

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

Recuperación, purificación y marcaje de una sonda para detectar el Parvovirus  
Hepatopancreático (HPV) y su aplicación mediante la técnica de dot-blot para  
determinar su presencia en camarones peneidos

Por

**Judith Haydeé González Benítez**

---

Tesis aprobada por la Unidad Mazatlán en  
Acuicultura y Manejo Ambiental

Como requisito parcial para obtener el grado de

**MAESTRÍA EN CIENCIAS**

Mazatlán, Sinaloa

Julio 2004.

## APROBACIÓN

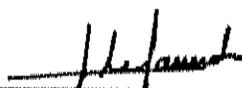
Los miembros del comité designado para revisar la tesis de Judith Haydeé González Benítez, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias con especialidad en Acuicultura.



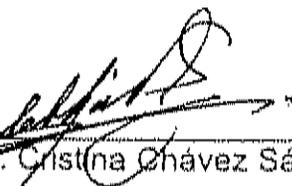
M.C. Leobardo Montoya Rodríguez.  
Director de Tesis.



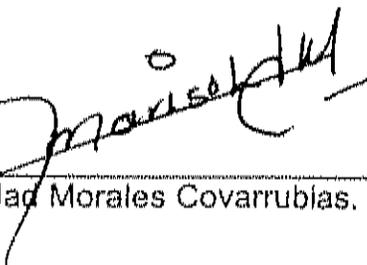
Dra. Ana Margarida Trigo de Sousa Roque.



Dra. Silvia Alejandra García Gasca.



Dra. Ma. Cristina Chávez Sánchez.



M.C. Ma. Soledad Morales Covarrubias.

## DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

Se permiten citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé el 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 aprobación escrita del director de tesis.

---

Dr. Alfonso Antero Gardea Béjar.  
Director General del CIAD, A. C.

DEDICATORIA

A mi hija Natalia...

...por ser la principal motivación  
para concluir este trabajo.

## AGRADECIMIENTOS

A CONACyT por el apoyo brindado para realizar mis estudios de postgrado.

Al C.I.A.D. por el apoyo económico otorgado para continuar el trabajo de tesis a pesar de haber excedido el tiempo normal para terminar el programa de estudios de postgrado.

A mis Padres por el apoyo moral y esmero en mi formación académica, pues ellos construyeron el primer peldaño que fue la base de lo que hasta ahora he logrado.

Al M.C. Jaime Renán por la digitalización de imágenes y elaboración de diagramas.

A mi comité de tesis integrado por: M.C. Leobardo Montoya, Dra. Ma. Cristina Chávez Sánchez, Dra. Alejandra García, Dra. Ana Roque y M.C. Ma. Soledad Morales.

Al Dr. Jean Robert Bonami del CNRS-IFREMER (Francia), por la donación de los clones bacterianos con las sonda para la detección del Virus Hepatopancreático (HPV), con la cual fue posible la realización de esta tesis.

A Maricultura del Pacífico; en especial al Ing. Cesareo Cabrera Villela, por su apoyo tanto moral como económico para concluir este trabajo de tesis.

A la Dra. Alejandra García por su invaluable amistad y el apoyo académico que permitió que este trabajo fuera mejor.

A la Dra. Ana Roque por ser parte de mi comité y brindar tan valioso apoyo para concluir esta tesis.

A Valery Williams por brindarme su amistad y ayudarme en la traducción del resumen.

Al Dr. Bruno Gómez-Gil, Coordinador del programa de postgrado del CIAD Unidad-Mazatlán.

Al M.C. Cesar Berlanga por la ayuda en la edición final del escrito.

Al personal del laboratorio de diagnóstico de Maricultura del Pacífico; Paty Prado, Fabián Hernández, Sergio Campos, Dominga Quiñónez y Janette Ibarra, porque gracias a su colaboración yo tuve el tiempo necesario para concluir esta tesis.

A mis compañeros de generación: Cesar, Miguel, Mike, Chela, Marrufo, Gaby y Ernesto.

Al Dr. Kennet Hasson y Dr. Carlos Pantoja por facilitarme apoyo bibliográfico.

Al M. C. Héctor Plascencia por la ayuda prestada en la documentación de algunas imágenes.

A mis amigos, que fue una de las cosas más valiosas que obtuve a lo largo de esta etapa de mi vida.

Dr. Arturo Ruiz Luna  
Dr. Bruno Gómez-Gil.  
Dr. Miguel Betancourt.  
Dra. Sonia Soto.  
M.C. Irma Martínez.  
M.C. Selene Abad.  
M.C. Cesar Berlanga.  
Dr. Neil Duncan  
Biol. Patricia Domínguez.  
Biol. Perla Estañón.  
M.C. Armando García.  
Hidrobiol. Ernesto Castro.  
M.C. Ana Rivas.

Al personal administrativo del CIAD- Mazatlán: C.P. Sonia Osuna, Lupita, Beni y Soquito.

A todas aquellas personas que de una u otra manera contribuyeron en la realización de esta tesis.

Este trabajo fue apoyado por los proyectos FOSIMAC (970106025) y CONACYT (25751-B)

## CONTENIDO

	PÁGINA
ÍNDICE DE TABLAS.	XII
ÍNDICE DE FIGURAS.	XIII
ÍNDICE DE CUADROS.	XVI
LISTA DE ABREVIATURAS.	XVII
RESUMEN	XIXI
ABSTRACT.	XXI
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	5
Objetivo General.	5
Objetivos Particulares.	5
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.	6
Enfermedades virales: una limitante en la camaronicultura.	6
Virus más conocidos que afectan a camarones de	
Importancia económica.	7
Virus de la Necrosis Hipodérmica y Hematopoyética	
Infecciosa (IHHNV).	9
Virus del Síndrome de Taura (TSV).	10

Virus de la Mancha Blanca (WSSV).	11
Enfermedad causada por el Parvovirus Hepatopancreático (HPV).	12
Características del HPV.	13
Signos de la enfermedad por HPV.	14
Origen y distribución del HPV.	14
Diagnóstico del HPV.	15
Características y función del hepatopáncreas:	17
Características generales.	17
Función general.	18
Características morfológicas.	20
Estructura y función de las células.	21
Técnicas Moleculares.	25
Sondas moleculares.	26
Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	27
Transcripción Reversa (RT-PCR).	27
Oligos sintéticos.	28
Clonación.	28
Enzimas de restricción.	28
Vectores plasmídicos.	29
Síntesis de sondas de ARN.	31
Transcripción <i>in vitro</i> .	31
Marcaje de Sondas.	31
Marcaje radioactivo.	32
Marcaje no radioactivo.	32
Biotina.	32
Digoxigenina.	33
Fluoresceína.	34

Técnicas de Marcaje.	34
"Random priming"	34
PCR.	35
"Nick translation".	35
Transcripción <i>in vitro</i> .	36
Marcaje en la terminación 5'.	36
Marcaje en la terminación 3'.	36
Métodos de Detección.	37
Autoradiografía.	37
Colorimetría.	37
Fluorescencia.	38
Quimioluminiscencia.	38
Aplicación de técnicas moleculares en el diagnóstico de enfermedades virales en camarón.	39
Dot-blot.	39
Hibridación <i>in situ</i> .	40
PCR.	41
Northern blot.	41
Southern blot.	42
Electroforesis de ácidos nucleicos.	42
Geles de poliacrilamida.	43
Geles de agarosa.	43
Replicación viral.	44
Parvovirus.	52

MATERIALES Y MÉTODOS.	54
Procedencia de los organismos.	54
Tratamiento de los organismos.	55
Histopatología.	56
Recuperación de la sonda del HPV a partir de plásmidos bacterianos.	58
Crecimiento de bacterias.	58
Extracción de plásmidos bacterianos.	59
Electroforesis.	60
Precipitación de ADN.	61
Digestión enzimática de plásmidos.	62
Electroforesis preparativa.	62
Extracción de fragmentos de HPV de un gel de agarosa.	63
Marcaje con digoxigenina.	64
Cuantificación de la sonda.	65
Prueba para corroborar el funcionamiento de la sonda.	67
Técnica de dot-blot para HPV.	68
Detección por colorimetría.	70
Detección por quimioluminiscencia.	70
RESULTADOS.	72
Recuperación del fragmento y elaboración de la sonda de HPV mediante extracción de plásmidos, digestión enzimático y marcaje con digoxigenina.	72
Recuperación de bacterias.	72
Extracción y verificación de plásmidos.	73
Digestión enzimática.	73

Purificación y recuperación del fragmento de HPV.	73
Marcaje y cuantificación de la sonda.	74
Aplicación de la sonda de HPV a poblaciones silvestres y cultivadas de camarón blanco y azul mediante la técnica de dot-blot.	79
Características macroscópicas de los organismos.	84
Análisis histopatológico.	88
DISCUSIÓN.	95
CONCLUSIÓN.	109
LITERATURA CITADA.	111
GLOSARIO.	120

## ÍNDICE DE TABLAS

	PÁGINA
Tabla 1.- Prevalencia de HPV detectada en camarones peneidos mediante dot-blot.	80
Tabla 2.- Características de los diferentes lotes de organismos analizados.	85
Tabla 3.- Alteraciones tisulares observadas en los lotes de camarón analizados.	89
Tabla 4.- Resumen de las patologías encontradas en los diferentes organismos analizados y prevalencias de HPV encontradas.	94

## ÍNDICE DE FIGURAS

	PÁGINA
Figura 1.- Diagrama de un túbulo del hepatopáncreas de <i>Penaeus semisulcatus</i> , donde se muestran las funciones de las células epiteliales en las diferentes fases del ciclo digestivo.	24
Figura 2.- Vector plasmídico PUC 19 donde se muestran las enzimas y los sitios de corte de cada fragmento del plásmido.	30
Figura 3.- Figura que muestra los ocho pasos involucrados en la replicación de un virus.	44
Figura 4.- Estrategias de replicación viral de acuerdo a la naturaleza del genoma en los siete grupos de virus conocidos.	51
Figura 5.- Resultado que muestra el producto de la extracción del plásmido con un peso molecular aproximadamente de 4200 pb, en un gel de agarosa al 1% con buffer TBE.	75
Figura 6.- Resultado de la digestión enzimática del plásmido con la enzima Acc1 en un gel de agarosa al 1% con buffer TBE.	76
Figura 7.- Electroforesis preparativa del producto de la digestión enzimática para separar el plásmido PUC19, del inserto AF1 de HPV. Gel de agarosa al 1% en buffer TBE.	77

- Figura 8.- Cuantificación del fragmento de HPV marcado (sonda) mediante la técnica de cuantificación de ácidos nucleicos en base a la cantidad de digoxigenina. 78
- Figura 9.- Resultado de dot blot para HPV del lote C (camarón blanco cultivado) empleando una técnica de detección colorimétrica. 81
- Figura 10.- Resultado de dot blot para HPV del lote D, (camarón azul cultivado) empleando una técnica de detección colorimétrica. 82
- Figura 11.- Prevalencia (%) de HPV en lotes de camarón cultivado. 83
- Figura 12.- Cefalotórax de un organismo donde se muestra el tamaño del hepatopáncreas disminuido con respecto a la cavidad del órgano (atrofia). 86
- Figura 13.- Cefalotórax de un organismo en donde se muestra un hepatopáncreas con apariencia normal. 86
- Figura 14.- Organismos de *L. vannamei* en donde se muestra la diferencia entre un camarón con características externas de enfermedad y un camarón con apariencia sana. 87
- Figura 15.- Hepatopáncreas de un organismos perteneciente al lote B donde se observa el tejido sin daño aparente (40X). 90
- Figura 16.- Hepatopáncreas de un organismo perteneciente al lote A donde se muestra autólisis debida a una mala fijación con solución de Davidson (40X). 90

- Figura 17.- Hepatopáncreas de un organismo perteneciente al lote A donde se muestra atrofia del epitelio de los túbulos hepatopancreáticos (1), desprendimiento de células picnóticas (2) e infiltración hemocítica (3). (60X). 91
- Figura 18.- Hepatopáncreas de un organismo perteneciente al lote A donde se muestra granuloma melanizado en un túbulo (1), con infiltración hemocítica (2) y necrosis (3). (40X). 91
- Figura 19.- Hepatopáncreas de un organismo perteneciente al lote C donde se muestra infiltración hemocítica y necrosis (1), así como desprendimiento celular (2). (40X). 92
- Figura 20.- Hepatopáncreas perteneciente a un organismo del lote C donde se muestra la formación de un nódulo hemocíticos en la periferia del túbulo (60X). 92
- Figura 21.- Hepatopáncreas de un organismo del lote C donde se muestra la formación de nódulos hemocíticos con melanización y autólisis (60X). 93
- Figura 22.- Hepatopáncreas de un organismo del lote D que muestra un núcleo hipertrofiado parecido a un cuerpo de inclusión de HPV. 93

ÍNDICE DE CUADROS

PAGINA.

Cuadro 1.- Protocolo de cuantificación de la sonda de HPV  
marcada con DIG-11-dUTP.

62

## LISTA DE ABREVIATURAS

<u>SIGLAS</u>	<u>SIGNIFICADO</u>
ADN	Ácido desoxirribonucleico.
ARN	Ácido ribonucleico.
mARN	Ácido Ribonucleico mensajero. Es el ácido nucleico encargado de llevar la información necesaria para la producción de una proteína en la célula.
CSPD	25 mM Disodio 3-(4-metoxispiro{1,2-dioxetano-3,2'-(5'-cloro) triciclo[3,3,1,1]decan}-4-il)fenil fosfato. Boehringer Mannheim cat. No. 16655884.
DIG-11-dUTP	Digoxigenina-11-desoxi-uracilo-trifosfato. Lábil en medio alcalino.
HPV	Hepatopancreatic Parvovirus. Parvovirus del Hepatopáncreas.
IHHNV	Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus. Virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética Infecciosa.
Kb	kilopares de bases
Kda	Kilodalton
LB caldo	Medio de Luria. 5 g NaCl, 5 g extracto de levadura, 10 g bacto triptona, aforado a 1 l. pH 7.5
M	Molar. Equivale a 1 mol de soluto en 1 litro de solución
mM	Millimolar. Equivale a $1 \times 10^{-3}$ Molar.
MBV	Monodon Baculovirus.

$\mu\text{g}$	Microgramo. Equivale a $1 \times 10^{-6}$ g
$\mu\text{L}$	Microlitro. Equivale a $1 \times 10^{-6}$ l.
$\mu\text{m}$	Micrómetro. Equivale a $1 \times 10^{-6}$ m.
N	Normal. Equivale a 1 gramo de soluto en 1 litro de solución
NBT	Sal azul de Tetrazolio en dimetilformamida. 75 mg/l nitroblue tetrazolium Salt.
ng	Nanogramo. Equivale a $1 \times 10^{-9}$ g
pb	Pares de bases de ADN.
pg	Picogramo. Equivale a $1 \times 10^{-12}$ g
PCR	Polymerase Chain Reaction. Reacción en cadena de la ADN polimerasa.
RT-PCR	Reverse-Transcriptase Polymerase-Chain Reaction Reacción en cadena de la polimerasa de ARN mediante la síntesis previa de un ADN complementario efectuada con la enzima transcriptasa reversa.
SDS	Lauryl sulfate
SPF	Specific Pathogen-Free. Organismos libres de patógenos específicos.
SPR	Specific Pathogen-Resistant. Organismos resistentes a patógenos específicos.
Tris-HCl	10 mM de tris-HCl, 1 ml de EDTA, pH=8.5.
TSV	Taura Syndrome Virus. Virus del Síndrome de Taura.
WSSV	White-Spot Síndrome Virus. Virus del Síndrome de la Mancha Blanca.
YHV	Yellow-Head Virus. Virus del Síndrome de la Cabeza Amarilla.

## RESUMEN

La camaronicultura ha tenido a nivel mundial, un repunte importante en las últimas dos décadas. En México esta actividad se ha desarrollado principalmente con camarón blanco *Litopenaeus vannamei* y camarón azul *Litopenaeus stylirostris*, siendo los estados de Sinaloa y Sonora los más importantes productores de camarón cultivado en el país. Para satisfacer la demanda de postlarvas de camarón se han abierto varios laboratorios de producción de nauplios y postlarvas. Sin embargo, en los últimos años la mayoría de estos laboratorios de producción de postlarvas han obtenido rendimientos por debajo de su capacidad, como resultado de una serie de factores entre los que destacan el impacto de las enfermedades infecciosas ocasionadas principalmente por virus y bacterias.

En el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. (CIAD) Unidad Mazatlán, se han implementando y estandarizando técnicas moleculares tales como hibridación en soporte sólido (dot-blot), hibridación *in situ* y reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para la detección de virus de ADN y ARN en camarón. Actualmente el CIAD se encuentra estudiando la problemática viral tanto en centros de producción acuícola así como en los centros de producción larval de camarón en los estados del noroeste de México.

El presente trabajo tuvo como objetivo la recuperación de un fragmento del Virus Hepatopancreático (HPV) para la obtención de una sonda no radioactiva. Esto se llevó a cabo mediante el análisis de clones bacterianos, su replicación, extracción de plásmidos y digestión enzimática para la obtención del inserto de ADN viral, así como el marcaje con digoxigenina. La aplicación de

la sonda se realizó mediante la técnica de hibridación en soporte sólido (dot-blot).

Este trabajo fue realizado en colaboración con la Universidad de Montpellier II, Francia; de donde fueron obtenidos los clones bacterianos con el fragmento del genoma viral de HPV.

La sonda fue aplicada a muestras de camarón, obteniendo resultados positivos en todos los lotes de camarón analizados con un variado porcentaje de prevalencias. Para la visualización de la hibridación, se probaron dos diferentes técnicas de detección: quimioluminiscencia y colorimetría, observándose una mayor sensibilidad en la detección quimioluminiscente. Los mismos lotes de organismos a los que se les aplicó la sonda, fueron también analizados mediante histopatología aplicando la tinción rutinaria de Hematoxilina Eosin-floxina (H & E) (Bell & Lightner, 1988). En la mayoría de los lotes se observaron daños a nivel celular, y en algunos casos coincidieron con altos porcentajes de organismos infectados, sin embargo, no se pudieron observar los característicos cuerpos de inclusión de HPV.

En este trabajo se concluye que la implementación de técnicas moleculares aplicadas al diagnóstico de enfermedades en camarón es un gran apoyo al desarrollo de la camaronicultura en México. La hibridación en soporte sólido es una buena herramienta para el diagnóstico del HPV en camarón. La histopatología aportó información importante del estado de salud de los organismos infectados con el virus, sin embargo no garantizó la observación de cuerpos de inclusión, aún en organismos detectados como positivos mediante la técnica de dot-blot.

## ABSTRACT

At world level, aquaculture has had an important upturn in the last two decades. In Mexico, this activity has been developed using the white shrimp *Litopenaeus vannamei* and the blue shrimp *Litopenaeus stylirostris*, with the states of Sinaloa and Sonora being the main producers of cultivated shrimp in the country. In order to satisfy the demand for shrimp postlarvae, various nauplii and postlarvae production laboratories have been opened. However, in the last few years, the majority of these laboratories have obtained below capacity yields owing to a series of factors, mainly due to the impact of infectious diseases caused by virus and bacteria.

In the Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD), Mazatlán Unit, standardised molecular techniques such as hybridisation in solid support (dot-blot), *in situ* hybridisation and the polymerase chain reaction (PCR) have been implemented in order to detect viral DNA and RNA from shrimp samples. Currently, CIAD is addressing the problematic of viral diseases from shrimp hatcheries and farms in the northwestern states of Mexico.

The objective of this work was to recover a fragment of the Hepatopancreatic Parvovirus (HPV) in order to obtain a no radioactive probe. A sample of the viral DNA was obtained by growing bacterial clones carrying the DNA, followed by plasmid extraction to obtain the viral DNA probe, and probe labelling with digoxigenin. The probe was applied by using the hybridisation in solid support (dot-blot) technique.

This work was carried out in collaboration with the University of Montpellier II, France; from where the bacterial clones with the HPV virus gene fragment were obtained.

After the probe was applied to the shrimp samples, all the batches obtained positive results and varied percentages of prevalence. For the visualization of hybridisation, two different detection techniques were tested: chemiluminescence and colorimetric, whereby higher sensibility was detected using chemiluminescence. The same organisms were also analysed using the histological stain Hematoxylin Eosin-floxin (H & E) (Bell & Lightner, 1988). Cell damage was observed in most of the batches and in some cases, this coincided with high percentages of organisms infected by HPV. Nevertheless, it was not possible to observe the characteristic inclusion bodies.

This work concludes that the implementation of molecular techniques applied to the diagnosis of shrimp diseases is invaluable to the development of aquaculture in Mexico and that hybridisation by dot-blot is a useful tool in diagnosing the HPV virus in shrimp. Histology provides important information on the health of organisms infected by virus, however it does not guarantee the detection of HPV in their inclusion bodies, but positive results have been observed using the dot-blot technique.

## INTRODUCCIÓN

El cultivo de organismos acuáticos ha venido creciendo en los últimos años hasta convertirse en una industria importante. La camaronicultura a nivel mundial ha tenido un repunte en los últimos 20 años, siendo durante gran parte de la década de los 90's, Tailandia, Indonesia, China y Taiwán los principales países productores de camarón, con camarón tigre *Penaeus monodon* como principal especie cultivada. A pesar del surgimiento de las enfermedades virales la industria de camarón cultivado ha continuado su expansión durante el 2000 y 2001, especialmente en Vietnam, Taiwán y China, así como en Venezuela y Brasil como principales productores de camarón durante el periodo de finales de los 90's y principios del 2000 (Rosenberry, 2001).

