491-500.

Weber R.E y Spaargaren D.J.1970. On the influence of temperature on the osmoregulation of *Crangon crangon* and its significance under estuarine conditions. *Neth. J. Sea Res.* 5: 108-120.

Wongteerasupaya, C., Vickers J.E. Sriurairatana S. Nash G.L. Akarajamorn A. Boonsaeng S. Paniym A. Tassanakajon B. Withyachumnarnkul B. y Flegel T.W. 1995. A non-occluded, systemic baculovirus that occurs in cells of ectodermal y mesodermal origin and causes high mortality in the black tiger prawn *Penaeus monodon*. *Dis. Aquat. Org.* 21: 69-77.

Wu, J.L., Nishioka T. Mori T. Nishizawa K. y Kuroga K. 2002. A time-course study on the resistance of *Penaeus japonicus* induced by artificial infection with white spot syndrome virus. *Fish Shellfish Immunology.* 13:391-403.

Yoganandhan, K., Thirupathi S. y Hameed S. 2003a. Biochemical, physiological and hematological changes in white spot syndrome virus-infected shrimp *Penaeus indicus*. *Aquaculture*. 221:1-11.

Yoganandhan, K., Sathish S. Murugan V. Narayanan R.B y Hameed S. 2003b. Screening the organs for early detection of white spot syndrome virus in *Penaeus indicus* by histopathology and PCR techniques. *Aquaculture*. 215: 21-29.

You, X., Su Y. Mao Y. Liu M. Wang J. Zhang M. y Wu C. 2010. Effect of high water temperature on mortality, immune response and viral replication of WSSV-infected *Mersupenaeus japonicus* juveniles and adults. *Aquaculture*. 305:133-137.

Zar, J.H. 1984. *Biostatistical Analysis*. Prentice Hall, Inc. Englewood Cliffs. NJ, USA. 718 pp.

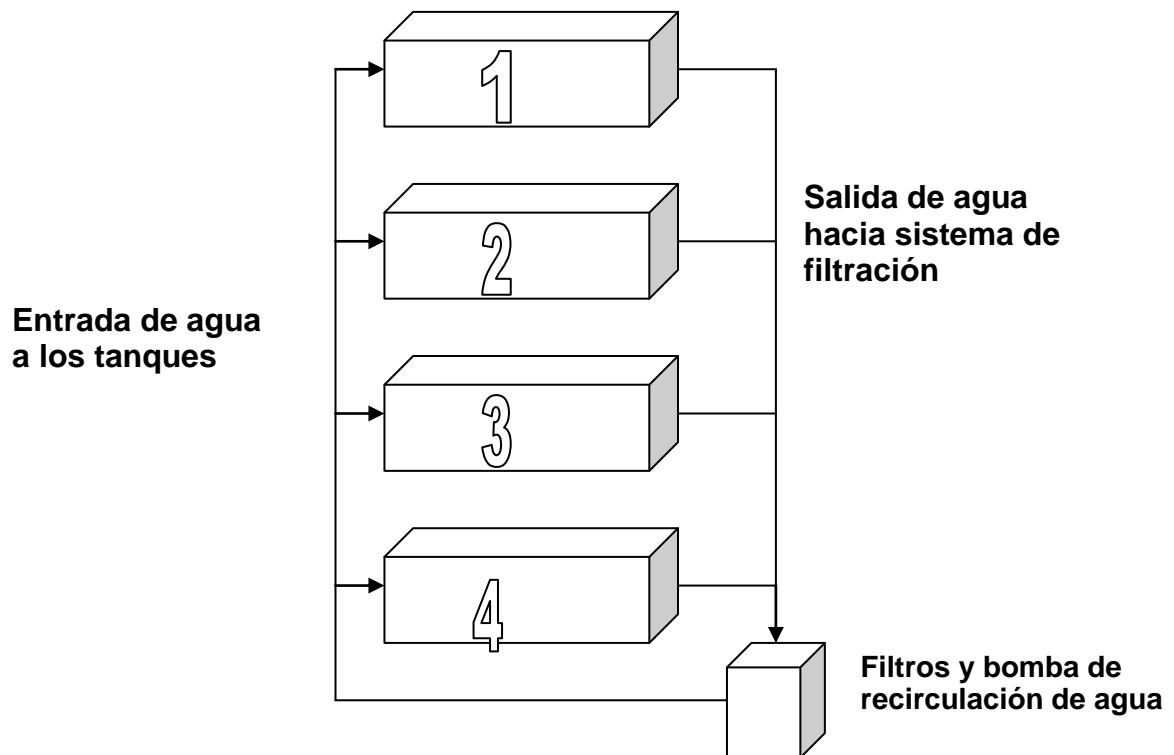
Zarain-Herzberg, M. 2003. Estrategias y acciones en materia de infraestructura y tecnología en acuicultura: El caso del cultivo del camarón. *Boletín Programa nacional de sanidad acuícola y red de diagnóstico*. 3(23):1-5.