En México, esta actividad se ha realizado principalmente con camarón blanco <sup>1</sup>*Litopenaeus vannamei*, y camarón azul *Litopenaeus stylirostris*. El desarrollo camaronícola se ha concentrado en el litoral del Pacífico, principalmente en los estados del noroeste, con un total de 347 granjas camaroneras cubriendo una superficie aproximada de 26,462 Ha. La mayoría de estas granjas se encuentran en Sinaloa con un total de 215, Sonora con aproximadamente 53 y Nayarit donde se encuentran 79 granjas (SEMARNAP, 2000). El impulso que se ha dado en los últimos años a los proyectos de inversión en esta industria prevé un incremento considerable en el número de hectáreas destinadas a la camaronicultura que podría llegar a alcanzar un panorama muy favorable para el desarrollo de esta actividad al menos en Sinaloa y Sonora. Actualmente las granjas de estos estados demandan una cifra del orden de 5,094 millones de postlarvas, considerando como promedio

---

<sup>1</sup>*Litopenaeus*; Según Perez-Farfante & Kens Ley (1997).

dos ciclos anuales en Sinaloa, y un ciclo anual en Sonora. Para satisfacer esta demanda en México operan 44 laboratorios de producción de nauplios y postlarvas de camarón, que se concentran en estos dos estados, con una capacidad de producción de 1,051 millones de postlarvas por ciclo. Si se consideran 7 ciclos anuales de producción en promedio, se obtendría un volumen total de 7,357 millones de postlarvas al año, con lo cual teóricamente se podría satisfacer la demanda actual de las granjas camaronícolas. Sin embargo, en los últimos años la mayoría de estos laboratorios de producción de postlarvas han obtenido rendimientos muy por debajo de su capacidad instalada como resultado de una serie de factores, entre los que destacan el impacto de las enfermedades infecciosas ocasionadas principalmente por virus y bacterias (<sup>2</sup>Instituto Sinaloense de Acuacultura, 2001).

En general las enfermedades que afectan al camarón se agrupan principalmente en dos: infecciosas y no infecciosas. Las no infecciosas son aquellas enfermedades debidas a nutrición deficiente, ambientes adversos, defectos metabólicos, entre otras. Las enfermedades infecciosas son causadas por bacterias, virus, hongos y parásitos; y son la principal causa de mortalidad en especies cultivadas (Espinoza de los Monteros & Lubarta, 1988).

El surgimiento de las diferentes enfermedades que se han presentado en las especies marinas en cultivo, ha dado lugar al desarrollo de técnicas de diagnóstico necesarias para mantener buenos porcentajes de crecimiento y producción (Vega-Villasante & Puente, 1993). Entre éstas sobresalen las técnicas histológicas y las técnicas moleculares.

Actualmente se conocen varias enfermedades virales en camarones, las cuales fueron descubiertas por causar altas mortalidades en los diferentes

---

<sup>2</sup> Instituto Sinaloense de Acuacultura, Julio 25-2001. Periódico Noroeste.

sistemas de cultivo comercial. Los virus hasta ahora conocidos como potenciales patógenos de camarón se agrupan en siete familias: *Parvoviridae*, *Baculoviridae*, *Togaviridae*, *Iridoviridae*, *Picornaviridae*, *Reoviridae*, *Rhabdoviridae* y *Whispoviridae* o *Nimaviridae* (Lightner, 1993; van Hulten *et al.*, 2000, 2001). Las enfermedades que ocasionan pueden ser severas, y algunas llegan a causar la muerte.

El Parvovirus Hepatopancreático (HPV por sus siglas en inglés), fue reportado por primera vez por Lightner & Redman (1984), en postlarvas de *Penaeus chinensis* originarios de Qingdao, China, que afectaba a los camarones cultivados. Este virus fue llamado así por ser el hepatopáncreas su órgano blanco.

Actualmente HPV tiene una amplia distribución, ha sido reportado en camarones silvestres y cultivados en Asia, Africa, Australia así como en el continente Americano (Lightner *et al.*, 1998). Las especies de camarón que se han registrado como susceptibles de ser infectadas por este virus son *Penaeus merguensis*, *P. orientalis*, *P. semisulcatus*, *P. esculentus*, *P. monodon*, *P. japonicus*, *P. penicillatus*, *P. indicus*, *L. vannamei* y *L. stylirostris* (Bonami *et al.*, 1995). En 1990 se detectó en cultivos de postlarva silvestre de camarón blanco y camarón azul, en la costa occidental de México, y también se ha detectado en adultos silvestres de *Litopenaeus vannamei* capturados frente a las costas de El Salvador (Lightner, 1996).

El diagnóstico de HPV se ha llevado a cabo con la observación de cuerpos de inclusión viral en células afectadas, mediante la aplicación de técnicas histológicas (Lightner *et al.*, 1993). También se han desarrollado técnicas moleculares para la elaboración de sondas moleculares aplicadas a la investigación (Marí, *et al.*, 1995), así como para la realización de diagnósticos

confirmativos de la presencia de HPV. No se han detectado signos externos específicos de la infección por HPV (Lightner & Redman, 1998; Lightner *et al.*, 1993).

Debido a la importancia económica que en los últimos años representa la actividad camaronícola y a la aparición de enfermedades exóticas, ha surgido la necesidad de implementar estrategias para el control de las enfermedades virales de camarón. Éstas deben estar basadas en la identificación rápida y confiable del agente causal que permita instaurar métodos profilácticos adecuados. Existen técnicas como la histología, que aún cuando es de gran importancia por la descripción de los daños ocasionados en tejidos y órganos, no garantizan la detección del virus en organismos portadores con bajo grado de infección, o de aquellos virus que no forman cuerpos de inclusión u oclusión en células hospederas.

Las técnicas moleculares son una herramienta muy útil para el diagnóstico de la presencia de uno o más virus en camarón, permite además la identificación rápida y específica del virus antes del desarrollo de la enfermedad. Dentro de estas técnicas se encuentran las técnicas de hibridación, las cuales requieren del diseño de sondas moleculares específicas de ADN o ARN del virus que se intenta detectar. Estas sondas moleculares son fragmentos de ADN o ARN marcados que tienen la capacidad de unirse de manera específica a una secuencia complementaria permitiendo así su detección.

Este trabajo tiene como finalidad contribuir al conocimiento de la dispersión de HPV en camarón silvestre y cultivado en la región noroeste de México. Así mismo, la evaluación de herramientas altamente sensibles como son las sondas moleculares para su uso en el diagnóstico. Estas herramientas

pueden en su momento ser aplicadas como técnicas de rutina para detectar enfermedades virales exóticas, así como implementar programas de vigilancia para evitar la entrada de agentes patógenos a nuestro país.

## OBJETIVOS

### Objetivo General

Recuperación, purificación y marcaje de una sonda no radioactiva y su aplicación mediante la técnica molecular de dot blot, para la detección de HPV en camarones peneidos.

### **Objetivos particulares.**

- Recuperación de clones mediante la revisión de cepas bacterianas de *E. coli* DH 5  $\alpha$ , previamente transformadas, en la búsqueda de un fragmento de ADN de 1.8 kilopares de bases correspondiente a la sonda de HPV.
- Obtener el fragmento de ADN para la elaboración de la sonda de HPV mediante la extracción de plásmidos bacterianos, digestión enzimática y marcaje no radioactivo.
- Aplicación de la sonda mediante la técnica de dot-blot, para la detección de HPV en el Laboratorio de Virología del CIAD-Mazatlán.
- Determinar la presencia de HPV en organismos silvestres y cultivados de camarones *L. vannamei* y *L. stylirostris*, mediante la aplicación de la técnica de Dot-Bot.
- Determinar mediante la técnica histológica, algunas patologías que pudiesen coincidir con organismos portadores de HPV.

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### Enfermedades virales: una limitante en la camaronicultura.

Las enfermedades virales han impactado severamente muchas de las industrias de cultivo de camarones peneidos en el mundo, causando importantes pérdidas en la producción y en consecuencia pérdidas económicas. Los virus que se han reportado como importantes patógenos de camarones cultivados en regiones de Asia y el Indo-Pacífico son: WSSV, MBV, HPV, IHHNV, y YHV, mientras que en América son TSV, IHHNV, BP y WSSV.

Numerosas estrategias han sido utilizadas para tratar de controlar las enfermedades virales en camarones cultivados. Estas estrategias van desde el uso de mejores prácticas de manejo hasta la siembra de especies o líneas "libres de patógenos específicos" (SPF) o "resistentes a patógenos específicos" (SPR). Un ejemplo de estos fueron dos grandes compañías que usaron líneas SPR de camarón. Aquanova desarrolló una línea de *L. stylirostris* resistente al IHHNV. Los métodos para desarrollar esta línea se manejaron con mucha discreción, solo se sabe que es una línea mejorada llamada SPR43, por haberse logrado en la 43ava generación de los camarones. Esta fue desarrollada por franceses en Nueva Caledonia, e introducida a México en 1995 (Lightner, 1995). Otra línea SPR de *L. stylirostris* fue introducida por "SuperShrimp", desarrollada en Venezuela y considerada como resistente a TSV y a IHHNV. Tanto la cepa de SPR43 así como la de SuperShrimp tuvieron gran aceptación y mucha demanda durante un período aproximado de cuatro años. Sin embargo, en 1999 surgió en Sinaloa la primer granja camaronícola acusada de tener WSSV, en un lote de postlarvas compradas a "SuperShrimp",

lo cual causó un gran impacto en el sector camaronícola y disminuyó el prestigio de dicha empresa.

En el continente Americano se han hecho numerosos esfuerzos para reducir las pérdidas causadas por brotes de virus endémicos (IHHNV, BP, TSV) (Lightner *et al.*, 1993). Prácticas mejoradas de cultivo han sido usadas con éxito para controlar algunas enfermedades de etiología viral. Estas estrategias de control han consistido principalmente en la disminución de densidades de siembra, mejoramiento de la calidad de agua de los estanques, utilización de algunos inmunoestimulantes, así como la prevención por exclusión de algunos organismos que pudieran ser vectores de enfermedades para el camarón. El éxito de estas estrategias depende de la disponibilidad de herramientas de diagnóstico altamente sensibles y específicas para la detección de estos virus o patógenos antes de la introducción de un lote infectado a los diferentes sistemas de cultivo.

#### Virus más conocidos que afectan a camarones de importancia económica en México.

Los virus que han causado altas mortalidades en México son, el parvovirus de IHHNV y el picornavirus de TSV, de los cuales el primero fue descubierto por Lightner (Lightner *et al.*, 1983) y el segundo por Bonami (Bonami *et al.*, 1997). El WSSV también ha causado grandes estragos en la camaronicultura mundial. Estos virus fueron accidentalmente introducidos en México y de la misma manera, el riesgo de introducir nuevos agentes patógenos a las zonas de cultivo está siempre latente debido al aprovisionamiento de postlarvas y reproductores de poblaciones silvestres de camarón, así como a la importación de organismos a México sin ninguna medida de control.

## IHHNV

Las infecciones por IHHNV en cultivos semi-intensivos e intensivos de *P. stylirostris* fueron muy serias, ocasionando grandes mortalidades (Lightner *et al.*, 1983). El IHHNV, ha sido asociado al "Síndrome de deformidad del rostro" y "enanismo" en organismos de *L. vannamei*. Los camarones afectados se caracterizan por presentar bajas tasas de crecimiento, así como deformaciones que afectan principalmente al rostro, a esto se le conoce como "rostro torcido" (Kalagayan *et al.*, 1991). Las poblaciones afectadas pueden tener hasta 30% de camarones enanos y por consiguiente una amplia variabilidad de tallas (Kalagayan *et al.*, 1991). Actualmente se encuentra distribuido a nivel mundial, aunque no se sabe con certeza su lugar de origen. Su presencia en el Sureste de Asia (Singapur, Malasia, Indonesia y Filipinas), en donde sólo han utilizado reproductores silvestres de *P. monodon*, hace suponer que esta región se encuentra dentro del espacio geográfico de origen y que *P. monodon* podría ser un huésped natural (Lightner, 1990; Poulos *et al.*, 1994).

En México los datos existentes sobre el Golfo de California apoyan el argumento de que IHHNV no se encontraba presente en esta región antes de 1987. Posteriormente la enfermedad se extendió a las áreas camaronicultoras de la región. Se cree que la introducción del virus pudo haber ocurrido con el arribo de envíos comerciales de larvas y postlarvas de *L. stylirostris* procedentes de los Estados Unidos (Lightner *et al.*, 1992).

Las principales especies de camarón cultivadas en México son el *L. vannamei* y *L. stylirostris*. La alternancia entre ambas especies ha dependido en gran medida de la aparición de las diferentes enfermedades virales que se han presentado en los últimos años. Antes de que el IHHNV fuera accidentalmente introducido a México, el cultivo predominante de camarón era el de camarón azul (*L. stylirostris*), una vez que apareció este virus en México, la industria tuvo

que renunciar a algunas ventajas que significaba trabajar con esta especie (el rápido crecimiento y la gran talla que se puede obtener en organismos de cultivo); debido a que era altamente susceptible a dicha infección. A pesar de que el camarón azul ofrecía un mejor mercado extranjero, el virus obligó a los productores a cambiar de especie cultivada, convirtiéndose así el camarón blanco en la especie predominantemente cultivada en México.

### TSV

El Síndrome de Taura, se detectó por primera vez en granjas cercanas a la boca del Río Taura cerca de Guayaquil, Ecuador y fue considerada en un principio como una enfermedad ocasionada por agroquímicos utilizados en el control de plagas del plátano (Lightner, 1995). Mas tarde se descubrió su etiología viral (Hasson *et al.*, 1995; Bonami *et al.*, 1997). En México, el virus de Taura fue detectado a mediados de 1995 en reproductores silvestres de *L. vannamei* capturados en las costas de Chiapas (Lightner, 1996).

En el transcurso de 1995, la introducción y dispersión del virus de Síndrome de Taura, altamente patógeno para *L. vannamei*, causó mortalidades severas en varias granjas de los estados de Sinaloa, Sonora y Nayarit (Lightner, 1995; Pantoja, 1996;).

El TSV es una enfermedad de la fase de precría que ocurre entre los 14 y 40 días de la siembra, los camarones con TSV son por lo regular juveniles de 0.05 g a 5.0 g. En esta enfermedad se presentan tres fases: la aguda, la de transición y la crónica o de recuperación (Hasson *et al.*, 1998), donde la primera es la más importante por presentar altas mortalidades acompañadas de coloración rojiza, expansión de cromatóforos, cutícula suave, Intestino vacío,

opacidad muscular, letargia y necrosis multifocal en la cutícula. Las fases tanto de transición como de recuperación, es donde la enfermedad se vuelve crónica y el riesgo de mortalidad disminuye (Lightner, 1996).

## WSSV

La enfermedad viral del síndrome de la "mancha blanca" (WSSV) fue detectada por primera vez en México en 1999. Este virus originalmente se clasificó como perteneciente a la familia de los Baculovirus, posteriores estudios demostraron que no pertenecía a esta familia, por lo cual se consideró por algún tiempo como un virus no clasificado del cual se tenían antecedentes por causar mortalidades masivas de camarones peneidos en países del continente asiático (Lightner, 1996) y recientemente en el continente americano, en países como Ecuador, Panamá, Honduras y México. En el año 2000 este virus fue reclasificado mediante caracterización molecular, dentro de una nueva familia llamada *Whispoviridae* o *Nimaviridae* (van Hulten *et al.*, 2000, 2001) El virus WSSV fue detectado por primera vez en 1993, en camarones cultivados de Taiwán, desde entonces se esparció rápidamente afectando camarones cultivados y causando pérdidas económicas a los productores (Chou *et al.*, 1995; Lightner, 1996).

Los signos clínicos principalmente reportados en la infección por WSSV son, manchas blancas en el exoesqueleto y la epidermis del camarón, una coloración rosada o rojo-café del músculo, letargia, anorexia y porcentajes muy altos de mortalidad. Este virus es altamente patógeno y tiene una amplia variedad de hospederos (Supamattaya *et al.*, 1998; Mohan *et al.*, 1998).

Además del IHHNV, el TSV y el WSSV, hay otros virus que ya están presentes en México, pero que todavía no se han estudiado a fondo. Tal es el caso del Virus Hepatopancreático (HPV), que al igual que el IHHNV, pertenece a la familia de los Parvovirus.

#### Enfermedad causada por el Parvovirus del Hepatopáncreas (HPV).

El virus de HPV ha sido reconocido como un posible miembro de la familia *Parvoviridae* (Lightner & Redman, 1985). Es un virus de cadena sencilla de ADN por lo cual está asociado con una fuerte reacción Fulgen positivo, su localización y replicación nuclear involucra la formación de una cadena (-) la cual es utilizada como molde para la síntesis de ADN viral. Es el segundo parvovirus que ataca a camarones peneidos, además de IHHNV. Estos dos virus aunque pertenecen a la misma familia, infectan diferentes órganos blanco; células epiteliales del hepatopáncreas, en el caso de HPV y tejido hipodérmico y hematopoyético para el caso de IHHNV (Lightner y Redman, 1991; Lightner *et al.*, 1993). Se ha reportado otro virus de ADN que se considera también perteneciente a los parvovirus y que también infecta a camarones; el Parvovirus linfoidal (LPV) (Owens, *et al.*, 1991), pero éste no ha tenido una detallada caracterización (Bonami *et al.*, 1990; Bonami *et al.*, 1995).

#### Características de HPV.

El virus HPV consiste en una partícula viral de 22 – 24 nm de diámetro que forma cuerpos de inclusión nuclear en las células de los túbulos del hepatopáncreas (Bonami *et al.*, 1995). Mediante procesamiento histológico se puede observar que estos cuerpos están localizados centralmente en el

carioplasma, por lo regular se encuentran uno o más nucleolos comprimidos entre la membrana nuclear y el cuerpo de inclusión desarrollado (Lightner y Redman, 1985). Los cuerpos de inclusión de HPV, presentan un color de lila claro a morado oscuro con la tinción rutinaria de Hematoxilina - Eosina (H & E), la membrana nuclear de la célula permanece intacta y con cromatina marginal. Estas inclusiones están compuestas por material proteico (Lester *et al.*, 1987), son eosinófilas y amorfas, la parte densa de la inclusión es basofílica y puede estar ocupando la mayor parte del carioplasma; ocasionando un núcleo hipertrofiado. Se ha demostrado mediante electroforesis con geles de poliacrilamida que dentro del genoma viral de HPV, existe un polipéptido con un tamaño de 54 Kda (Bonami *et al.*, 1995), lo cual es inusual en la familia *Parvoviridae*. Los núcleos densos e hipertrofiados que produce son muy parecidos a los producidos por Densovirus (Lightner & Redman, 1984), esto hace suponer que HPV podría ser parte de este grupo de parvovirus de insectos llamados Densovirus (Bonami *et al.*, 1995).

Mediante microscopía electrónica, se ha observado que la partícula viral de HPV tiene por lo regular seis lados, por lo cual se le considera de forma icosaédrica. Su densidad se ha estimado mediante centrifugación en un gradiente de cloruro de cesio y se encuentra en un rango de 1.412-1.415 g ml<sup>-1</sup>. Normalmente por histopatología se observan cuerpos de inclusión esféricos que en ocasiones pueden tener forma angular (Lester *et al.*, 1987).

Los organismos infectados con HPV presentan numerosos cuerpos de inclusión y daño a nivel celular en el hepatopáncreas (Turnbull *et al.*, 1994). Estos cuerpos se han encontrado en células epiteliales de los túbulos hepatopancreáticos en juveniles y adultos de camarones silvestres y cultivados, tienen una localización intranuclear con bordes claramente definidos y se encuentran específicamente en el carioplasma y adyacente a los nucleolos. La

atrofia del hepatopáncreas así como la reducción de vacuolas lipídicas en los hepatopancreacitos indican una infección de moderada a severa por HPV (Spann *et al.*, 1997). La inflamación y necrosis en el hepatopáncreas no es visible en observación macroscópica del órgano (Lightner y Redman, 1985; Paynter *et al.*, 1985).

#### Signos de la enfermedad por HPV.

Los signos externos de HPV no son específicos, pero en infecciones severas se ha reportado: atrofia del hepatopáncreas, crecimiento lento, anorexia, reducción en la actividad de limpieza y consecuentemente un incremento en organismos epicomensales en superficie de branquias y opacidad ocasional de músculos del abdomen, así como infecciones secundarias por bacterias y hongos (Lightner *et al.*, 1985). Algunos de estos signos como la anorexia y letargia coinciden con los que causan los miembros de la familia *Densoviridae* en insectos, aunque existen también otros signos como flacidez e inhibición de la muda (Kawase *et al.*, 1991) debido a que el hepatopáncreas es el órgano que aporta la cantidad de lípidos para estos procesos (éstos no se observan en camarón). La infección por HPV está acompañada por la presencia de característicos cuerpos de inclusión basófilos intranucleares que afectan los túbulos hepatopancreáticos (Lightner & Redman, 1985).

#### Origen y distribución de HPV.

HPV fue reportado por primera vez en 1982 en postlarvas de *F. chinensis* provenientes de Quíngdao, China (Lightner & Redman, 1985). En América se

observó por primera vez en Brasil, en camarones cultivados de *P. monodon* y *F. penicillatus* importados de Taiwan (Lightner & Redman, 1991 Lightner *et al.*, 1992). El virus no fue encontrado en la especie nativa de Brasil; *L. schmitti*, pero más tarde se detectó en *L. vannamei* importado de Ecuador que había tenido contacto con aguas brasileñas. También se detectó en 1989 camarón infectado con HPV en el sur de Texas y cerca de Tamaulipas, México (Lightner *et al.*, 1992; Lightner, 1993).

El parvovirus hepatopancreático ha sido reportado en nueve especies de camarones penidos tanto silvestres como cultivados en Asia, África, Australia y América (Lightner & Redman, 1985). Las especies de camarón que parecen ser susceptibles de ser infectadas por este virus son: *F. merguensis*, *F. orientalis*, *F. semisulcatus*, *F. esculentus*, *P. monodon*, *F. japonicus*, *F. penicillatus*, *F. indicus*, *L. vannamei* y *L. stylirostris* (Bonami *et al.*, 1995).

La prevalencia de HPV en México es baja comparada con IHHNV, pero no por ello despreciable ya que se conocen casos de altas mortalidades acumuladas que se han encontrado en poblaciones de camarones asiáticos, donde se encuentra presente este virus (Lightner & Redman, 1985). En México se han observado altas prevalencias en temporadas específicas, por este motivo ha sido muy difícil el estudio de este virus (Pantoja, 1999).

#### Diagnóstico de HPV.

Uno de los métodos más usuales para la detección de HPV, es por histología del hepatopáncreas, mediante la tinción rutinaria de H & E, este método aunque es de gran utilidad para observar algunas patologías posiblemente asociadas, no garantiza la detección en organismos con un bajo

grado de infección. Sin embargo mediante histología, se pueden observar cuerpos de inclusión y algunas patologías que puedan coincidir con organismos infectados. El empleo de microscopía electrónica de transmisión es también una buena herramienta para demostrar la presencia de HPV pero el alto costo y sofisticado equipo que se requiere la convierte en una técnica impráctica para diagnóstico rutinario (Pantoja, 1999; Sukhumsirichart *et al.*, 1998).

Las técnicas moleculares son una alternativa para la detección de HPV. El diagnóstico se puede hacer mediante una sonda molecular específica para una parte del genoma del virus (Mari *et al.*, 1995), dos de las técnicas que pueden emplearse son la hibridación *in situ* y el dot blot. Estos métodos son altamente sensibles y capaces de detectar niveles bajos de infección. La primera, es una técnica que requiere de entrenamiento y dedicación pues es necesario la preparación de laminillas histológicas del hepatopáncreas; la segunda es una técnica sensible y sencilla y no requiere equipo especial para su implementación. Otra técnica molecular que puede ser empleada con éxito es la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

## Características y función del hepatopáncreas.

### **Características generales.**

La principal función del tracto digestivo de los decápodos es la digestión de la comida ingerida por la boca, y en ella están involucrados procesos intra y extra celulares para la digestión, absorción, almacenamiento de nutrientes y finalmente excreción y defecación de productos de desecho (Abubakr & Jones, 1992). El tracto digestivo, es esencialmente un tubo interno abierto por ambos extremos que se divide en anterior, medio y posterior. En la región anterior se encuentra la boca, y en la posterior se encuentra el ano, ambos llegan hasta la zona ectodermal y cruzan a través de la cutícula (Abubakr, 1991).

El intestino anterior está dividido en esófago, estómago cardiaco y estómago pilórico. El intestino medio forma parte del endodermo y consta de una simple glándula epitelial sin cutícula llamada hepatopáncreas. Está unido a la sección posterior del estómago pilórico y se extiende desde la mitad de la zona posterior del cefalotórax, hasta el intestino posterior en el abdomen (algunos órganos varían de acuerdo a la especie). En los decápodos, el intestino medio presenta un desarrollo complejo bilateral de los túbulos hepatopancreáticos, y está normalmente pegado a la sección ventral del estómago pilórico. Estos túbulos ocupan el mayor espacio en el cefalotórax y en algunas especies pueden extenderse hasta el abdomen (Al-Mohanna, 1991).

### **Función general.**

El intestino medio o hepatopáncreas es designado como acarreador de la última fase del ciclo digestivo. Sus funciones primordiales son: 1) completar el confinamiento de los productos digestivos recibidos del intestino anterior, 2) producir y proveer al intestino anterior de enzimas digestivas, 3) la absorción y procesamiento de productos digestivos, así como el transporte de éstas mediante el torrente sanguíneo, y por último 4) la eliminación de material residual.

El hepatopáncreas está involucrado también en otros procesos tales como: mantener el balance iónico, vitelogénesis, juega un papel importante en el sistema inmunológico para el rechazo de cuerpos extraños del sistema sanguíneo y detoxificación de metales y sustancias orgánicas extrañas.

Los decápodos; al igual que todos los crustáceos; son organismos que mudan durante toda su vida. En algunos casos el número de mudas es el que determina la madurez sexual y generalmente la reproducción se da en los periodos de muda. Estos periodos son importantes debido al gran consumo de energía que se requiere para formar la siguiente muda, y por la energía empleada en ir completando el crecimiento muscular del organismo. Dentro de este proceso está comprendida una preparación activa para así lograr la formación y endurecimiento del nuevo exoesqueleto. En estos periodos entre muda y muda, los excesos de metabolitos son apartados y almacenados particularmente en el hepatopáncreas, por lo cual este órgano es el encargado de suministrar la energía necesaria en el momento que el organismo lo requiera (Rosas *et al.*, 1995).

Tanto la muda como la reproducción, son dos de los más importantes eventos metabólicos que implican un período de movilización de las reservas del organismo las cuales se encuentran almacenadas en depósitos de la epidermis y la gónada respectivamente y que a su vez, fueron abastecidas por el hepatopáncreas.

Se sabe que este ciclo de movilización de las reservas para muda y reproducción, responde a una acción hormonal, pero se desconoce como es coordinado y alternado el suministro de energía para los dos mecanismos (D'Abramo *et al.*, 1997; Abubakr & Jones, 1992).

La integración e interacción de los ciclos de muda y reproducción, son particularmente obvios en el caso de las hembras adultas donde el desarrollo de los ovarios requiere de grandes reservas orgánicas (Adiyodi & Adiyodi, 1970).

El hepatopáncreas, además de ser una glándula digestiva encargada de la digestión y absorción de nutrientes, del almacenamiento de reservas y la excreción, tiene también importantes funciones relacionadas con procesos esenciales como son la muda y reproducción de los camarones, es por ello que surge el interés de conocer las diferentes enfermedades que atacan a dicho órgano, y los efectos que pudiesen ocasionar tanto en la salud de los organismos, así como en las descendencias futuras de éstos; es decir, si la calidad de las larvas pudiera verse afectada por el estado de salud de los reproductores.

### Características morfológicas.

El hepatopáncreas de los decápodos consiste de dos mitades que están a cada lado del animal. Cada mitad tiene tres lóbulos que están conectados separadamente con el estómago e intestino medio por un ducto primario que se divide en varios ductos secundarios para cada lóbulo. Los ductos secundarios son extensas ramas que tienen una terminación en ciego. El hepatopáncreas es morfológicamente similar en la mayoría de los decápodos, pero el número de lóbulos varía de acuerdo a la especie. La terminación en ciego de los túbulos hepáticos está formada por paquetes de pequeñas células, las cuales están diferenciadas a lo largo del túbulo para formar un simple epitelio columnar, que está soportado por una delgada lámina basal. Una malla continua de tejido conectivo es la que soporta los ductos, los túbulos y la superficie externa del hepatopáncreas. Las células del músculo forman una malla de tejido contráctil alrededor de la lámina basal de los túbulos (D'Abramo *et al.*, 1997)

Las células neurosecretoras están asociadas con las células musculares. El sinus sanguíneo ocupa el mayor espacio tubular, está forrado por células endoteliales con hemocitos circulantes en el lumen. Los fagocitos están fijados junto con las células endoteliales de la membrana basal y pueden tener contacto directo con la lámina basal de los túbulos. La innervación del hepatopáncreas no ha sido examinada a detalle. Se han identificados cinco tipos de células en el epitelio del hepatopáncreas, que están clasificadas como: E (embrionarias), R (reserva), F (fibrilares), B (en forma de vacuolas) y células M (Rosas *et al.*, 1995).

La localización de estas células varía a lo largo y ancho del túbulo, con las células E confinadas en el ciego y las células R que se encuentran a lo largo

y por fuera del túbulo. Las células F están principalmente en la región distal y las células B en la región proximal de los túbulos. Solo las células R están normalmente alineadas tanto en ductos primarios como secundarios del hepatopáncreas (Al-Mohanna & Nott, 1989).

### **Estructura y función de las células.**

Las células E ocupan el mayor volumen y tienen membrana nuclear lisa. El citoplasma tiene un retículo endoplásmico rugoso, mitocondrias con una simple membrana que contiene vesículas y numeroso complejo de Golgi. Estas son células no especializadas.

Las células F tienen un núcleo localizado en la región basal de la célula y en secciones donde hay células viejas presentan una irregular línea exterior. El retículo endoplásmico rugoso es extenso y con numerosos ribosomas libres alrededor de la membrana mitocondrial que son distribuidos hacia el exterior de la célula. En los camarones el complejo de Golgi produce enzimas vacuolares en estadios específicos del ciclo alimenticio. Vacuolas supranucleares se desarrollan en células viejas y estas sirven como reservas de hierro en algunos casos. Su principal función es la manufactura y secreción de enzimas, contienen gránulos de cimógeno que tienen la propiedad de absorber material soluble ajeno al organismo.

Las células B son las más largas y complejas del hepatopáncreas, están constituidas por una larga vacuola rodeada con una fina capa de citoplasma. El núcleo está restringido a la región basal de la célula, y en células viejas se comprime formando un óvalo con una membrana nuclear irregular. Las células B contienen numerosas vesículas picnóticas en la parte apical del citoplasma.

Estas vesículas se ensanchan para formar "cuerpos digestivos" y a esta región se le conoce como "complejo apical" (Al-Mohanna & Nott, 1989). Las mitocondrias y el complejo de Golgi están comúnmente en la región basal. En contraste con el complejo de Golgi de las células F, en las células B aparecen como vesículas aplanadas. Sus principales funciones son la secreción de enzimas digestivas, poseen una invaginación donde se llevan a cabo procesos digestivos intra y extracelulares así como de absorción de partículas y sustancias coloidales, actúan como blanco para iniciar la liberación de células epiteliales, poseen células que están ligadas con el reemplazo de las células F y aportan actividad mitótica a las células E.

Las células R son numerosas en el hepatopáncreas. Los núcleos se encuentran a lo largo de la zona basal de la célula, y contienen menos cromatina que otras células. El citoplasma está asociado con invaginaciones de la membrana basal de la célula; esto solo ocurre en el citoplasma apical en estadios específicos del ciclo digestivo. El retículo endoplásmico y los ribosomas son escasos, pero hay numerosas mitocondrias localizadas principalmente en la región apical. El sistema de Golgi es activado en la región media de la célula. En las células R se da un aplastamiento del complejo de Golgi que produce densas vesículas de electrones, las cuales se colapsan dentro de cuerpos multivesiculares y se acumulan eventualmente para formar vacuolas supranucleares. Estas vacuolas sirven de almacén de cobre y otros metales. Su principal función es la absorción y almacenamiento de lípidos y glicógeno, así como la transportación de metabolitos; estas células proveen el mejor sitio de almacenamiento de lípidos (Al-Mohanna & Nott, 1987).

Las células M comprenden las células más pequeñas y abundantes del hepatopáncreas. Durante los primeros estadios de desarrollo, los núcleos ocupan la mayor parte del volumen de la célula. Igual que las células en

desarrollo, los núcleos adquieren forma de hoz y se depositan en un costado de la célula formando masivos cuerpos densos. Estos cuerpos están formados por acumulación de gránulos producidos por el sistema de Golgi, ribosomas libres, mitocondrias y glicógeno que se encuentran dentro del citoplasma. Son cuerpos densos que tienen como función una digestión progresiva donde el material residual contiene densas esferas con contacto directo con el citoplasma. Estas células no tiene contacto con el lumen (Al-Mohanna & Nott, 1989).

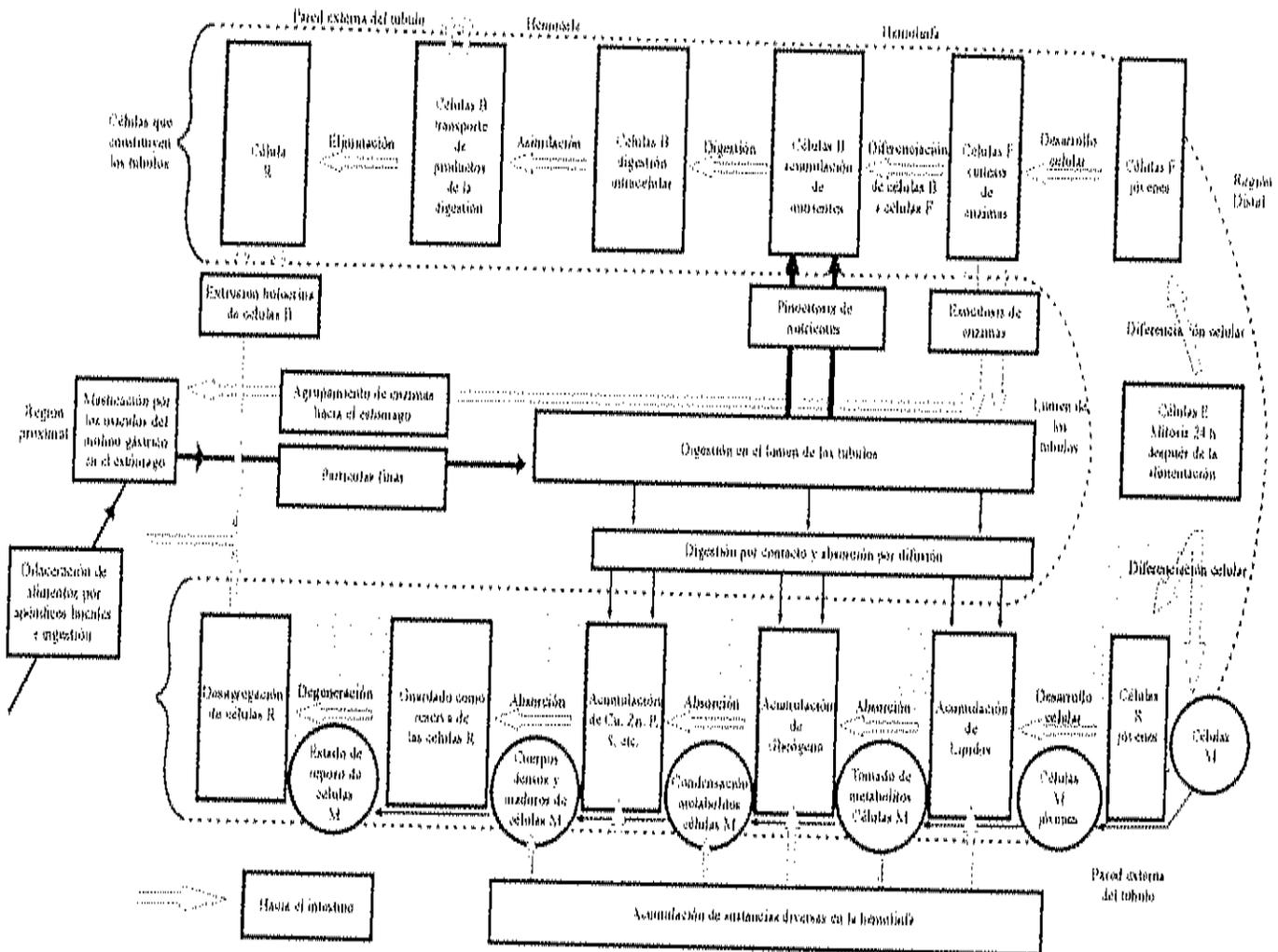


Fig. 1.-Diagrama de un túbulo del hepatopáncreas de *Penaeus semisulcatus*, donde se muestran las funciones de las células epiteliales en las diferentes fases del ciclo digestivo. Tomada de: Al-Mohanna & Nott, 1987.

### Técnicas Moleculares

Hasta hace algunos años la importancia de los virus en camarón había sido subestimada debido a que su diagnóstico dependía casi exclusivamente de técnicas histológicas y microscopía óptica, utilizando en algunos casos microscopía electrónica para su confirmación. Dichas técnicas son de gran importancia tanto en la investigación como en el diagnóstico de ciertas patologías, sin embargo comparadas con algunas técnicas moleculares, tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), pueden estar en desventaja en cuanto a tiempo de análisis se refiere. Cabe mencionar que en general las técnicas moleculares pueden presentar mayor sensibilidad y especificidad que las histológicas, debido a que son capaces de reconocer infecciones virales latentes; es decir, garantizan la detección del virus en organismos portadores con bajo grado de infección o de aquellos virus que no forman cuerpos de inclusión u oclusión en células hospederas (Pantoja, 1999). Sin embargo, la histología es capaz de mostrar patologías importantes que puedan estar relacionadas con algún patógeno en particular. No todas las técnicas moleculares son necesariamente más rápidas que la histopatología; por ejemplo, el dot-blot y la hibridación *in situ*, requieren de varias horas antes de la obtención de un resultado. Por lo tanto, la histología así como las técnicas moleculares son herramientas complementarias que deben ser utilizadas en conjunto para la obtención de un diagnóstico confiable (Mari *et al.*, 1995; Pantoja, 1999). Además del dot-blot, hibridación *in situ* y PCR, existen otros métodos moleculares que pueden ser utilizados para detección de patógenos como son el "Southern blot" para virus de ADN ó el "Northern blot" para virus de ARN.

Debido al gran problema que representaron las enfermedades virales en el cultivo de camarón desde hace algunos años; surge la importancia de la aplicación de estas técnicas moleculares como herramienta de diagnóstico para la detección y estudio de enfermedades de camarón. Esto conlleva a la elaboración de sondas específicas para los virus que están afectando los cultivos. Estos métodos han sido desarrollados exitosamente y aplicados en el campo de la salud humana y la agricultura, y actualmente están siendo aplicados para algunas enfermedades infecciosas en moluscos y crustáceos (Mialhe *et al*, 1992).

### **Sondas moleculares**

Una sonda molecular es un fragmento de ADN o ARN que tiene incorporada una molécula de marcaje, la cual permite visualizar los sitios de la hibridación. Esta molécula de marcaje puede ser un compuesto radioactivo o no radioactivo. El fragmento empleado como sonda, debe hibridizar con gran especificidad secuencias complementarias pertenecientes al genoma del patógeno a detectar, a partir del cual se originó. Existen varias formas para desarrollar una sonda: a) A partir de una determinada región de la secuencia del genoma viral, para crear oligonucleótidos sintéticos, b) A partir de la obtención de fragmentos genómicos virales obtenidos de la purificación del virus, mediante digestión enzimática aleatoria y su clonación en vectores plasmídicos para su replicación. c) A partir del conocimiento de la secuencia del genoma viral, seleccionando una determinada región para diseñar oligonucleótidos específicos y amplificar empleando la técnica de PCR (Farrel, 1993).

## PCR

La técnica de PCR es un excelente método para la síntesis de sondas, ya que permite amplificar *in vitro* un fragmento de ADN utilizando un par de oligonucleótidos que reconocen los extremos opuestos de ADN que se va a amplificar; una enzima termoestable (por ejemplo Taq polimerasa), para la síntesis de ADN, desoxinucleótidos trifosfatados (dNTPs) y un ADN molde que contiene la región que se va a sintetizar (Sambrook *et al.*, 1989).

### Transcripción Reversa-PCR.

La transcripción reversa, es la síntesis de ADN a partir de un molde de ARN. Esta copia de ADN es complementaria a la cadena de ARN por lo que se denomina ADN complementario (ADNc). Para virus de ARN la síntesis de ADNc se lleva a cabo en presencia de oligos de seis bases llamados "random primers", los cuales van a actuar como iniciadores para la transcripción reversa. La reacción es catalizada por las enzimas transcriptasas reversas (AMV y M MLV); aisladas de los retrovirus Avian Myeloblastosis Virus (AMV) y Moloney Murine Leukemia Virus (MMLV) por sus siglas en inglés.

Una vez obtenido el ADNc se procede a realizar la amplificación del fragmento mediante PCR. El producto de PCR es observado mediante la utilización de un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio. El bromuro de etidio se intercala entre los pares de bases y este se puede observar con una lámpara de luz ultravioleta (Farrel, 1993).

### **Oligos sintéticos.**

Los oligonucleótidos son artificialmente sintetizados de una cadena sencilla de ADN. Estos pueden ser clasificados como "largos" cuando contienen cien o más bases, o "cortos" cuando están constituidos por no más de 30 bases. La ventaja de trabajar con oligonucleótidos es que se tiene un completo control sobre la secuencia. La información sobre las secuencias para la elaboración de oligonucleótidos están por lo general previamente documentadas en bases de datos a las cuales se puede tener acceso.

### **Clonación.**

El proceso de clonación molecular requiere de aislar un fragmento de ADN, ligarlo a un plásmido bacteriano que sirve como vector, introducirlo a un microorganismo (generalmente bacterias) para que al crecer produzcan grandes cantidades de esa secuencia de ADN. El ADN es después extraído de las bacterias. La habilidad de generar millones de copias (clones) de una secuencia de ADN, es la base de la tecnología del ADN recombinante. El fragmento de ADN puede ser separado del vector plasmídico por medio de enzimas de restricción.

Enzimas de restricción.- Las enzimas de restricción son indispensables para el proceso de clonación, ya que permiten cortar el vector y el ADN de interés para poder ligarlos. Estas enzimas catalizan la hidrólisis de los enlaces covalentes entre el grupo fosfato de un nucleótido y la ribosa del nucleótido contiguo. Para llevar a cabo esta reacción, las enzimas de restricción reconocen secuencias pequeñas de 4 a 6 pares de bases en la doble cadena de ADN y

cortan los enlaces fosfodiéster de ambas cadenas. Estas enzimas son absolutamente específicas y únicamente cortan la secuencia que reconocen. Debido a esto, cuando se obtiene la digestión de un determinado ADN, se da un arreglo reproducible de fragmentos y estos pueden ser analizados mediante electroforesis.