Zhu, C., Dong S.L. y Wang F. 2006. The interaction of salinity and Na/K ratio in seawater on growth, nutrient retention and food conversion of juvenile *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Shellfish Research* 25: 107-112.

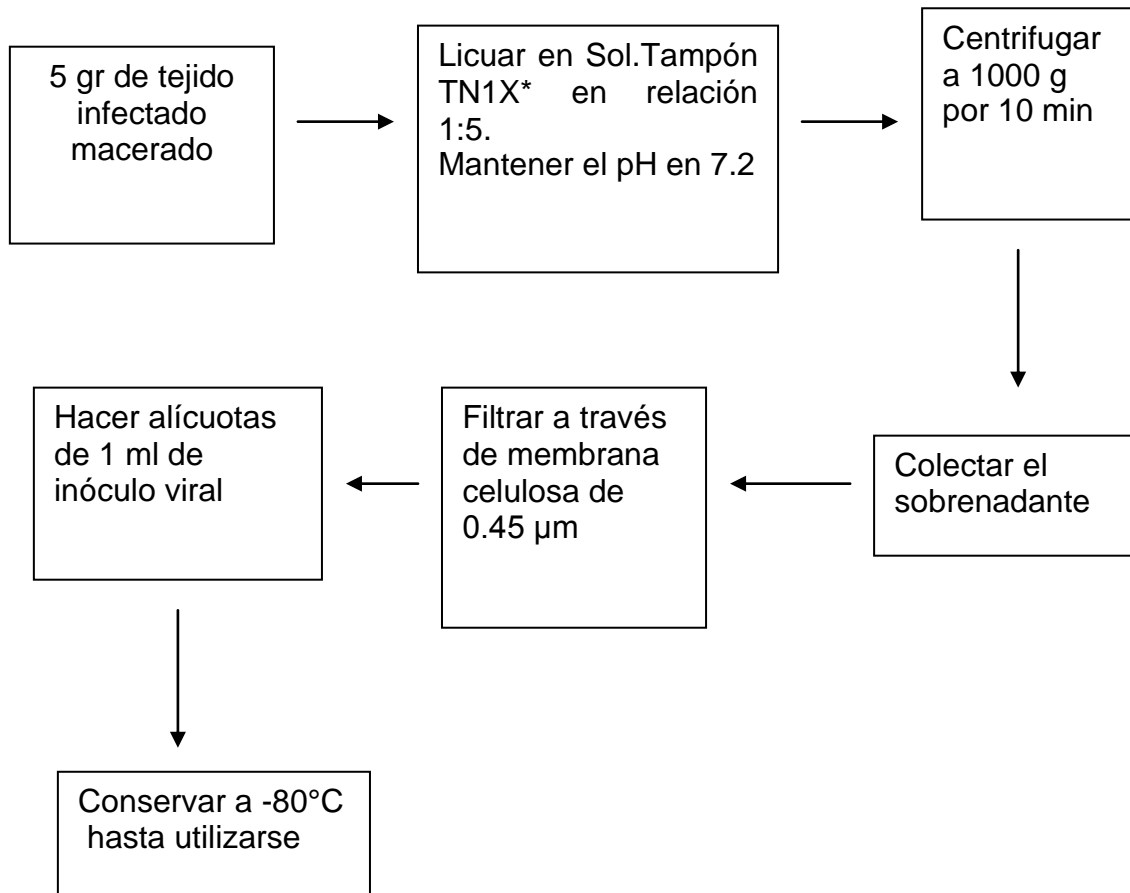
X. ANEXOS

Anexo 1. Diagrama del los módulos experimentales, sistema compuesto por 4 contenedors de fibra de vidrio, tres para la toma de muestras y una cuarta como tanque de sobrevivencia.

MODULO EXPERIMENTAL



Anexo 2. Preparación del inóculo viral (Chou et al., 1988).