Vectores plasmídicos.- Un plásmido es una molécula de ADN de doble cadena con capacidad de replicación en un hospedero (bacterias o levaduras). Los plásmidos utilizados para clonación molecular son pequeños ( 2-3-kb), contienen un origen de replicación, uno o mas marcadores de selección (usualmente un gen que confiere resistencia a antibióticos) y uno o mas sitios de restricción para introducir moléculas de ADN (sitio de clonación múltiple).

El origen de replicación es de 50 a 100 bases. Las enzimas del hospedero se unen a esta secuencia iniciando la replicación del plásmido circular. Una vez que la replicación inicia, continúa a lo largo del plásmido independientemente de la secuencia de ADN.

Uno de los vectores plasmídicos mas utilizados es el PUC 19 el cual posee un gen de resistencia a la ampicilina de tal manera que células transformadas de *E. coli* pueden crecer en un medio selectivo que contenga este antibiótico. De igual manera este plásmido contiene un segmento de ADN derivado del Operon Lac de *E. coli* que codifica para un fragmento amino-terminal de la  $\beta$ - galactosidasa. Las bacterias que adquieren el plásmido recombinante no sintetizan dicha enzima y forman colonias blancas en un medio con el inductor IPTG en un substrato X gal (5-bromo-4-cloro-3-indol-B-D-galactosidasa), mientras que las bacterias que no adquirieron el fragmento producen colonias azules (Farrel, 1993).

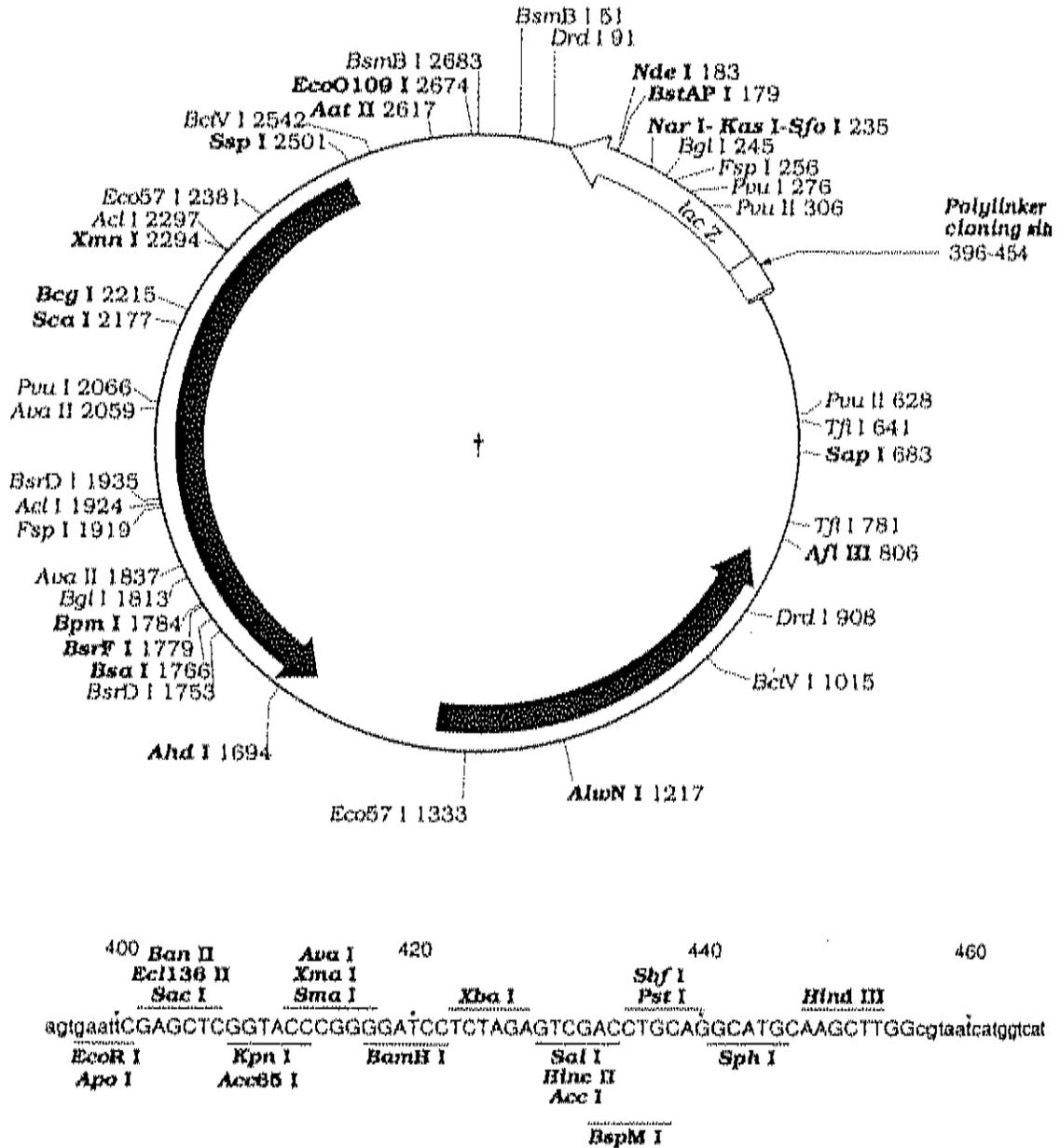


Fig 2.- Vector plasmídico PUC 19, donde se muestran las enzimas y los sitios de corte de cada fragmento del lásmido. Tomado de: Catálogo New England Biolabs (98/99) pag. 244.

## **Síntesis de sondas de ARN.**

### Transcripción *in vitro*.

La transcripción *in vitro* es el mejor método para generar una sonda de ARN. Una gran cantidad de sonda eficientemente marcada puede ser generada mediante la transcripción de una secuencia de ADN clonada entre dos promotores reconocidos por la ARN polimerasa.

La síntesis de una sonda de ARN mediante transcripción *in vitro*, involucra la elongación de ARN mediante la incorporación de dNTPs marcados al esqueleto de la sonda. Esta sonda es marcada al mismo tiempo que es sintetizada y presenta un alto grado de incorporación en el marcaje.

### **Marcaje de sondas.**

Una vez obtenido el fragmento con el cual se va a elaborar la sonda, es importante tener un método adecuado para la detección de la reacción de hibridación. Este método consiste en una forma de 'marcar' el fragmento de tal modo que nos indique cuándo y donde se lleva a cabo la hibridación. Este marcaje se realiza dependiendo del tipo de detección que se desee emplear y de la sensibilidad que se requiera.

Las consideraciones en la selección del sistema de marcaje de una sonda deben hacerse en base a una serie de factores dentro de los que se involucran: sensibilidad y resolución requerida, la estabilidad de la sonda

después de haber sido marcada, el tipo de hibridación que se vaya a emplear, entre otros.

Básicamente existen dos métodos para el marcaje de ácidos nucleicos: a.- método de radiomarcaje, b.- método no radioactivo de marcaje mediante la detección por quimioluminiscencia, técnicas colorimétricas o fluorescencia.

#### Marcaje radioactivo.

La aplicación de isótopos radioactivos ofrece excelente sensibilidad y compatibilidad con muchas técnicas de marcaje. La desventaja de los isótopos radioactivos es que son potencialmente dañinos para la salud, y los materiales requieren contenedores especiales para su desecho, altos costos de producción, y en ocasiones la necesidad de largos periodos de detección.

Los isótopos más comúnmente utilizados con ácidos nucleicos son  $^{32}\text{P}$ ,  $^{33}\text{P}$  y  $^{35}\text{S}$ ; la elección entre uno y otro muchas veces depende de la aplicación y precisión en el método de detección que se desee.

#### Marcaje no radioactivo.

##### **Biotina.**

La biotina es una pequeña vitamina soluble en agua que puede ser fácilmente conjugada a varias moléculas biológicas. Para la síntesis de una sonda de ácidos nucleicos ésta es transformada enzimáticamente mediante el uso de nucleótidos o por fotoactivación de la biotina. Estos tratamientos no

interfieren con su actividad biológica, y crean un eslabón entre la misma biotina que le da mayor firmeza y resistencia a la sonda.

La biotina presenta una fuerte y natural afinidad con la estreptavidina. La estreptavidina es una proteína en forma de tetrámero, con un peso molecular de 60 kd, aislada de la bacteria *Streptomyces avidinii* y posee siete sitios de unión para la biotina. A diferencia de la avidina (del huevo), la estreptavidina posee un punto isoeléctrico neutro a un pH fisiológico con algunos grupos de carga, y estos no contienen carbohidratos. Estas propiedades reducen la no especificidad de la unión y los problemas de trasfondo que en otras condiciones pudieran darse, lo cual da como resultado una reacción muy sensible. El complejo biotina -estreptavidina es muy utilizado en técnicas de hibridación de ácidos nucleicos.

### **Digoxigenina.**

La digoxigenina es una proteína utilizada para marcar ácidos nucleicos. Al igual que con biotina, las sondas de ADN son sintetizadas mediante el sistema de marcaje de "random priming".

Las sondas marcadas con digoxigenina son generadas enzimáticamente de acuerdo con el método de marcaje de "random priming", el cual está basado en la hibridación de oligonucleótidos al azar. El ADN es desnaturalizado, y las cadenas de ADN complementario son sintetizadas por el fragmento "Klenow" de la enzima ADN polimerasa, la cual requiere de las terminaciones 3'OH de los oligos y la mezcla de desoxiribonucleótidos que contienen DIG-11-dUTP, que dan como resultado la incorporación de la digoxigenina en el nuevo ADN sintetizado. Los sitios de hibridación son detectados mediante un anticuerpo

Anti-dig conjugado a una enzima que al ponerse en contacto con un sustrato forma un precipitado de color.

### **Fluoresceína.**

La fluoresceína es también un hapteno que puede ser incorporado por una reacción de síntesis. Los nucleótidos marcados con fluoresceína; fluoresceína-11-dUTP (F1-dUTP) pueden ser utilizados para la detección, una vez realizada la hibridación, los anticuerpos específicos para la fluoresceína suelen utilizarse para la localización de las zonas donde se llevó a cabo el evento de hibridación. Los anticuerpos anti-fluoresceína han sido modificados, dando así la existencia de un conjugado con una peroxidasa, para dar una reacción química en un soporte luminol para fluorescencia (Sambrook *et al.*, 1989; Farrel, 1993).

### Técnicas de marcaje.

#### **"Random priming".**

Es una técnica en la cual una mezcla de pequeñas secuencias de oligonucleótidos (6 bases) se alinean al ADN al azar, y al mismo tiempo la enzima "klenow" ADN polimerasa extiende estos oligos en dirección 5'-3' e incorpora los nucleótidos marcados (Farrell, 1993). "Random priming" funciona mejor con moléculas de ADN linealizadas. Una molécula de ADN entre 200 y 2000 pares de bases es el mejor sustrato para "random priming", ya que la longitud del molde no es un parámetro crítico en esta reacción de marcaje.

## PCR

La PCR además de ser un excelente método para la síntesis de sondas, puede ser empleado también como técnica de marcaje, ya que las moléculas de marcaje son incorporadas al mismo tiempo en que se van sintetizando. La ventaja de utilizar PCR como un método de marcaje es que el producto de la síntesis tiene una longitud uniforme. Las sondas marcadas por PCR presentan un alto porcentaje de incorporación debido a que son continuamente marcadas durante el proceso de síntesis.

### **"Nick translation".**

Nick translation es una de las técnicas más antiguas para marcaje de sondas. Esta involucra un marcaje aleatorio del esqueleto del ADN de doble cadena mediante el uso de desoxiribonucleasa (ADNsa). A bajas concentraciones de ADNsa, este marcaje ocurre aproximadamente cada 4-5 bases por molécula y produce un oligo libre 3'OH en cada lugar donde se lleva a cabo. Después la enzima ADN polimerasa remueve los nucleótidos nativos de las moléculas de la sonda en dirección 5' → 3' (por su actividad de exonucleasa) las cuales son reemplazadas con precursores de dNTPs en la misma dirección mediante la actividad de la polimerasa. Este método es eficiente tanto para moléculas lineales de ADN así como para no lineales y el marcaje transcurre en alrededor de una hora (Farell, 1993).

### **Transcripción *in vitro***

La transcripción *in vitro*, es también considerada una técnica de marcaje, ya que la molécula de marcaje es incorporada al mismo tiempo que se realiza la síntesis. Es por ello que se considera que estas sondas tienen un alto y eficiente grado de incorporación de marcaje.

### **Marcaje en la terminación 5'.**

Este método consiste en marcar todas las terminaciones 5' de la molécula. Esta técnica es coloquialmente conocida como "Kinasing reaction" debido a que la reacción es catalizada por la enzima T4 polinucleótido-cinasa. Esta técnica es más eficiente para ARN que para ADN, por lo cual no es comúnmente utilizada para marcar ARN.

### **Marcaje en la terminación 3'.**

El ARN puede también ser marcado en la terminación 3', utilizando la enzima polimerasa poly(A). Esta enzima es la responsable de la poliadenilación nuclear de varios hnARNs y cataliza la incorporación de AMP. En marcaje isotópico se requiere de un precursor ATP con marcaje en  $\alpha$  para marcar la sonda (Farrel, 1993).

## Métodos de detección.

### **Autoradiografía.**

La autoradiografía es una simple y sensible técnica fotoquímica, usada para la detección de compuestos empleados en el radiomarcaje sobre especímenes u objetos. En el estudio de ácidos nucleicos, las sondas radiomarcadas son detectadas en el lugar donde se efectuó la hibridación, ya sea como hibridación *in situ* o Inmovilizada sobre una membrana.

La autoradiografía se subdivide en dos grupos comúnmente conocidos como macroautoradiografía y microautoradiografía. Esto dependiendo del tipo de espécimen que contenga la radioactividad, el tipo de emulsión necesaria para la formación de la imagen, y el método de análisis de resultados que se emplee.

### **Colorimetría.**

Varios de los sistemas de detección colorimétrica aparecieron a mediados de los 80's teniendo gran aceptación.

Los procedimientos de detección colorimétricos y quimioluminiscentes son muy similares y solo difieren en la aplicación de los últimos reactivos. La localización de la hibridación de una sonda marcada con biotina es mediante la estreptavidina conjugada a fosfatasa alcalina (AP) o peroxidasa (HRP); las sondas marcadas con digoxigenina son localizadas generalmente con el anticuerpo (anti-dig) conjugado a la enzima (AP o HRP).

### **Fluorescencia.**

Es un proceso de Intensificación por medio del cual la energía asociada a los isótopos es convertida a luz mediante la interacción de radiopartículas utilizando compuestos de fluor, los cuales son expuestos a una placa de rayos X. La técnica funciona mediante la impregnación del espécimen (gel de acrilamida, gel de agarosa, o membrana cargada positivamente (poliacrilamida o nylon)) con una solución fluorográfica, y exponiéndola en una placa de revelado (cassette) de igual manera que en la autoradiografía.

### **Quimioluminiscencia.**

Existen varios sistemas de detección mediante quimioluminiscencia: estos pueden ser dependientes de una fosfatasa alcalina, o dependientes de una peroxidasa. El substrato utilizado para la fosfatasa alcalina es conocido como "Lumigen" y el resultado es una emisión de luz azul en el lugar donde se encuentra presente la fosfatasa. El substrato utilizado en el sistema de peroxidasa es conocido como "luminol horseradish peroxidase". Durante esta reacción, el luminol rompe los hidrógenos de la peroxidasa convirtiéndolos en radicales oxígeno ( $O_2^{\cdot}$ ) y  $H_2$ . Entonces los radicales oxígeno catalizan la oxidación del luminol, dando como resultado la formación de productos de oxidación y una asociada emisión de luz. La reacción en ambos casos se lleva a cabo en una placa para rayos X (Sambrook *et al.*, 1989).

### Aplicación de técnicas moleculares en el diagnóstico de enfermedades virales en camarón.

Las técnicas moleculares que principalmente han sido empleadas en el diagnóstico de enfermedades de camarón por estar mas disponibles en el mercado, son el dot-blot y la hibridación *in situ*, y mas recientemente la de PCR. El empleo de una u otra técnica depende en gran medida del objetivo que se pretenda alcanzar.

El principio de las dos primeras es básicamente el mismo ya que el objetivo principal es la hibridación de la sonda con una secuencia complementaria del genoma viral.

#### **Dot-blot.**

Es la hibridación sobre una membrana de nylon o nitrocelulosa. A la fecha esta es una de las técnicas mejor adaptadas para la detección de virus en camarón. Consiste en la extracción del ADN molde del organismo al que se vaya a realizar la detección, este ADN es desnaturalizado y fijado a una membrana cargada positivamente. El tratamiento de la muestra debe ser lo suficientemente efectivo para liberar el ADN genómico del virus que se encuentre en el tejido del organismo infectado. Una vez que el ADN está desnaturalizado y fijado sobre la membrana, se añade la sonda previamente desnaturalizada, y se da un tiempo de incubación para que se lleve a cabo la hibridación de las secuencias complementarias. Después de la hibridación, la sonda marcada es reconocida por medio de una proteína (eg. anticuerpo) conjugada a una enzima la cual será detectada al añadir un substrato con un cromógeno indicador.

### Aplicación de técnicas moleculares en el diagnóstico de enfermedades virales en camarón.

Las técnicas moleculares que principalmente han sido empleadas en el diagnóstico de enfermedades de camarón por estar más disponibles en el mercado, son el dot-blot y la hibridación *in situ*, y más recientemente la de PCR. El empleo de una u otra técnica depende en gran medida del objetivo que se pretenda alcanzar.

El principio de las dos primeras es básicamente el mismo ya que el objetivo principal es la hibridación de la sonda con una secuencia complementaria del genoma viral.

#### **Dot-blot.**

Es la hibridación sobre una membrana de nylon o nitrocelulosa. A la fecha esta es una de las técnicas mejor adaptadas para la detección de virus en camarón. Consiste en la extracción del ADN molde del organismo al que se vaya a realizar la detección, este ADN es desnaturalizado y fijado a una membrana cargada positivamente. El tratamiento de la muestra debe ser lo suficientemente efectivo para liberar el ADN genómico del virus que se encuentre en el tejido del organismo infectado. Una vez que el ADN está desnaturalizado y fijado sobre la membrana, se añade la sonda previamente desnaturalizada, y se da un tiempo de incubación para que se lleve a cabo la hibridación de las secuencias complementarias. Después de la hibridación, la sonda marcada es reconocida por medio de una proteína (eg. anticuerpo) conjugada a una enzima la cual será detectada al añadir un substrato con un cromógeno indicador.

### **Hibridación *in situ*.**

En esta técnica se emplean secciones de tejido previamente fijadas y montadas sobre laminillas de cristal, en las cuales se lleva a cabo el proceso de hibridación. Esta técnica es una valiosa herramienta para la detección de células y tejidos infectados con virus. La hibridación *in situ* tiene la ventaja de poder detectar la presencia de virus que aún no han desarrollado los característicos cuerpos de inclusión u oclusión particulares para cada caso.

Los tejidos son preparados por medio de técnicas histológicas estándares, poniendo especial cuidado en disminuir la degradación de los ácidos nucleicos por nucleasas endógenas o exógenas. El tejido es fijado, embebido en parafina, cortado e inmovilizado sobre un portaobjetos cargado positivamente. Antes de la hibridación, el tejido es sometido a un proceso de digestión enzimática con proteinasa K para remover proteínas asociadas al ADN y permite a la sonda la penetración hacia la célula infectada o incluso hasta el núcleo para el caso de virus nucleares. Para ello es necesario realizar una desnaturalización parcial del ADN, esta puede realizarse mediante temperatura, o bien por medio de algún compuesto químico el cual se puede incluir en el buffer de prehibridación.

La detección se realiza del mismo modo que en el dot-blot, mediante una proteína (anticuerpo) conjugada a una enzima y en presencia de un substrato con un cromógeno indicador. Esto va a dar como resultado el depósito de precipitados de color (en el caso de la detección colorimétrica) que se van a observar en núcleo o citoplasma revelando así la presencia del virus. Generalmente se utiliza un colorante de contraste para observar la ubicación de la hibridación en el tejido (Wilkinson, 1992).

## **PCR.**

Esta técnica permite amplificar *in vitro* un fragmento específico de ADN, utilizando una serie de reactivos. Todos estos reactivos tienen una función primordial: El ADN molde, que presenta la región que se quiere amplificar, una enzima ADN polimerasa, que cataliza la reacción de polimerización, "Primers" u oligonucleótidos, que flanquean la región que se va a amplificar y actúan como iniciadores para que la enzima realice la polimerización del ADN y desoxiribonucleótidos trifosfatados (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), que actúan como bloques de construcción de las moléculas de ADN que están siendo sintetizadas.

Una vez que los reactivos han sido mezclados el termociclador realiza tres pasos fundamentales: 1) la desnaturalización del ADN a 95 °C, 2) el alineamiento de los oligos; donde la temperatura va a depender de la elaboración de los oligos y 3) la extensión, en donde la polimerasa incorpora los dNTPs correspondientes a partir del ADN molde. Estos pasos son considerados un ciclo y deben ser repetidos entre 25 y 40 veces.

## **"Northern blot".**

Esta técnica consiste en la transferencia de ARN después de una separación electroforética de un gel de agarosa a una membrana, para una subsecuente fijación e hibridación con una sonda específica (ADN o ARN). El ARN es transferido a la membrana exactamente en la misma configuración en que fue separado en el gel y la señal de hibridación que se genera nos da un perfil tanto cuantitativo como cualitativo.

### **"Southern blot"**

Esta técnica tiene básicamente el mismo principio que el Northern blot, pero es empleada para ADN. Consiste en la hibridación de una sonda marcada (con radioactividad, biotina o digoxigenina) a una molécula de ADN que ha sido previamente digerida e inmovilizada en una membrana (nylon o nitrocelulosa). Después de una serie de lavados la señal se visualiza dependiendo del método de marcaje (por autoradiografía, colorimetría o quimioluminiscencia). Una banda será visible en el sitio de la hibridación. Cada banda representa el tamaño de los fragmentos que contienen secuencias complementarias a la sonda (Farrel, 1993).

### Electroforesis de ácidos nucleicos.

Los ácidos nucleicos pueden ser analizados por electroforesis en un buffer a pH neutro ya que los grupos fosfatos les confieren una carga neta negativa. Esta carga eléctrica hace que cuando las moléculas de ADN o ARN son colocadas en este campo eléctrico, migren hacia el polo positivo del campo. Si las moléculas en movimiento se encuentran en una matriz gelificada (agarosa o poliacrilamida), las más pequeñas se mueven más rápido y esto permite separar los fragmentos de ADN de diferente tamaño. Los fragmentos de ADN separados son visualizados tiñendo los geles con bromuro de etidio. Las moléculas de bromuro de etidio se intercalan en los nucleótidos de ADN y producen una fluorescencia color naranja al ser expuestos a luz ultravioleta, de esta manera es posible detectar la ubicación y peso molecular de los fragmentos de interés.

Esta técnica permite la observación del ADN plasmídico de productos de digestión enzimática de ADN, y la visualización de productos de PCR. En geles de agarosa, el bromuro de etidio es introducido directamente en el gel a una concentración de 0.5 µg/ml. La muestra debe ir junto con un buffer de carga, antes de ser introducida al gel, esto aumenta su densidad y la colorea, facilitando así el control de la migración (Farrel, 1993).

#### **Geles de Poliacrilamida.**

Los geles de poliacrilamida resultan de la polimerización del monómero de acrilamida. Son muy utilizados para separar proteínas pero también son útiles para separar fragmentos pequeños de ácidos nucleicos.

#### **Geles de Agarosa.**

La agarosa es un derivado fino de los carragenanos extraídos de algas pardas o rojas. Este compuesto es poco abundante pues de un 100% de agar extraído, solo de 3 o 4% puede ser utilizado como agarosa. Los geles de agarosa son ideales para macromoléculas como son los ácidos nucleicos ya que combinan fuerza y macroporosidad.

### Replicación viral.

La replicación viral se basa en ocho pasos importantes que son: unión, penetración, desenvoltura, replicación del genoma, expresión génica y síntesis de proteínas, ensamblaje, liberación y maduración (Fig. 3).

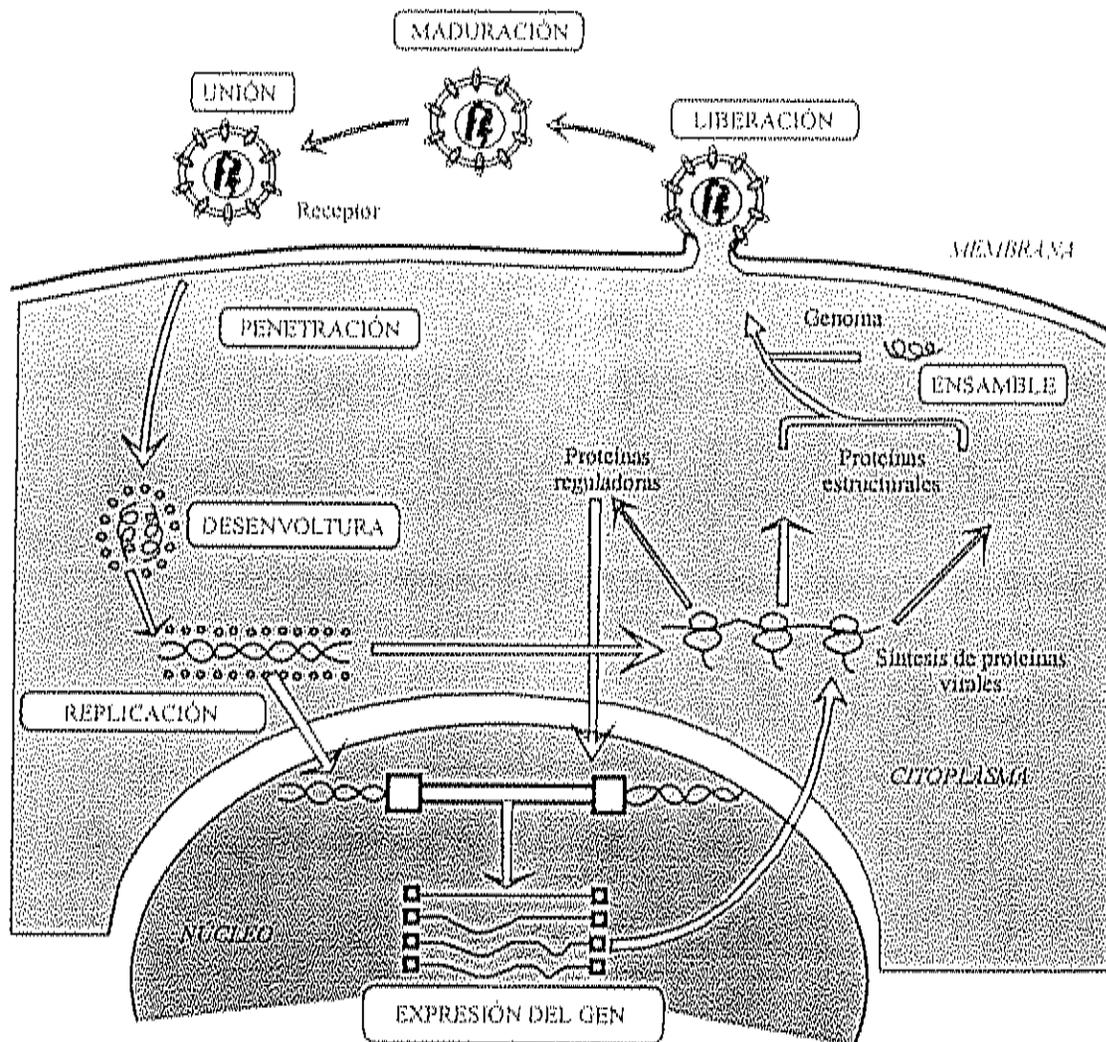


Fig 3.- Figura que muestra los ocho pasos involucrados en la replicación de un virus. Tomada de: <http://www-micro.msb.le.ac.uk/224/Replication.html>

### **a) Unión.**

La unión del virus a la célula consiste específicamente en la ligación de la proteína viral con una célula receptora. Estas células receptoras pueden ser proteínas (usualmente glicoproteínas o moléculas específicas), o residuos de azúcares presentes como glicolípidos.

Algunos virus complejos pueden tener mas de un receptor y utilizar rutas alternativas para entrar a la célula. La expresión del receptor en la superficie de la célula está determinada por el tropismo de algunos virus. El tipo de célula en la cual se va a llevar la replicación va a depender en gran medida del factor de patogenicidad.

La unión del virus a la célula, es en la mayoría de los casos un proceso reversible; si la penetración no sucede, el virus puede separarse de la superficie de la célula. Algunos virus tienen mecanismos específicos para desunirse; pero la evasión de la superficie de la célula siempre conduce a cambios en el virus en los cuales decrece o se elimina la posibilidad de unirse a otras células (Fig. 3).

### **b) Penetración.**

Al igual que la unión, la penetración del virus a la célula son procesos que implican un consumo de energía, en donde la célula debe estar metabólicamente activa para que esto suceda. Son tres mecanismos que están involucrados:

- 1.- Translocación,- donde el virión entra a través de la membrana celular.

2.- Fusión.- de la envoltura del virus con la membrana celular. En este paso se requiere la presencia de una proteína viral de fusión que debe estar contenida en la envoltura del virus, o una glicoproteína para el caso de los retrovirus.

3.- Endocitosis.- cuando el virus penetra dentro de las vacuolas intracelulares, y eventualmente dentro del citoplasma de la célula (Fig. 3).

### **c) Desenvoltura.**

La desenvoltura ocurre después de la penetración, y es cuando la cápside del virus es removida y el genoma viral queda expuesto, usualmente en forma de una nucleoproteína compleja.

Para los virus que se replican en el citoplasma, el genoma es simplemente liberado dentro de la célula. Sin embargo, en el caso de los virus que tienen replicación nuclear, el genoma siempre está asociado con nucleoproteínas, y puede ser transportado a través de la membrana nuclear. Esto se lleva a cabo mediante interacciones de las nucleoproteínas (de la cápside) con el citoesqueleto. Al llegar a los poros nucleares, la cápside es expulsada, y el genoma es introducido al núcleo (Fig. 3).

### **d) Replicación del genoma.**

Las estrategias de replicación de los virus depende de la naturaleza del genoma. Los virus pueden ser clasificados en siete grupos:

I: Virus de cadena doble de ADN (Adenovirus, Herpesvirus, Poxvirus, etc).

II: Virus de cadena sencilla de ADN (+). (Parvovirus).

- III: Virus de cadena doble de ARN (Reovirus, BiARNvirus).
- IV: Virus de cadena sencilla de ARN (+) (Picornavirus, Togavirus, etc).
- V: Virus de cadena sencilla de ARN (-) (Orthomixovirus, Rhabdovirus, etc).
- VI: Virus de cadena sencilla de ARN (+) con ADN intermediario en su ciclo de vida (Retrovirus).
- VII: Virus de cadena doble de ADN con ARN intermediario (Hepadnavirus).

La clase I, donde se encuentran los virus de cadena doble de ADN, pueden subdividirse a su vez en dos grupos: a) replicación exclusivamente nuclear, donde la maquinaria celular juega un papel en la replicación viral, y b) la replicación ocurre en el citoplasma; estos virus contienen todos los factores necesarios para la transcripción y replicación independientemente de la maquinaria celular (Fig. 4).

En la clase II donde se encuentran los virus de cadena sencilla, la replicación ocurre en el núcleo, e involucra la formación de una cadena (-), la cual sirve como molde para la síntesis de la segunda cadena (+) propia del virus (Fig. 4).

La clase III está formada por los virus de doble cadena de ARN; estos virus poseen un genoma segmentado. Cada segmento del virus es transcrito por separado para producir ARNs mensajeros monocistrónicos (Fig. 4).

La clase IV formada por virus de cadena sencilla (+) de ARN, pueden ser subdivididos en dos grupos: a) ARNm policistrónico; el resultado de la traducción es la formación de una poliproteína como producto, la cual es utilizada a su vez para la formación de proteínas maduras. b) Transcripción compleja; donde dos o más rutas de transcripción son necesarias para la producción de ARN genómico (Fig. 4).

La clase V, formada por virus de cadena sencilla de ARN (-), puede también tener dos pasos: a) en segmentos; donde el primer paso de la replicación es la transcripción de un ARN genómico (-) por el virión de ARN que depende de la ARN polimerasa para producir ARNm monocistrónicos, los cuales a su vez sirven como molde para la replicación del genoma. b) no segmentados; donde la replicación ocurre igual que en la clase IV y los productos son ARNm (Fig. 4).

La clase VI, virus de cadena sencilla (+) de ARN que mediante una enzima transcriptasa que posee el mismo virus, tiene la facultad de copiar la información del ARN a un ADN intermediario mediante un proceso llamado transcripción reversa. En este caso el genoma posee una cadena positiva (+), pero únicamente en medio de un virus (Fig. 4).

La clase VII; virus de cadena doble de ADN con un ARN intermediario (Hepadnavirus). Este grupo también se basa en una transcripción reversa, pero a diferencia de los Retrovirus, ésta ocurre dentro de la partícula viral en maduración. Durante la infección de una nueva célula, el primer evento que se da es una reparación de cualquier malformación del genoma, seguida por la transcripción. Para la replicación del genoma, el virus debe tener presente un ARNm el cual puede ser reorganizado y traducido para codificar a proteína. Esto puede realizarse de diferentes maneras:

- Los virus de doble cadena de ADN, sueltan su genoma dentro del núcleo y utilizan la maquinaria celular para la transcripción.
- Los virus ARN (+), poseen un genoma el cual sirve directamente de ARNm (excepto en los Retrovirus).

- Los virus ARN (-), deben portar enzimas codificadoras de ARN que dependen directamente de la misma replicación de su ARN ya que estas enzimas no se encuentran en las células no infectadas.

#### **e) Ensamblaje.**

En este paso están involucrados todos los componentes necesarios para la formación de un virión maduro en un sitio particular de la célula. Durante este proceso, la estructura básica del virus es ensamblada.

- Picornavirus, Poxvirus y Reovirus- En el citoplasma.
- Adenovirus, Papovavirus y Parvovirus- En el núcleo.
- Retrovirus- En la superficie inerte de la membrana celular.

#### **f) Liberación.**

Para los virus líticos (la mayoría de los virus no envueltos), la liberación es un simple proceso donde la membrana de la célula se rompe y el virus es liberado.

Para los virus envueltos, éstos obtienen los lípidos de la membrana celular y con ellos forman un capullo. Las proteínas del virión envuelto rasgan o rompen la membrana de la célula durante este proceso, y el virus es introducido por la región rota de la membrana.

#### **g) Maduración.**

El momento en que comienza la etapa del ciclo de vida del virus es precisamente cuando comienza el proceso de infección. Usualmente están

involucrados cambios estructurales en la célula, como resultado del desdoblamiento de las proteínas de la cápside para la formación de productos maduros, los cuales frecuentemente conllevan a cambios en dicha cápside, o a la condensación de las nucleoproteínas con el genoma. Para algunos virus, el ensamblaje y maduración son dos procesos inseparables, en otros casos, la maduración puede ocurrir después de que la partícula viral se encuentra instalada en la célula.

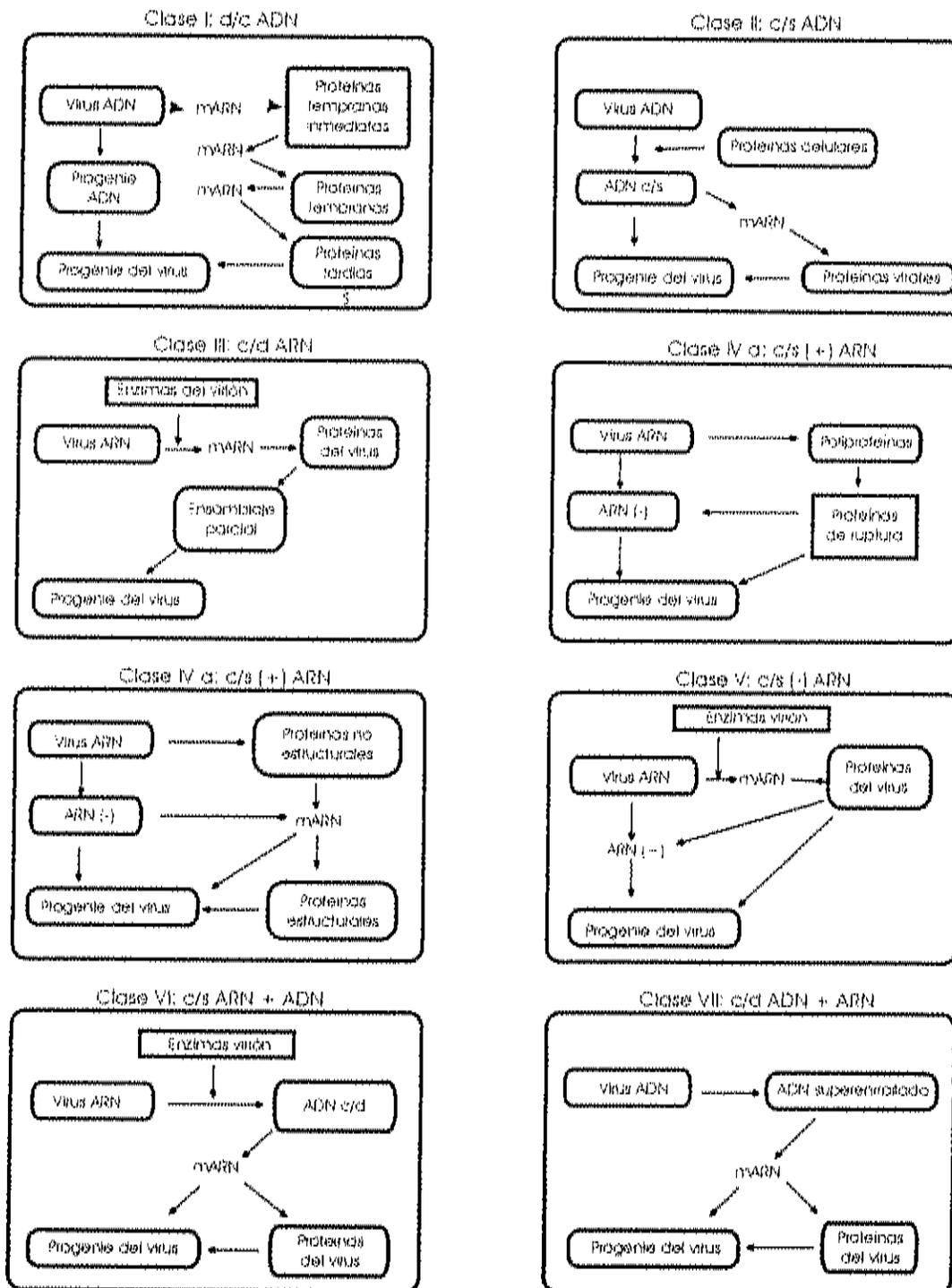


Fig. 4.- Estrategias de replicación viral de acuerdo a la naturaleza del genoma de los siete grupos o familias de virus conocidas.

Tomado de: <http://www-micro.msb.le.ac.uk/224/Replication.html>.

## Parvovirus.

La familia parvoviridae está formada por tres géneros: *Parvovirus*, *Dependovirus* y *Densovirus*. Los parvovirus tienen una amplia distribución entre los animales de sangre caliente y el hombre, entre ellos se encuentra el parvovirus B19 humano, el virus de la pancytopenia felina, parvovirus canino y otros. Solo el B19 es patógeno para el hombre el resto tiene especificidad de especie. Los *Dependovirus* infectan solo cuando se asocian a otro virus cooperador como el adenovirus. Los *Densovirus* solo infectan a insectos, son extraordinariamente pequeños, con un diámetro que oscila entre los 18-26 nm, no tienen cápsula y presentan simetría icosaédrica con 18 a 32 capsómeros. Son muy resistentes a la inactivación manteniendo su estabilidad entre pH de 3 a 9 y durante 12 horas a 56 °C . Son inactivados por la formalina, propiolactona y otros agentes oxidantes. Los intentos de aislamiento mediante cultivo no han sido muy fructíferos pudiéndose cultivar sólo en las células precursoras de la serie roja.

El genoma está compuesto por ADN monocatenario de unas 5.5 Kb. Puede ser de polaridad positiva o negativa. La proporción entre los viriones de una u otra cadena depende del tipo de virus que se considere. Presenta dos zonas de lectura (ORFs) no superpuestas. Las más cercanas al extremo 3' codifican a las proteínas de la cubierta VP1,2,3 y las cercanas al extremo 5' a las proteínas no estructurales (NS1,2). El número de proteínas VP y NS varía en función del tipo de parvovirus. La alteración de las proteínas NS conduce a una incapacidad o disminución de la actividad replicativa viral ya sea por disminución de la transactivación de una proteína (p38) o por la propia alteración genética. Todos los parvovirus tienen en sus extremos 3' y 5' secuencias palindrómicas que son fundamentales para la replicación. Esta

replicación se realiza en el núcleo celular siendo imprescindible que la célula se encuentra en actividad mitótica, es decir, en la fase S o G2. Como consecuencia de ello la replicación es muy intensa en los tejidos que muestran una rápida multiplicación celular (p.e. sistema hematopoyético). Son incapaces de replicarse en una célula en reposo e igualmente se duda de la posibilidad de que puedan producir latencia. La liberación viral está relacionada con procesos degenerativos de la membrana nuclear y citoplásmica.

(<http://www.fei.es/protocol/sero07.htm>).

## MATERIALES Y METODOS.

### Procedencia de los organismos.

Los organismos fueron capturados durante el periodo que comprende junio de 1997 a noviembre de 1998.

Para la realización de este trabajo se utilizaron diferentes lotes de camarones tanto silvestres como cultivados de las especies *Litopenaeus vannamei* y *Litopenaeus stylirostris*. Los organismos fueron analizados mediante la técnica de dot-blot y análisis histopatológico. Los lotes analizados fueron los siguientes:

### Organismos cultivados

Lote	No. organismos	Especie	Procedencia
A	40	<i>L. vannamei</i>	Laboratorio de producción larval. Sinaloa, México.
B	20	<i>L. vannamei</i>	Granja de producción acuícola Sinaloa, México.
C	20	<i>L. stylirostris</i>	Granja de producción acuícola Nayarit, México.
D	20	<i>L. vannamei</i>	Granja de producción acuícola Sinaloa, México.

### Organismos silvestres

Lote	No. organismos	Especie	Procedencia
H	20	<i>L. stylirostris</i>	Organismos silvestres Costas de Nayarit, México (alta mar).

En algunos de los camarones cultivados fueron observadas algunas características externas tales como cutícula suave, nado errático, tracto digestivo vacío, expansión de cromatóforos y necrosis en la cutícula. Los organismos silvestres; (H) fueron capturados en altamar a bordo de la embarcación camaronera "Daniel Francisco Lito" durante el crucero de evaluación poblacional que realizó el Centro Regional de Investigación Pesquera (CRIP-Mazatlán) del 5 al 10 de agosto de 1998. El área comprendida fue de Punta Raza al Canal de Cuautla en el estado de Nayarit (tomado de Hernández, 2000).