*Sol. Tampón TN1X (0.4M de NaCl, 20 mM de Tris-HCl y pH 7.2).

Anexo 3. Preparación de anticoagulante de hemolinfa de camarón (SIC-EDTA) (Vargas-Albores et al., 1993).

Material (Todo el material posible debe estar estéril)

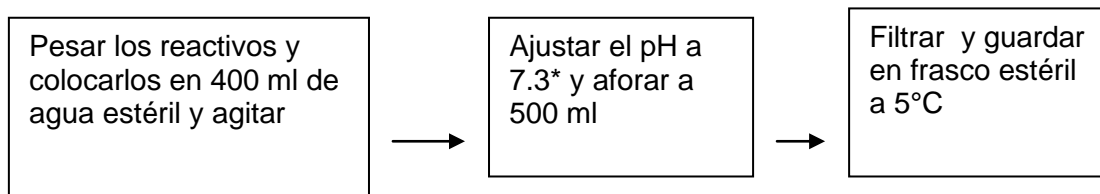
- Espátula
- Vaso de precipitado de 500 ml
- Matraz aforado de 500 ml
- 500 ml de agua destilada estéril
- Micropipeta de 1ml
- Puntas para micropipeta
- Barra magnética (mosca)
- Botella estéril de 500 ml
- Papel secante

Compuesto	Gramos para 500 ml
Cloruro de Sodio (NaCl)	13.145
Cloruro de Potasio (KCl)	0.37275
Hepes	1.1925
EDTA.Na ₂	1.861

Equipo

- Balanza analítica
- Potenciómetro
- Agitador magnético
- Bomba de vacío con filtro de 0.2 µm

Procedimiento



*Al ajustar el pH, si los valores son mayores a 7.3 debe adicionarse gota a gota HCl; si por el contrario, está por abajo, se adicionará, Hidroxido de Sodio 10 M (NaOH).

Anexo 4. Solución Davidson

Para un crear un litro de sol. Davidson se mezcla:

- 330 ml de alcohol etílico al 95%
- 220 ml de formaldehído al 37–40%.
- 115 ml de ácido acético glacial
- 335 ml de agua corriente

Nota: Se guarda el fijador en botellas de vidrio o de plástico a temperatura ambiente y con tapones seguros.

Anexo 5. Proceso histológico (Bell y Lightner, 1988)

a) Fijación del camarón

La fijación es una operación destinada a la conservación de los tejidos y su propósito es mantener los tejidos tratando de evitar la autólisis (Lightner, 1996).

Se utilizó solución Davidson para la fijación de los organismos como a continuación se describe:

- Se inyectó aprox.10 ml. de fijador (dependiendo del tamaño del camarón), en la región dorso lateral del hepatopáncreas, por ambos lados; a su vez en ambos lados de la región anterior, media y posterior del abdomen.
- Para una mejor penetración del fijador se realizaron cortes superficiales de cutícula, en región céfalo torácica, justo en la línea media dorsal, procurando no penetrar en los tejidos y en ambos lados de la región media lateral y transversales sin cortar completamente las porciones corporales en el primer y quinto segmento abdominal.
- El organismo se sumergió en un frasco de boca ancha con solución Davidson durante un periodo de 72 hrs dependiendo del tamaño del organismo. Para asegurar una correcta fijación se procuró guardar una proporción de 1:10, organismo: fijador.
- Después de las 72 h el camarón se transfirió a una solución al 70% de alcohol donde se almacenó hasta su procesado.

b) Seccionado de las muestras

- Antes de hacer los cortes se tomaron registros de las características físicas externas, datos como, lesiones externas, apariencia, color, presencia de manchas o deformidades.
- Posteriormente se realizó un corte transversal en la región media del primer segmento abdominal, separando así la porción céfalo-torácica de la abdominal.

- Se realizó corte longitudinal en la línea media ventral del cefalotórax separando el cefalotórax en dos porciones.
- Se tomó una porción y cortaron los apéndices (pereiópodos, maxilípedos antenas, etc.).
- Se realizó un corte transversal en la parte anterior del cefalotórax, a la altura de la base del pedúnculo ocular.
- Posteriormente una porción se introdujo dentro de la cápsula o cassette procurando no superar un grosor de 4 mm aprox para que la cápsula no la presionara demasiado.
- Se procuró incluir en las cápsulas los órganos o tejidos de mayor interés como son: órgano linfoide, corazón, estómago, hepatopáncreas, tejido hematopeyético, branquias y glándula antenal entre otros.
- La cápsula se marcó con la clave correspondiente a la muestra y estas se mantuvieron en alcohol etílico al 70% hasta el procesos de deshidratación.

c) Deshidratación de tejidos

La deshidratación tiene como función la eliminación del agua para que sea efectiva la inclusión en parafina.