#### Tratamiento de los organismos.

Cada lote de organismos fue dividido en dos, de donde una parte se congeló a -20 °C para el análisis de hibridación en soporte sólido (dot-blot), y la otra parte fue fijada con solución de Davidson para el procesamiento histológico.

## **Histopatología.**

El procesamiento histopatológico se efectuó según la metodología descrita por Lightner (1996). Los organismos seleccionados fueron fijados con solución de Davidson. Los camarones fueron inyectados con esta solución utilizando jeringas de insulina de 0.5 ml ó 1.0 ml, y sumergidos en ésta solución por un período de 24 a 72 horas. Posteriormente fueron enjuagados con agua corriente para eliminar el exceso de fijador y se sumergieron en una solución de etanol al 70% durante 12 horas. Finalmente los organismos fueron seccionados. Se hizo un corte transversal separando el cefalotórax del abdomen, y en la región del cefalotórax se hizo otro corte diagonal a la altura del hepatopáncreas, colocando este último en un molde Tissue-Tek unicassette # 4170 para llevar a cabo la deshidratación de los tejidos en un tren automático. Ésta consiste en la inmersión de los tejidos en un gradiente ascendente de alcoholes, xileno y parafina, teniendo como finalidad la inclusión en parafina en donde se substituyen los espacios vacíos de los tejidos deshidratados por parafina, de tal manera que el tejido conserve su estructura aún después de ser deshidratado.

- Alcohol etílico al 70 %; dos baños de 1 h cada uno.
- Alcohol etílico al 80 %; dos baños de 1 h cada uno.
- Alcohol etílico al 95 %; dos baños de 1 h cada uno.
- Etanol absoluto; dos baños de 1 h cada uno.
- Xilol; dos baños de 1 h cada uno.
- Parafina; dos baños de 1 h cada uno.

Posteriormente se hizo la inclusión en parafina (Histoembebedor Leica-Jung, USA). Los bloques obtenidos fueron descalcificados con una solución de ácidos orgánicos diluidos al 50% en agua destilada, cortados con un microtomo

(Jung Histocut Leica #820) a un grosor de 3-5  $\mu\text{m}$ , y finalmente teñidos por la técnica de tinción de Hematoxilina Eosin-floxina (H & E) (Lightner, 1996).

Esta técnica de tinción involucra la hidratación de los tejidos mediante un gradiente descendente de alcoholes y finalmente un enjuague con agua destilada como se indica a continuación:

- 2 inmersiones en xileno por 5 minutos cada una.
- 10 enjuagues en etanol absoluto, dos veces.
- 10 enjuagues en etanol al 96%, dos veces.
- 10 enjuagues en etanol al 80%, dos veces.
- 10 enjuagues en etanol al 50%, una vez.
- 6 inmersiones en agua destilada, una vez.

Una vez hidratados los tejidos, las laminillas se tiñeron con el colorante vital de Hematoxilina de Mayer durante 8 minutos. Se hizo un lavado con agua corriente para eliminar el exceso de colorante y se pasaron al colorante de Eosina-floxina por dos minutos.

Los tejidos teñidos fueron nuevamente deshidratados de la siguiente manera:

- 10 enjuagues en etanol al 96%, dos veces.
- 10 enjuagues en etanol absoluto, dos veces.
- 10 enjuagues en xileno, cuatro veces.

Por último las laminillas fueron montadas en resina sintética diluida en xileno y con un cubreobjetos (Corning, USA de 25x50 mm). Se dejaron secar a 65 °C durante 12 horas.

Las laminillas fueron analizadas con un microscopio óptico (Olympus mod. CH-30RF100, USA) a 40x para observar los posibles cuerpos de inclusión de HPV y algunas alteraciones patológicas que pudieran presentarse en el hepatopáncreas de los camarones que resultaron ser positivos para este virus por la técnica de dot-blot.

#### Recuperación de la Sonda de HPV a partir de plásmidos bacterianos.

La obtención de la sonda de HPV se inició a partir de plásmidos bacterianos desarrollados en la Universidad de Montpellier II, Francia, en colaboración con la Universidad de Arizona, Estados Unidos. Estos plásmidos contienen un fragmento de ADN correspondiente al genoma viral de HPV. Los clones bacterianos fueron donados para investigación al Laboratorio de Virología del CIAD-Mazatlán. La producción de plásmidos, recuperación de los fragmentos de ADN y el marcaje no radioactivo con DIG-11-dUTP; fue realizado en las instalaciones del CIAD siguiendo el protocolo descrito por Mari *et al.*(1995).

#### **Crecimiento de bacterias.**

El fragmento correspondiente al virus de HPV fue clonado en bacterias *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ , mantenidas en glicerol a -20°C. Para su recuperación estas bacterias fueron sembradas en Caldo de Luria con 100  $\mu$ g/ml de ampicilina. Se colocaron 100 microlitros de solución bacteriana por cada 3 ml de caldo y se incubaron en una incubadora Precision Scientific Mod.2727; a 37°C durante 14 h con una agitación a 200 rpm.

### Extracción de plásmidos bacterianos.

- a) La metodología empleada para la extracción de plásmidos fue mediante la técnica de lisis alcalina, de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Boehringer Mannheim, No. de cat. 1 754 777). Las soluciones bacterianas fueron colocadas en microtubos eppendorff de 1.5 ml y centrifugadas durante 10 minutos a 13000 rpm para obtener un pellet compacto de células ((Centrifuga Beckman mod. GS-15R rotor F24028). La técnica se describe a continuación:
  - a) Se desechó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 250  $\mu$ l de buffer de suspensión.
  - b) Se añadieron 250  $\mu$ l de buffer de lisis, se mezcló cuidadosamente y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente.
  - c) Se neutralizó con buffer de neutralización y se invirtió el tubo de 3-6 veces, se incubó en hielo durante 5 minutos, obteniendo una solución floculenta y turbia.
  - d) Se centrifugó 10 minutos a 13000 rpm, para obtener nuevamente el pellet compacto.
  - e) El sobrenadante fue colocado sobre un tubo de polipropileno con un filtro de membrana en el fondo, colocando un tubo colector. Se centrifugó de 30 a 60 seg a 13000 rpm.
  - f) El producto de la centrifugación fue descartado, y el filtro que contenía el DNA de interés fue lavado para posteriormente ser eluido.

- g) Los lavados se hicieron con 700  $\mu$ l de buffer de lavado (20 mM de NaCl y 2mM de Tris-HCl a un pH de 7.5). Se centrifugó de 30-60 segundos a 13000 rpm. Se repitió la centrifugación para eliminar residuos. En ambos casos se descartaron los productos de la centrifugación contenidos en el tubo colector.
- h) La elución se hizo insertando el filtro en un microtubo nuevo, se añadieron de 25 a 100  $\mu$ l de buffer de elución (10 mM de Tris-HCl y 1 mM de EDTA, pH 8.5).
- i) Se dejó reposar durante un minuto, se centrifugó de 30-60 seg a 13000 rpm y se colectó el ADN en solución.

### **Electroforesis.**

Para comprobar la presencia del ADN plasmídico se realizó una electroforesis tomando como referencia un fragmento de ADN de peso molecular y concentración conocidos (Marcador III de peso molecular (Boehringer Mannheim)). Este contiene trece fragmentos de diferentes pesos moleculares que van desde 0.12 - 21.2 kb. El marcador se utilizó a una concentración de 0.125  $\mu$ g/ $\mu$ l, y la cuantificación se hizo mediante la comparación entre la intensidad de la muestra problema y la de las diferentes bandas de peso molecular conocido.

La electroforesis se llevó a cabo en un gel de agarosa (Sigma: A-9539) al 1% con una concentración de 0.5  $\mu$ g/ml de bromuro de etidio, utilizando un buffer de carga (50 % de glicerol, 1.0 % de ficoll, 3.0% de SDS, 0.05 % de azul de bromofenol y 0.05 de cyanol de xileno). La principal función de este buffer es

atrapar el DNA para lograr que permanezca dentro del gel, y poder observar aproximadamente la rapidez con la que se efectúa la corrida.

El gel fue colocado durante 45 minutos a 100 volts en una mini cámara de electroforesis (Easy-cast Submarine Gel System/Mod. EC370) con buffer TBE (0.089 M de trisma base, 0.089 M de ácido bórico y 0.002 M de EDTA, ajustado a un pH de 8.4), utilizando una fuente de poder (EC 250-90).

Las bandas de ADN se observaron con una lámpara de luz ultravioleta (Ultra-Lum UVC-515) y se documentaron utilizando una cámara polaroid.

#### **Precipitación de ADN.**

La precipitación con etanol se realizó para elevar la concentración del ADN en solución. El procedimiento fue el siguiente:

- b) Colocar el ADN eluido en un tubo de 1.5 ml.
- c) Agregar acetato de sodio al 3M y etanol absoluto en una proporción de 1:20 acetato:etanol con respecto al volumen de la solución de ADN (Cantidad de etanol= 2.5 veces el volumen de la solución de ADN).
- d) Mantener a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 60 minutos. Centrifugar a 12000 rpm durante 10 minutos a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Centrifuga Beckman mod. GS-15R rotor F24028).

- e) Repetir centrifugación con etanol al 70 %, descartar el sobrenadante y dejar secar el pellet a temperatura ambiente.
- f) El pellet se resuspendió en 30  $\mu$ l Buffer TE (tris 10 mM, 1 mM EDTA, pH 8.5). (El volumen de la elución depende de la cantidad de ADN estimado en la muestra).

### **Digestión enzimática de plásmidos.**

Los plásmidos bacterianos fueron digeridos de acuerdo al protocolo que indica el distribuidor de Boehringer Mannheim (1998) para la endonucleasa de restricción Acc1 (No. cat. 728 420), que tiene un volumen de actividad de  $5 \times 10^3$  unidades/ml. El tiempo de digestión fue de 3 horas y la temperatura de reacción de 37°C. Se utilizó un Buffer de Incubación (SuRE /Cut Buffer A) constituido por 33mM de Tris-acetato, 66 mM K-acetato, 0.5 mM de dithiothreito, a un pH de 7.9.

### **Electroforesis Preparativa.**

Una vez separado el inserto de ADN del resto del plásmido bacteriano, éste fue recuperado. El producto de la digestión fue separado en un gel de agarosa al 1% con una concentración de bromuro de etidio de 0.5  $\mu$ g/ml. Se colocaron de 80 a 120 microlitros totales de muestra (dependiendo de los volúmenes de elución), distribuidos en pozos cada uno con 8  $\mu$ l de buffer de carga por cada 40 $\mu$ l de solución de ADN. El gel fue colocado en la cámara de electroforesis durante 45 minutos a 90 volts. Las bandas de ADN fueron observadas en un transiluminador de luz ultravioleta.

### **Extracción del fragmento de HPV de un gel de agarosa.**

Esta técnica se hizo siguiendo el protocolo descrito por Boehringer Mannheim (1998) (No. cat. 1 696 505), y consistió básicamente en la extracción del DNA de la agarosa.

- a) Se cortó el gel de agarosa donde se encontraban las bandas con el ADN de interés.
- b) Se colocaron las rebanadas de agarosa conteniendo el ADN en tubos eppendorff de 1.5 ml (~100 mg de agarosa por cada microtubo).
- c) Se agregaron 300  $\mu$ l de buffer de solubilización de agarosa (compuesto de perclorato de sodio), a cada microtubo y se adicionó una solución de sílica (matriz de sílica esférica pretratada con perclorato de sodio).
- d) Se incubó durante 10 minutos a 60 °C agitando en el vortex cada 2 o 3 minutos. La cantidad de sílica varió de acuerdo a la concentración de ADN; 10  $\mu$ l de sílica para una solución con un máximo de 2.5  $\mu$ g de ADN. Se agregaron 4  $\mu$ l mas por cada  $\mu$ g adicional de ADN.
- e) Se centrifugaron los microtubos durante 30 segundos a máxima velocidad y se descartó el sobrenadante.
- f) La matriz que contenía el ADN (elución), fue resuspendida en 500  $\mu$ l de buffer de ácidos nucleicos (disueltos en perclorato de sodio). El pellet fue lavado con un buffer de lavado disuelto en etanol absoluto

### **Cuantificación de la sonda.**

Esta técnica se hizo siguiendo la metodología descrita por Boehringer Mannheim (1998) en el Kit de DIG Control Teststrips (No. cat. 166 966).

Para la cuantificación se tomó 1 $\mu$ l de la sonda suspendida en TE (10 mM tris HCl, 1 mM EDTA, ajustado a un pH de 8.0, y 50  $\mu$ g/ml de ADN de arenque), y se hicieron dos diluciones  $10^{-1}$  y  $10^{-2}$  con el mismo buffer. Se colocó 1  $\mu$ l tanto de la sonda como de las diluciones, en orden ascendente, en una tira que contiene una membrana de nylon de 0.6 x 8.0 cm cargada positivamente y dividida para cada alicuota. Se dejaron secar a temperatura ambiente durante 5 minutos, y se hizo la detección colorimétrica. Esta reacción de colorimetría se realizó mediante un tren de cuantificación de sonda (Cuadro 1) usando como referencia una tira control. La reacción se revisó periódicamente para verificar el desarrollo de color en las distintas concentraciones tanto de la sonda como de los controles. La reacción se detuvo con agua destilada y buffer TE, y la cuantificación de la sonda se hizo de acuerdo a la reacción de color, comparando la intensidad de la muestra con la tira control de concentración conocida.

Una vez parada la reacción se tuvo cuidado de mantenerlas fuera de la luz para evitar que la membrana de la tira se pusiera oscura.

Se prepararon cinco tubos numerados en orden ascendente: Todos los tubos tuvieron un volumen de reacción de 2 ml.

Tubo No. 1.- 2 ml de reactivo de bloqueo (reactivo de bloqueo disuelto en buffer de ácido maleico; constituido el segundo por 0.1 M de ácido maleico, 0.15 M de NaCl, ajustado a un pH de 7.5).

Tubo No. 2.- 2 ml de solución del anticuerpo (Dilución de la anti-digoxigenina (750 U/ml ) 1:2000 en buffer de ácido maleico).

Tubo No. 3.- 2 ml de buffer de ácido maleico.

Tubo No. 4.- 2 ml de buffer de detección (0.1 M Tris HCl, 0.1 M NaCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub> ajustado a un pH de 9.5).

Tubo No. 5.- 2 ml de solución de substrato o reacción de color (2 ml de buffer de detección, 7  $\mu$ l de solución de X-fosfatos (0.9 ml 5-bromo-4-cloro-3-indolyl fosfato, sal de tolueno, 50 mg/ml en metilformamida), y 9  $\mu$ l de NBT:(1.25 ml de sal nitroblue tetrazolio, 75 mg/ml de dímetilformamida)),

Cuadro 1.- Protocolo de cuantificación de la sonda de HPV marcada con DIG-11-dUTP (Boehringer-Mannheim).

Tubo No. 1	Reacción de bloqueo	2 minutos
Tubo No. 2	Reacción-anticuerpo	3 minutos
Tubo No. 1	Reacción de bloqueo	1 minuto
Tubo No 3	Lavado	1 minuto
Tubo No. 4	Reacción de equilibrio	1 minuto
Tubo No. 5	Reacción de color	5 - 30 minutos en oscuridad

#### **Prueba para corroborar el buen funcionamiento de la sonda.**

Se seleccionaron algunos controles positivos para el virus de HPV.

Se tomó una membrana de nylon cargada positivamente, se cuadrículó con un lápiz de punto fino, y se colocó 1  $\mu$ l del macerado de cada una de las muestras de camarones tanto positivos (+) como negativos (-) para HPV junto con sus diluciones (1:4, 1:400, 1:4000).

Una vez punteada y seca la membrana con las muestras, ésta fue colocada sobre un transiluminador para fijar el ADN a la membrana (2.5 min de cada lado). Se procedió a realizar la hibridación, los lavados y la detección correspondientes al dot-blot, utilizando la sonda elaborada con el inserto para HPV.

### Técnica de dot-blot para HPV.

Esta técnica forma parte del diagnóstico de enfermedades, y fue estandarizada en el Laboratorio de Virología del CIAD-Mazatlán con el fin de realizar el diagnóstico confirmativo de la enfermedad viral de HPV, en aquellos organismos de los cuales ya se tenía un diagnóstico histológico positivo para el virus. Se empleó la metodología para dot blot de ADN descrita en el Manual de Boehringer Mannheim (1995).

Se hizo la extracción del hepatopáncreas de cada organismo y se maceró en buffer TN estéril (Tris 20 mM; NaCl 400 mM, pH 7.4) (Bonami *et al.*, 1997) a una proporción de 4:1 de buffer: tejido, respectivamente. Para macerar se emplearon maceradores de polipropileno para romper las células y dejar en suspensión el ADN. La muestra se mantuvo siempre en frío para evitar la degradación enzimática. Las muestras fueron centrifugadas durante dos minutos a 13000 rpm (microcentrífuga HCF-120 Tomy Kogyo Co. Japón), y se tomaron únicamente los sobrenadantes, descartando los residuos celulares. Se hizo una serie de diluciones (1:4, 1:10 y 1:100) con buffer TN, donde la dilución 1:4 fue la concentración inicial. Se desnaturalizó el ADN de cada muestra junto con sus diluciones a una temperatura de 96-100°C durante 10 minutos, se colocaron los tubos en hielo durante un par de minutos para evitar que las bandas de ADN se volvieran a unir. Una vez fría la muestra se colocó 1 µl de cada una junto con sus diluciones con una micropipeta (Finnipipette, 0.5 – 10 µl) sobre una membrana de nylon, cargada positivamente para retener el material genético (Boehringer Mannheim No. cat. 1209299). La muestra colocada sobre la membrana, se dejó secar a temperatura ambiente durante 5 minutos, y se fijó sobre la membrana mediante luz ultravioleta (5 minutos para cada membrana, 2.5 min por cada lado). Las membranas fueron previamente marcadas con los números correspondientes a cada muestra.

Posteriormente se hizo un lavado de prehibridación por cuatro horas con el buffer de prehibridación (Boehringer, Mannheim, 1995). Antes de terminar la prehibridación, se desnaturalizó la sonda contenida en el buffer de hibridación a baño maría a 96°C por 10 minutos; e inmediatamente se puso en hielo durante dos minutos. La hibridación de la membrana se llevó a cabo en una bolsa de plástico estéril (Whirlpack, NASCO, USA). Se selló la bolsa con calor (ULSealing equipment, mod. KF-200H). Se verificó que no hubiera fugas del buffer y se dejó hibridizando a 68 °C durante toda la noche.

Una vez terminada la hibridación, la solución de hibridación fue recuperada para posteriores muestras (se almacenó a -20°C). La membrana se lavó en buffer de citrato salino, dos lavados de 10 minutos cada uno con el buffer 1 de lavado (2 X SSC + 0.1% (w/v) SDS), y dos lavados de 15 minutos cada uno con el buffer 2 de lavado (0.1% SSC + 0.1% SDS). Ambos lavados a temperatura ambiente y con agitación continua.

Posteriormente se dio a la membrana un lavado durante 1 minuto con el buffer de ácido maleico (0.1 M ácido maleico, 0.15 M NaCl, a un pH de 7.5).

Se colocó la membrana en buffer de bloqueo 1X (Buffer de bloqueo Boehringer Mannheim Cat. No.1096176, 0.5% (w/v) de reactivo de bloqueo disuelto en buffer de ácido maleico), por una hora a temperatura ambiente. Se descartó la solución de bloqueo y la membrana se colocó en una bolsa de plástico estéril con una solución 1:5000 de anti-DIG fosfatasa alcalina en buffer de bloqueo 1X y se incubó por una hora a temperatura ambiente.

Se desechó esta solución y se hicieron a la membrana dos lavados de 15 minutos cada uno con buffer de ácido maleico.

La detección se hizo mediante dos métodos: por colorimetría y por quimioluminiscencia. La primera, utilizando como sustrato una mezcla de NBT-BCIP fosfato, la cual da una coloración azul o morada del complejo anticuerpo-digoxigenina. Para la detección por quimioluminiscencia se utilizó como sustrato al CSPD que es una substancia que libera fotones a partir de la reacción enzimática con la fosfatasa alcalina, y esta reacción es captada por una placa fotosensible (placa fotográfica).

#### **Detección por colorimetría.**

La membrana se lavó durante dos minutos a temperatura ambiente con buffer III (100 mM tris HCl, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub> ajustado a un pH de 9.5).

Se preparó la solución de detección (9 µl de NBT + 7 µl de solución de fosfatos, diluidos en dos ml del buffer III). Se colocó la membrana dentro de esta solución y se incubó en la oscuridad de 3 a 6 horas. Se revisó periódicamente la membrana hasta que el precipitado fue visible, una vez que el resultado fue satisfactorio se sacó la membrana de esta solución y se paro la reacción con buffer TE durante 5 minutos. Finalmente las membranas fueron guardadas en agua destilada y protegidas de la luz.

#### **Detección por Quimioluminiscencia.**

Después de los lavados con buffer de ácido maleico, se dio a la membrana dos lavados de 10 minutos cada uno con buffer C (100mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, pH 9.5 en agua destilada). Se añadieron 10 µl de CSPD

(Disodium 3-(4-methoxy-1,2-dioxolano-3,2'- (5'-cloro) tricyclo [3.3.1.1<sup>3,7</sup>] decan-4-yl)) Boehringer, Mannheim Cat. No. 1655 834. Esta solución se preparó diluyendo el CSPD en buffer 3 en una proporción 1:100 respectivamente.

Se colocó la membrana sobre un acetato, se agregó la mezcla anterior y se cubrió con otro acetato evitando la formación de burbujas. Se incubó durante 30 minutos a 37°C y se colocó sobre una placa radiográfica, se expuso de 30 minutos hasta dos horas en un cassette de revelado. El tiempo de exposición fue dado de acuerdo a la estimación de la concentración de la sonda.

Posteriormente se reveló como placa fotográfica y se prosiguió a la lectura e interpretación de los resultados (Metodología tomada de Boehringer Mannheim, 1995).

## RESULTADOS

Recuperación del fragmento de HPV para la elaboración de una sonda mediante extracción de plásmidos bacterianos, digestión enzimática y marcaje con digoxigenina.

### **Recuperación de bacterias.**

Las bacterias DH5 $\alpha$  transformadas con el plásmido PUC19 que contenían un fragmento de ADN correspondiente al virus de HPV, fueron recuperadas a partir de seis alícuotas (AF1.1, AF1.2, AF1.3, AF1.4 AF1.5 y AF1.6). Tres de estas no crecieron y fueron desechadas, por lo que se continuó el trabajo con los clones obtenidos de las alícuotas: AF1.1, AF1.2 y AF1.3.

El crecimiento en placa fue favorable y mostró que las bacterias contenían el plásmido PUC 19, pues este plásmido contiene un gen que codifica para la resistencia a la ampicilina de tal manera que se sembraron en un agar con este antibiótico para garantizar que las bacterias que crecieran fueran solo aquellas que contenían el plásmido. Las colonias obtenidas tuvieron una morfología que coincide con la morfología de las colonias esperadas. Luego se procedió a la replicación de las mismas para su posterior extracción y verificación de los plásmidos.

### **Extracción y verificación de plásmidos.**

Los plásmidos extraídos tuvieron un peso molecular aproximado de 4200 pb (Fig.5), analizado por electroforesis en un gel de agarosa al 1%, lo cual indicó la presencia tanto del vector plasmídico PUC 19 ( 2400 pb), así como del fragmento correspondiente a HPV ( 1800 pb).

### **Digestión enzimática.**

Una vez corroborada la presencia del plásmido con el inserto en el gel de agarosa se procedió a la digestión enzimática del mismo con la enzima Acc1, obteniendo tres diferentes fragmentos: a) 1800 pb; correspondiente al fragmento viral de HPV, b) 2400 pb; correspondiente al vector plasmídico, c) 4200 pb; correspondiente al residuo de plásmido que no se alcanzó a digerir (Fig. 6). El marcador de peso molecular utilizado como referencia fue el Marcador III de Boheringer Mannheim que contiene trece fragmentos de los siguientes tamaños: 125, 564, 831, 947, 1375, 1584, 1904, 2027, 3530, 4268, 4973, 5148, 21226 pb (No. cat. 528 552, catálogo Boheringer Mannheim, 1998).

### **Purificación y recuperación del fragmento de HPV.**

El fragmento de 1800 pb obtenido en la electroforesis preparativa (Fig. 7), fue cortado del gel y purificado para eliminar la agarosa. Para la purificación fueron probados tres diferentes métodos. Sin embargo, la eficiencia de recuperación del ADN fue baja mediante las tres técnicas.

### **Marcaje y cuantificación de la sonda.**

El ADN producto de la recuperación de la agarosa fue marcado con digoxigenina mediante la técnica descrita en el kit de Hi-Prime (Boehringer Mannheim) y cuantificado en base a la incorporación de digoxigenina entre los pares de bases, obteniendo una concentración de aproximadamente 100  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de sonda marcada (Fig. 8).

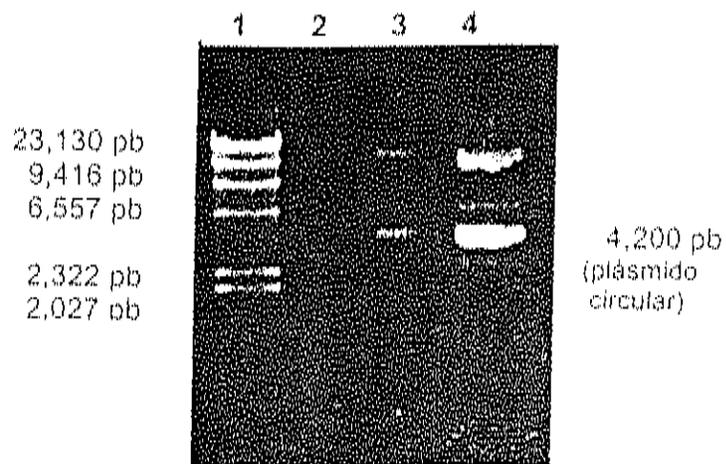


Figura 5. -Resultado que muestra el producto de la extracción del plásmido con un peso molecular aprox. de 4200 pb, en un gel de agarosa al 1 % con buffer TBE. El carril 1 representa el Marcador Lambda-HindIII de peso molecular. Carril 3 y 4 es el plásmido extraído con un peso molecular de 4200 pb.

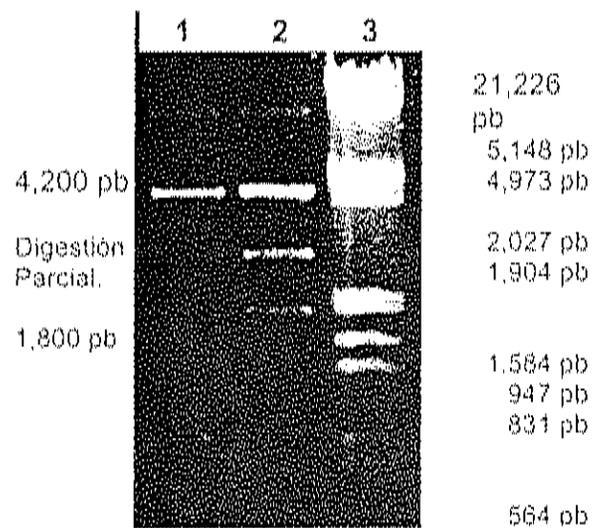


Figura 6 .- Resultado de la digestión enzimática del plásmido con la enzima Acc1 (Boehringer Mannheim) en un gel de agarosa al 1 % con buffer TBE. El carril 1 representa el plásmido extraído, el carril 2 muestra la digestión parcial, el carril 3 es el Marcador III de peso molecular (Boehringer Mannheim).

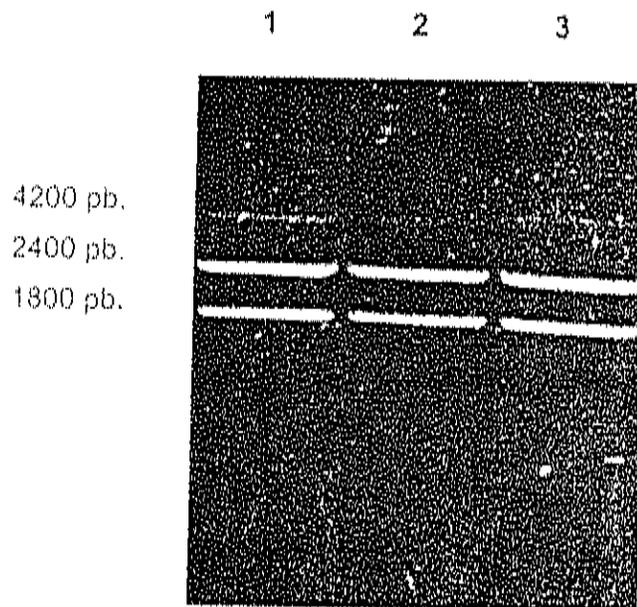


Figura 7.- Electroforesis preparativa del producto de la digestión enzimática para separar el plásmido PUC19 del inserto de AF1 de HPV. Gel de agarosa al 1 % en buffer TBE. La banda de 2400 pb corresponde al plásmido sin el inserto; la banda de 1800 pb corresponde a HPV y la banda de 4200 pb corresponde a una fracción del plásmido que no fue digerido.

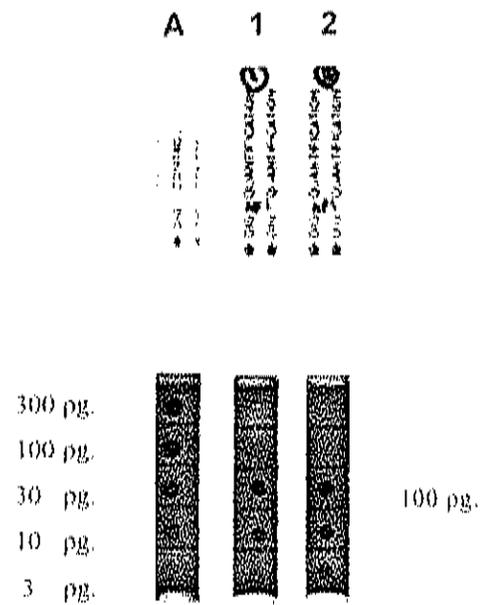


Figura 8.- Cuantificación del fragmento de HPV marcado (sonda) mediante la técnica de cuantificación de ácidos nucleicos en base a la cantidad de digoxigenina. La tira A contiene una cantidad conocida de digoxigenina y cuatro diluciones en picogramos. Las tiras 1 y 2 contienen la sonda de HPV marcada con digoxigenina y dos diluciones. Al comparar la intensidad de la señal, se encontró una cantidad aproximada de 100 pg/ $\mu$ l de ADN marcado.

Aplicación de la sonda de HPV a poblaciones silvestres y cultivadas de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* y camarón azul *Litopenaeus stylirostris* mediante la técnica de dot-blot.

La tabla No. 1 muestra los resultados de la prueba de dot blot de los diferentes lotes de camarón analizados. En los organismos cultivados los lotes C y D fueron los que presentaron el mayor número de organismos positivos para HPV, mostrando 13 organismos positivos de 20 analizados (para ambos casos), dando esto una prevalencia del 60 % (Figs. 9 y 10). En segundo lugar se encontró el lote A que presentó una prevalencia del 22.5 % y por último el lote B que solo presentó un organismo positivo de 20 organismos analizados, dando así una prevalencia del 5.0 %. Para el caso de los organismos silvestres; el lote H presentó una prevalencia del 50% de organismos infectados con el virus.

De los cinco lotes analizados, sólo en el lote A fueron empleadas las dos técnicas de detección; la colorimétrica y la quimioluminiscente, encontrando resultados positivos solo mediante la técnica de quimioluminiscencia. Los cuatro lotes restantes (B, C, D y H) fueron detectados empleando únicamente la técnica colorimétrica.

La tabla 1 muestra la prevalencia de HPV detectada en todos los lotes de camarón analizados en este trabajo.

La figura 11 es una gráfica de barras que muestra la prevalencia de HPV en los cuatro lotes de organismos cultivados que fueron analizados mediante dot- blot.

Tabla 1.- Prevalencia de HPV detectada en camarones peneidos mediante dot-blot.

Lote	Origen	Detección	Prevalencia
			%
A	Cultivado	Quimioluminiscencia	22.5
B	Cultivado	Colorimetría	5.0
C	Cultivado	Colorimetría	60.0
D	Cultivado	Colorimetría	60.0
H	Silvestre	Colorimetría	50.0

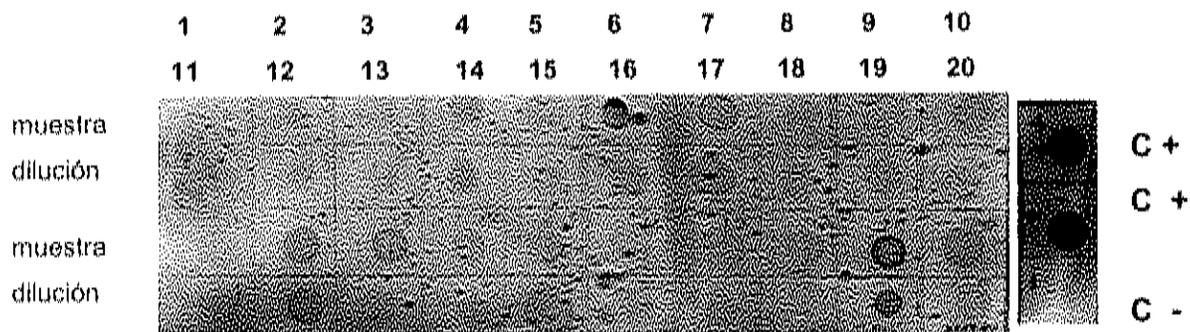


Fig. 9.- Resultado de dot-blot para HPV del lote C (camarón blanco cultivado) empleando una técnica de detección colorimétrica. Los números indican un organismo diferente, cada muestra (arriba) tiene una dilución (abajo).

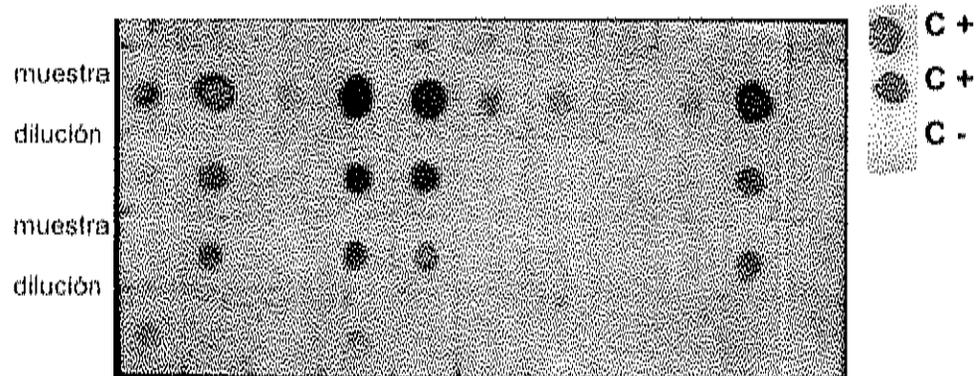


Fig. 10.- Resultado de dot-blot para HPV del lote D (camarón azul cultivado) empleando una técnica de detección colorimétrica. Los números indican un organismo diferente, cada muestra (arriba) tiene su dilución (abajo).

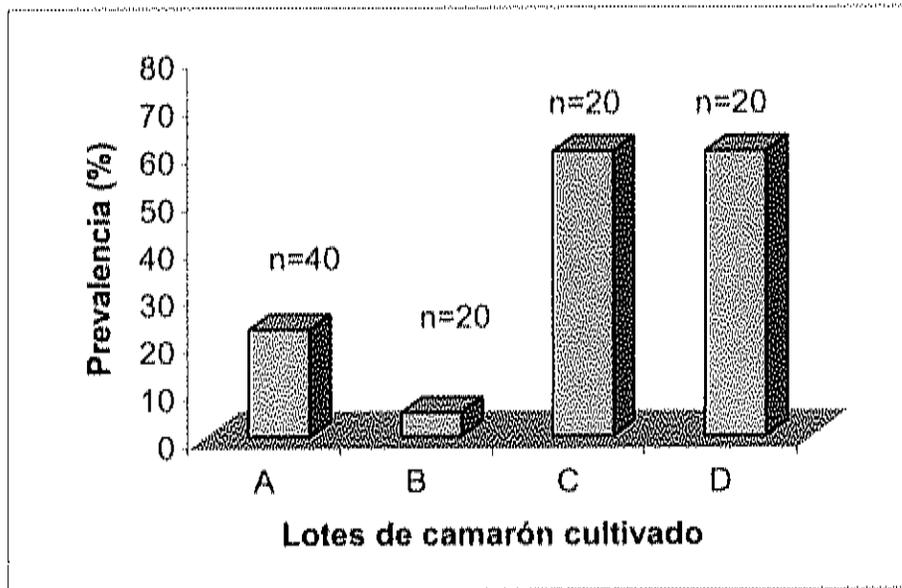


Fig. 11.- Prevalencia (%) de HPV en lotes de camarón cultivado.

### Características macroscópicas de los organismos.

La tabla 2 muestra los signos clínicos observados en los lotes de camarón cultivado. Se pudo observar que el lote A presentó signos externos de posibles patologías tales como: cutícula blanda con severa necrosis, urópodos negros; algunos con edemas bien desarrollados y antenas rojas, así como una marcada atrofia del hepatopáncreas en la mayoría de los casos. Esto se puede apreciar observando el tamaño de este órgano disminuido con respecto a la cavidad (Fig. 12). A diferencia de ello se observa un hepatopáncreas con características normales, donde el órgano se encuentra distribuido en toda la cavidad (Fig. 13). En algunos casos las diferencias entre organismos aparentemente enfermos y sanos fueron muy claras (Fig. 14) sin embargo esto no coincidió con los diferentes grados de infección con HPV detectados mediante la sonda.

Los lotes B y C no presentaron signos clínicos de enfermedad, a excepción de un poco de cromatóforos expandidos y antenas rojas, lo cual fue común en todos los lotes de camarón cultivado.

En el lote D además de observarse algunos signos de estrés (músculo blanco), resultaron tener elevados niveles bacterianos con altos porcentajes de colonias bacterianas verdes en medio TCBS (vibrios potencialmente patógenos).

El lote H no presentó características macroscópicas anormales. Los camarones de este lote tenían apariencia externa sana.

Tabla 2.- Características de los diferentes lotes de organismos analizados.

Lote	No. org. analizados	Especie	Características macroscópicas
A	40	<i>L. vannamei</i>	Severa necrosis en cutícula, urópodos negros; algunos con edema, antenas rojas y rotas, cutícula blanda, cromatóforos muy expandidos y en la mayoría de los casos los organismos no presentaron reflejo escapatorio.
B	20	<i>L. vannamei</i>	No presentaron daños externos importantes a excepción de un poco de expansión de cromatóforos y algunas antenas rojas. En general estos organismos se observaron sanos.
C	20	<i>L. vannamei</i>	No presentaron daños externos importantes a excepción de un poco de expansión de cromatóforos y algunas antenas rojas. En general estos organismos se observaron sanos.
D	20	<i>L. stylirostris</i>	Algunos signos de estrés tales como cromatóforos expandidos y músculo blanco, pleópodos muy amarillos. Atrofia del hepatopáncreas (G-3) (Fig. 10).
H	20	<i>L. vannamei</i>	No presentaron características macroscópicas de enfermedad.

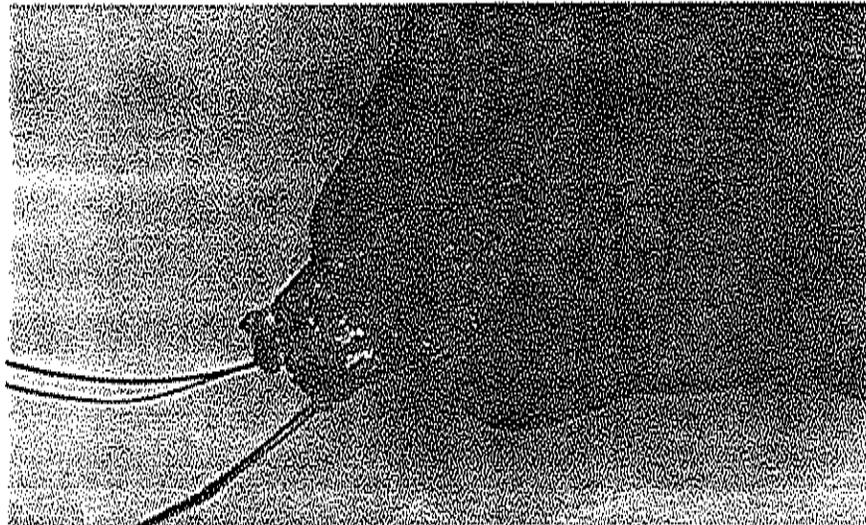


Figura 12.- Cefalotórax de un organismo donde se muestra el tamaño del hepatopáncreas disminuido con respecto a la cavidad del órgano (atrofia).



Figura 13.- Cefalotórax de un organismo donde se muestra un hepatopáncreas con apariencia normal.



Figura 14.-Organismos *L. vannamei* donde se muestra la diferencia entre un camarón con características externas de enfermedad tales como cutícula blanda, severa expansión de cromatóforos, antenas rotas y rojas, así como músculo flácido (arriba), y un camarón con apariencia sana (abajo).

### Análisis histopatológico

En la tabla 3 se describen algunas de las patologías encontradas en los lotes de camarón cultivado, mediante análisis histopatológico. Los lotes A, C y D, fueron los que se observaron con mayor problema. A nivel tisular se observó en los túbulos del hepatopáncreas: hipertrofia de algunos núcleos de las células, infiltración hemocítica y formación de nódulos hemocíticos, así como severa atrofia en la región central del órgano, adelgazamiento de las paredes de los túbulos y necrosis. En el lote D se observaron algunas inclusiones parecidas a HPV en el núcleo de las células (Fig. 22) que coincidieron con diversas patologías encontradas en el hepatopáncreas.

En el lote B no se observaron alteraciones en el hepatopáncreas, tampoco cuerpos de inclusión de HPV (Fig. 15).

Algunos de los organismos procesados por histología presentaron autólisis de la región central del hepatopáncreas debido a una mala fijación. Esto se dio en organismos de tallas muy grandes pertenecientes al lote A, y en un bajo porcentaje de aproximadamente un 15 % (Fig. 16).

El lote H de camarón silvestre no presentó alteraciones celulares en el hepatopáncreas sin embargo se observaron, aunque en un porcentaje bajo, cuerpos de inclusión intranucleares que pudieran relacionarse con una infección por HPV.

Tabla 3.-Alteraciones tisulares observadas en los lotes de camarón analizados.

Lote	Daños tisulares
A	Se observó infiltración hemocítica con formación de granulomas (Fig. 18), hipertrofia del lumen y adelgazamiento de las paredes entre los túbulos hepatopancreáticos, así como desprendimiento de células picnóticas (Fig. 17). No se observaron cuerpos de inclusión característicos de HPV.
B	No se encontraron problemas a nivel celular en el hepatopáncreas, ni cuerpos de inclusión característicos de HPV (Fig. 15).
C	Se observó infiltración hemocítica con formación de nódulos (Fig. 20), hipertrofia del lumen de los túbulos con necrosis tubular, así como nódulos con melanización (Fig. 21) e inclusiones nucleares parecidas a cuerpos de inclusión de HPV (Fig. 22).
D	Se observaron diversas patologías tales como infiltración hemocítica, inicio de formación de nódulos hemocíticos, atrofia de células de algunos túbulos del hepatopáncreas, melanización y necrosis en gran parte del hepatopáncreas. Se observó la formación de núcleos hipertrofiados parecidos a cuerpos de inclusión de HPV (Fig. 22).
H	Se observaron posibles cuerpos de inclusión de HPV.