El proceso consiste en llevar los tejidos a una concentración de alcohol etílico de una forma gradual comenzando con una concentración de alcohol al 70% hasta el 100% con un tiempo de inmersión de una hora en cada una de las soluciones alcohólicas, hasta una solución de xileno. Para el procesamiento se utilizó un procesador de tejidos (Marca Leica modelo TP1040).

d) Inclusión en parafina y formación de bloques

Una vez deshidratada la muestra, se sumerge en parafina líquida (56°C) durante dos horas, para después continuar con la elaboración de los bloques, procurando eliminar las burbujas, se recomienda que el tejido se coloque de una forma tal que la porción de la muestra de interés este orientada por el lado que se realizará el corte.

Los bloques ya formados se almacenan en un refrigerador a una temperatura de 5°C para facilitar su corte.

e) Corte en microtomo

- Los bloques fueron cortados con un microtomo (marca Leica mod. RM2235) a un grosor no mayor de 5µm.
- Los cortes se extendieron en un recipiente con agua a una temperatura de 45° C
- Se seleccionó de la tira de cortes extendidos el que reuniera las mejores características e incluyera los tejidos de interés y se montó sobre un portaobjetos el cual estaba previamente marcado con la clave correspondiente al tratamiento
- Se dejó secar el tejido durante 24 hrs. a temperatura ambiente
- Posteriormente las preparaciones histológicas quedaron listas para ser teñidas.

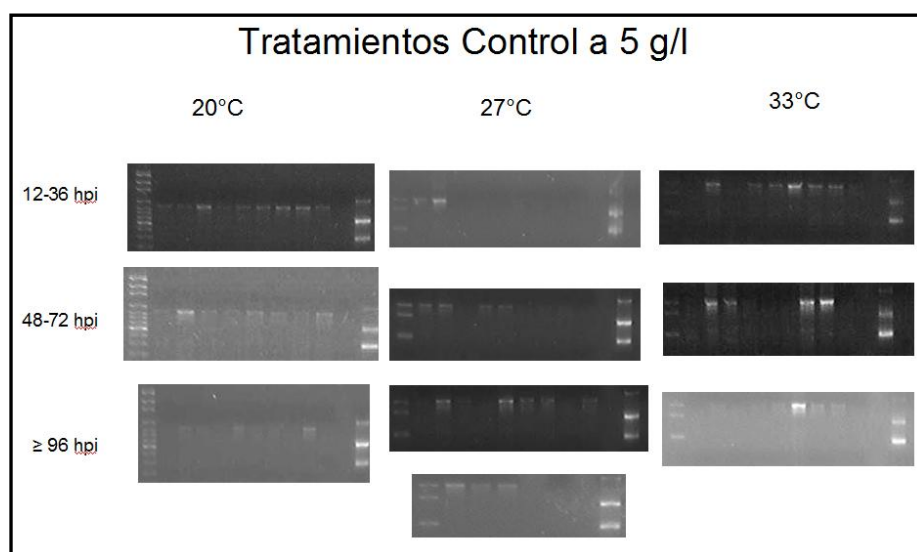
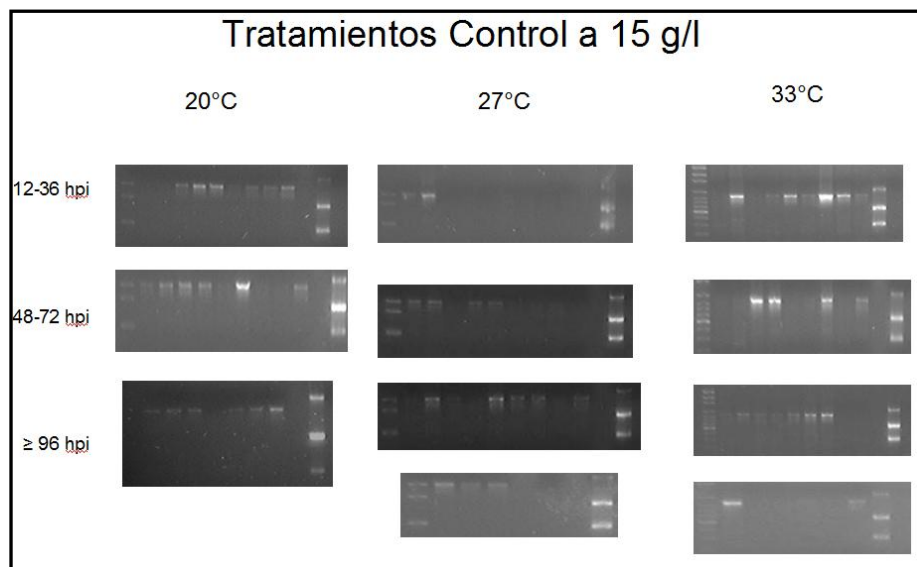
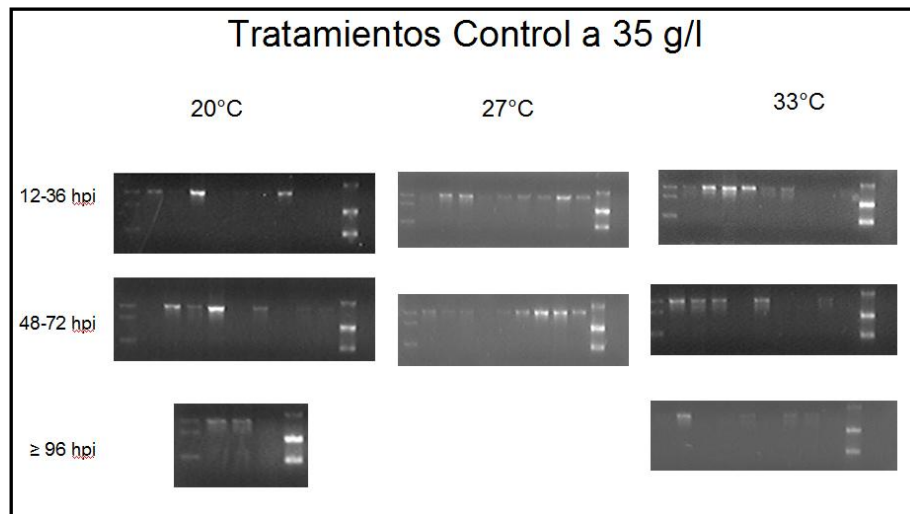
f) Tinción hematoxilina-eosina(H&E)

PROCESO DE TINCIÓN HEMATOXILINA-EOSINA		
CAJAS	REACTIVOS	TIEMPO (min)
1	Xileno I	5
2	Xileno II	5
3	Etanol:Xileno (1:1)	1
4	Alcohol 100%	1
5	Alcohol 100%	1
6	Alcohol 95%	1
7	Alcohol 95%	1
8	Agua corriente	10
9	Hematoxilina	1-8
10	Agua corriente	20
11	Alcohol ácido	10 sumergidas
12	Agua amoniacal	10 sumergidas
13	Agua corriente	20
14	Eosina	1-3
15	Alcohol 95%	2
16	Alcohol 95%	2
17	Alcohol 100%	3
18	Alcohol 100%	3
19	Etanol:Xileno (1:1)	1
20	Xileno I	2
21	Xileno II	2
22	Obtención de preparación permanente en resina	

Anexo 6. Escala de lesiones en *Litopenaeus vanamei* infectados experimentalmente con el virus de la mancha blanca (WSSV) (Modificado de Lightner, 1996).

Grado	Alteración
G0 No Infectado	Ninguna manifestación de la enfermedad
G1 Ligero	Cuando se manifiestan lesiones que abarcan un área menor o igual al 25% del tejido
G2 Moderado	Cuando se manifiestan lesiones que abarcan un área del 50% en el tejido
G3 Severo	Cuando se manifiestan lesiones que abarcan un área mayor o igual al 75% en el tejido

Anexo 7. Análisis de los productos de PCR punto final de muestras de hemolinfa de juveniles sanos de *L. vannamei* sujetos a los diversos tratamientos de prueba a diversos tiempos de iniciado el experimento.



Anexo 8. Análisis de los productos de PCR punto final de muestras de hemolinfa de juveniles de *L. vannamei* en desafío al WSSV sujetos a los diversos tratamientos de prueba a diversos tiempos post infección.