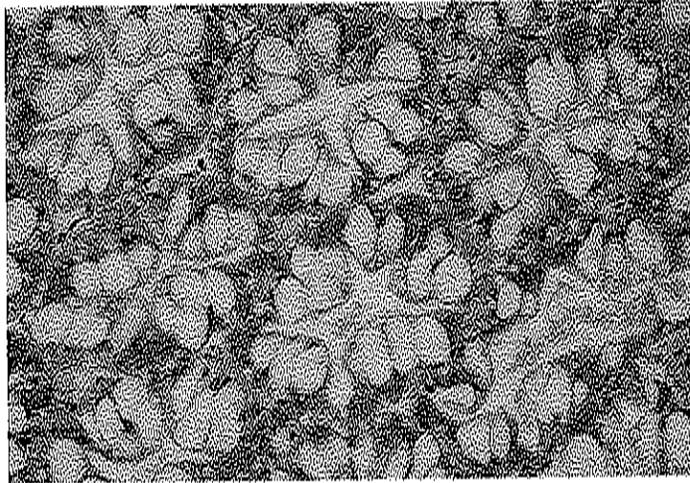


Figura 15 Hepatopáncreas de un organismo perteneciente al lote B donde se observa el tejido sin daño aparente (40X).

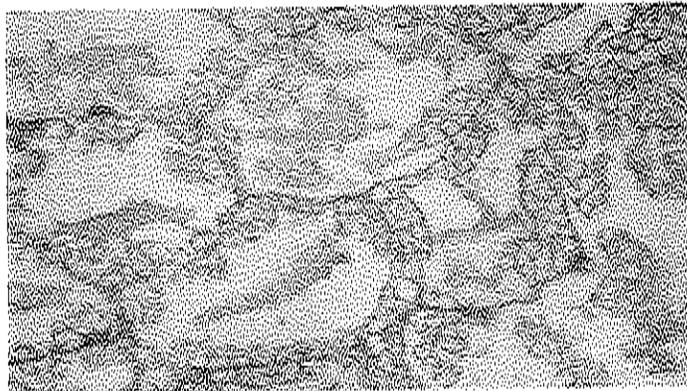


Figura 16.- Hepatopáncreas de un organismo perteneciente al lote A, donde se muestra autólisis debida a una mala fijación con solución de Davidson (40X).

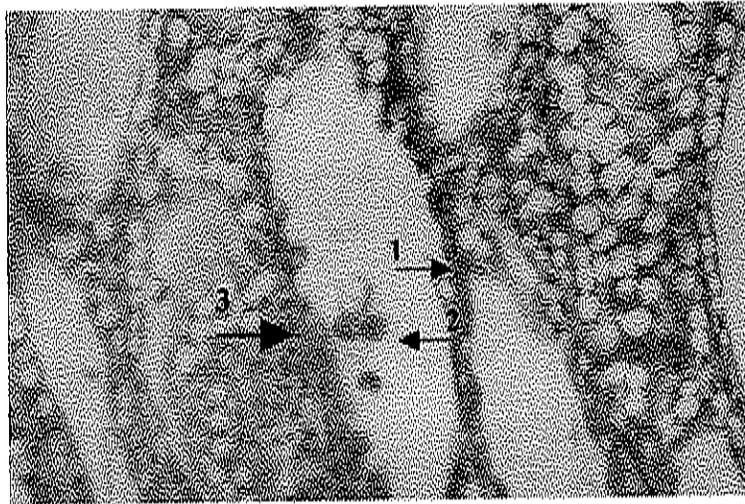


Figura 17.- Hepatopáncreas de un organismo perteneciente al lote A, donde se muestran atrofia del epitelio de los túbulos hepatopancreáticos (1), desprendimiento de células picnóticas (2) e infiltración hemocítica (3). (60X).

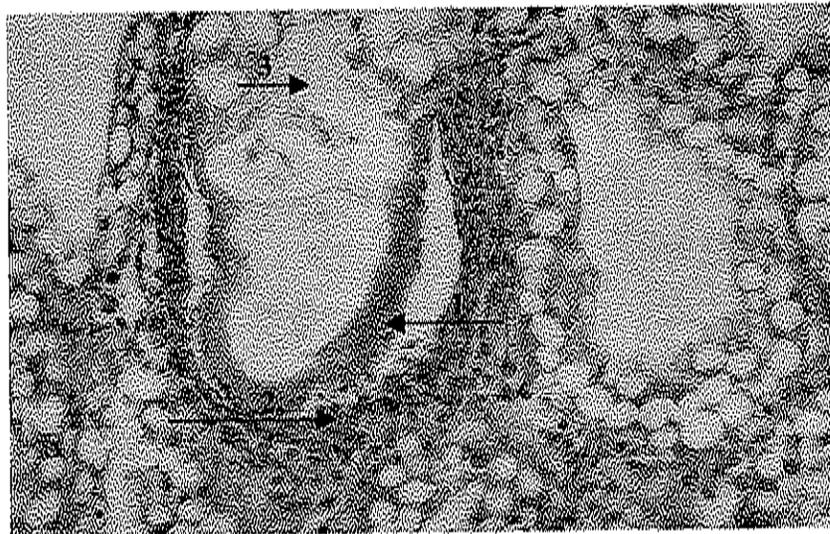


Figura 18.- Hepatopáncreas de un organismo perteneciente al lote A donde se muestra granuloma melanizado en un túbulo (1), con infiltración hemocítica (2) y necrosis (3). (40X).

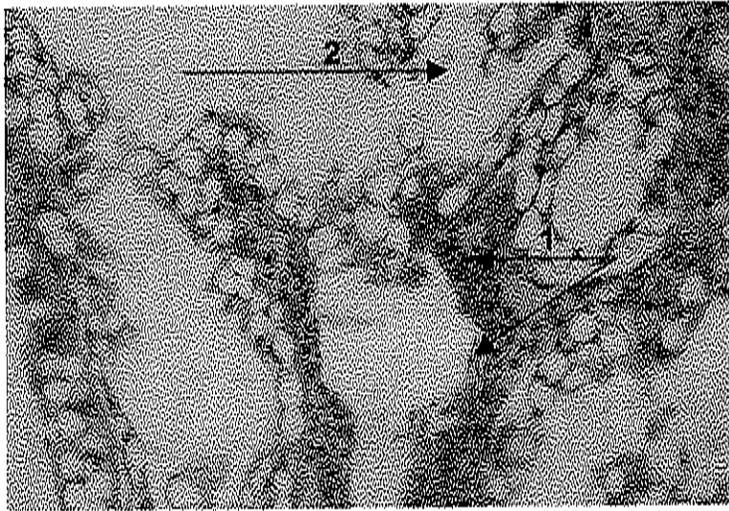


Figura 19.- Hepatopáncreas de un organismo perteneciente al lote C, donde se muestra infiltración hemocítica y necrosis (1), así como desprendimiento celular (2) (40X).

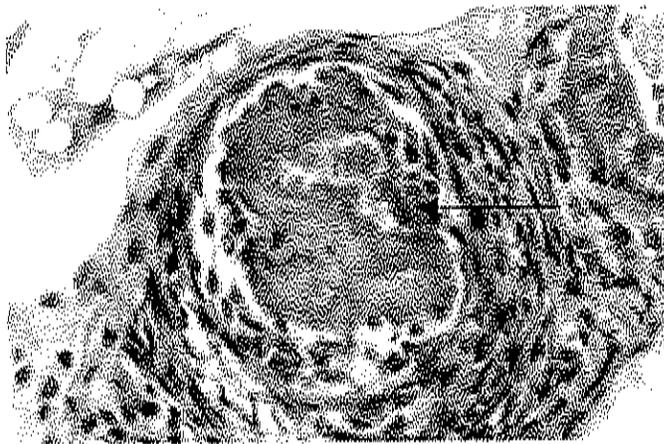


Figura 20.- Hepatopáncreas perteneciente a un organismo del lote C donde se muestra la formación de un nódulo hemocítico en la periferia del túbulo (60X).

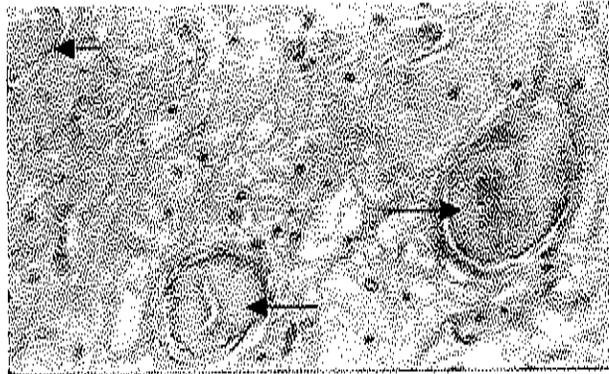


Figura 21.- Hepatopáncreas de un organismo del lote C donde se muestra la formación de nódulos hemocíticos con melanización y autólisis (60X).

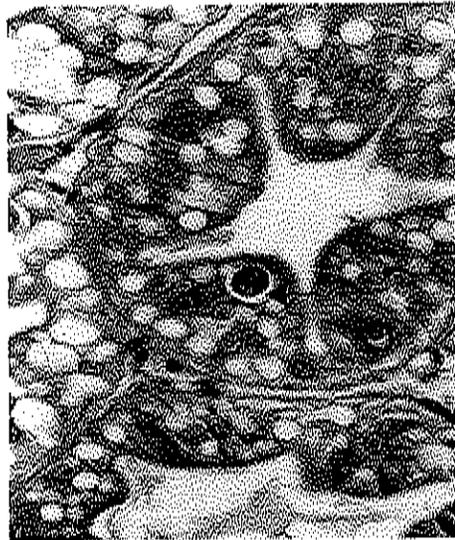


Figura 22.- Hepatopáncreas de un organismo del lote D que muestra un núcleo hipertrofiado parecido a un cuerpo de inclusión de HPV (60X).

Tabla 4.- Resumen de las patologías encontradas en los diferentes organismos analizados y prevalencias de HPV encontradas.  
(Total organismos analizados=120).

Lote	Características macroscópicas	Histopatología	Hibridación (prevalencia) %
A	Necrosis cuticular, urópodos negros c/ edema, cromatóforos expandidos, sin reflejo escapatorio. Atrofia del hepatopáncreas	Núcleos hipertrofiados, cromatina marginal y adelgazamiento de túbulos del hepatop. Infiltración hemocítica.	22.5
B	Expansión de cromatóforos, ligera, algunas antenas rotas.	No se detectaron problemas.	5.0
C	Expansión de cromatóforos ligera, algunas antenas rotas (apariencia sana)	Infiltración hemocítica, inicio de formación de nódulos, atrofiado de túbulos y necrosis de algunas regiones del hepatopáncreas.	60
D	Expansión de cromatóforos, pleópodos amarillos, signos de estrés.	Infiltración hemocítica, formación de nódulos, melanización, atrofia de células del hepatopáncreas. Posibles cuerpos de inclusión de HPV.	60
H	No hubo	Posibles cuerpos de inclusión de HPV.	50

## DISCUSIÓN.

### Organismos analizados y sus características externas.

La colecta de organismos se realizó al azar, documentándose las diferentes características externas observadas tanto en organismos silvestres como cultivados. Los lotes de organismos cultivados mostraron una clara diferencia al presentar en la mayoría de los casos variadas características externas que pudiesen asociarse a enfermedad. En cambio las observaciones macroscópicas de los organismos silvestres, mostraron una apariencia sana. La diferencia en apariencia de los dos grupos de organismos puede ser, como se sabe, debido al bajo estrés en el que se encuentra un camarón en su medio natural, a diferencia de aquellos que viven en cautiverio, y que en la mayoría de los casos pueden llegar a convertirse en organismos portadores, sin que necesariamente llegue el patógeno a representar peligro para su salud. Coincidentemente se pudo observar que en el lote H, se presentó un porcentaje elevado de organismos infectados con HPV detectado mediante la sonda, sin embargo la apariencia externa de los camarones era sana. En este caso no se puede saber si en algún momento esos organismos pudieran desarrollar alguna patología relacionada con el virus, sin embargo, es probable que fueran portadores asintomáticos el resto de su vida. Esto coincide con lo reportado por varios autores que afirman que la enfermedad de HPV no tiene signos externos característicos (Ligtner & Redman, 1985; Pantoja 1999). Este último reporta que la ausencia de signos externos específicos de HPV ha sido una de las razones por las cuales no se le ha prestado la debida atención.

Aún cuando los lotes de camarón cultivado presentaron características externas de enfermedad y los silvestres no, no se encontró relación entre éstas y la presencia del virus detectado mediante la sonda.

#### Análisis histopatológico.

En el análisis histopatológico de la mayoría de los organismos se observaron anomalías a nivel tisular en el hepatopáncreas tales como desprendimiento celular, infiltración de hemocítica, núcleos hipertrofiados, cariorrexis y necrosis en algunas regiones del órgano. Sin embargo, no fue clara la observación de los característicos cuerpos de inclusión de HPV, y en los casos donde se observaron dichos cuerpos, no se pudo apreciar con claridad el desplazamiento del nucleolo.

Los camarones del lote A provenientes de una granja de Sinaloa, se encontraron en mal estado, tanto en lo que a sus características externas se refiere, como en el análisis histopatológico del hepatopáncreas (núcleos hipertrofiados y adelgazamiento de las paredes tubulares del hepatopáncreas, presencia de granulomas y desprendimiento celular de células picnóticas). En este lote, aún cuando los resultados de dot blot demostraron la presencia del genoma viral en un 22.5%, no se encontraron los característicos cuerpos de inclusión viral.

En los lotes C y D también se encontraron anomalías en el hepatopáncreas; tales como desprendimiento celular y formación de nódulos hemocíticos, pero a diferencia del lote A, los porcentajes de organismos positivos mediante la sonda fueron más altos, alcanzando el 60% para ambos casos. En estos lotes se observó una baja presencia de posibles cuerpos de

inclusión de HPV, sin embargo, tampoco se pudo observar en ellos el característico desplazamiento del nucleolo. Una posible explicación de la ausencia de cuerpos de inclusión viral, es debido a la sensibilidad de la técnica, lo cual significaría que se pueden detectar partículas de ADN viral en concentraciones tan bajas, que aún no son capaces de formar dichos cuerpos.

El desplazamiento del nucleolo en las células donde se encuentran los cuerpos de inclusión de HPV se considera una característica importante (Lightner, 1996). Sin embargo, mucho depende del corte histológico y de la orientación al microscopio. Resulta casi imposible pensar que la observación del cuerpo de inclusión siempre va a ser desde el ángulo correcto, pues no existe ningún dato publicado que reporte algún patrón de acomodo de éstos que pudiera indicar un corte adecuado para una mejor observación. Por otro lado, la baja presencia de cuerpos de inclusión en las laminillas observadas, también es un factor que limitó la observación de cuerpos característicos pues en ningún campo microscópico observado se encontró mas de un cuerpo de inclusión.

El lote H de camarón silvestre mostró una prevalencia de HPV del 50% mediante la técnica de dot-blot. A pesar de ello la presencia de cuerpos de inclusión fue baja, sólo el 5% de los organismos positivos para HPV, presentaron los característicos cuerpos de inclusión viral. Esto respalda lo mencionado anteriormente, pues aún cuando el virus está presente en el organismo, no es fácil su detección mediante análisis histopatológico. Por lo cual es importante contar con herramientas moleculares para realizar un diagnóstico confirmativo.

Además de las razones mencionadas anteriormente para explicar las posibles causas de falta de correlación entre las observaciones histológicas y

los resultados de dot-blot, se pueden mencionar que aún cuando los camarones analizados por ambas técnicas pertenecían al mismo lote, los organismos analizados por una y otra técnica no fueron los mismos. Debido a esto cabe la posibilidad de que un organismo procesado por dot blot fuera positivo al virus, pero no así el procesado por histopatología. Otra posibilidad es por ejemplo, en el lote H, donde a pesar de que el porcentaje de organismos positivos para HPV detectados con la sonda fue del 50%, los organismos se encontraban aparentemente sanos, probablemente no había las suficientes condiciones de estrés para que el camarón desarrollara la enfermedad.

En el caso de los lotes C, D y H donde las prevalencias de HPV fueron altas (del 50 al 60%), se observaron algunos posibles cuerpos de inclusión de HPV mientras que, en los lotes A y B que presentaron prevalencias del 22.5 y 5.0 %; respectivamente, no se observaron posibles cuerpos de inclusión. Es decir, entre mayor fue la prevalencia encontrada, se incrementó también la posibilidad de encontrar cuerpos parecidos a HPV.

Considerando que la técnica de dot blot es cualitativa y no cuantitativa y aunque el porcentaje de camarones infectados es elevado en algunos casos, esto no es indicativo del grado de infección. Por lo que no se sabe si la infección con HPV es lo suficientemente severa para formar los cuerpos de inclusión asociados al virus. Además la histología es una herramienta de gran utilidad para la descripción de un diagnóstico patológico pero no garantiza la detección del virus en organismos con infecciones ligeras (Lightner, *et al.*, 1994).

Es importante resaltar que el hepatopáncreas de los camarones es un órgano muy activo que se encuentra en constante cambio debido a los procesos fisiológicos del organismo (Robertson *et al.*, 1987). Durante dichos

procesos, la morfología de las células experimentan diferentes fases de desarrollo (Al-Mohanna & Nott, 1989), lo cual puede en ocasiones dar lugar a la formación de cuerpos extraños que nada tienen que ver con un proceso de infección.

El proceso de fijación puede ser un factor determinante en un análisis histopatológico. En el caso particular del lote A, algunos de los organismos presentaron lisis en la parte central del hepatopáncreas debido a una inadecuada fijación. Esto pudo causar la pérdida de la estructura celular y tisular y con ello disminuir la posibilidad de encontrar dichos cuerpos.

#### Replicación de bacterias transformadas.

Para la replicación de bacterias transformadas se tuvo que realizar una búsqueda de aquellas cepas que conservaran tanto el plásmido como el inserto correspondiente a HPV. El empleo de un medio LB con ampicilina fue de gran utilidad ya que permitió recuperar únicamente las bacterias de interés, debido a que el plásmido PUC19 contiene un gen que codifica para la resistencia a este antibiótico, de tal manera que si las bacterias por algún motivo perdían el plásmido, no podían tener crecimiento. Se utilizó la electroforesis para visualizar la presencia del fragmento.

Para lograr recuperar a las bacterias en su fase exponencial de crecimiento se probaron varios tiempos de incubación, encontrando un crecimiento óptimo entre 10 y 12 horas. Esto permitió la selección de bacterias para un mejor rendimiento en el momento de la recuperación de los plásmidos, en este paso, solo en algunas alícuotas se logró recuperar el inserto de HPV. Durante el proceso de recuperación del plásmido y del fragmento genómico

para la producción de la sonda, se presentaron algunos problemas debido a la pérdida del inserto, entre los principales factores que pudieran haber contribuido a esto destacan: cambios bruscos de temperatura lo cual puede ocasionar que la bacteria muera perdiendo así su capacidad para reproducirse, que siga viva y pueda replicarse pero sin el plásmido o finalmente, que el vector plasmídico pierda algún sitio de restricción dificultando así la recuperación del inserto (Farrel, 1993).

La electroforesis además de corroborar la presencia del inserto, permitió hacer una estimación aproximada de la cantidad de ADN recuperado para la optimización de la reacción de digestión.

#### Digestión enzimática.

La digestión enzimática que se realizó para separar el vector plasmídico del inserto de HPV no mostró mayor problema. Aunque el protocolo marca tiempo y temperatura; con algunas variaciones en el tiempo de incubación se pudo optimizar la reacción. Esta variación en los tiempos se eligió de acuerdo a la cantidad de plásmido a digerir por lo que siempre se hizo una previa cuantificación.

La falta de un espectrofotómetro o un fluorómetro para la cuantificación del ADN obligó a utilizar la técnica de electroforesis, dificultando en ocasiones el proceso pues además de que el tiempo empleado es mayor, la cuantificación no se realiza con exactitud. Esto provocó en ocasiones tanto subestimación como sobreestimación de algunas reacciones de digestión y marcaje.

### Recuperación del fragmento.

El principal problema que se presentó al realizar la extracción del inserto de HPV del gel de electroforesis preparativa fue la pérdida del producto. Esto se pudo observar mediante la cuantificación del ADN después de la extracción de la agarosa. Se probaron dos métodos diferentes de extracción: Sigma y Boehringer Mannheim, en ambos casos hubo una considerable pérdida de ADN. Esta baja eficiencia de recuperación del fragmento fue una variable que nunca se pudo eliminar, y dio como resultado una merma en la cantidad de ADN disponible para el marcaje con digoxigenina.

Existen varios factores que pudieron haber dado lugar a esta pérdida de ADN. Dentro de estos se puede mencionar que los residuos del etanol contenido en las soluciones de lavado no hayan sido bien removidos y éste interfiera en reacciones posteriores, un pH ácido en la solución de elución (ésta debe estar entre 8 y 8.5) que de igual manera interfiera en las reacciones. Sin embargo, una de las posibilidades más factibles pudo ser una elevada cantidad de agarosa que haya sido removida eficientemente con los reactivos, y estos residuos estuvieran causando interferencia en las reacciones posteriores. Una forma de disminuir este riesgo es emplear agarosa de bajo punto de fusión. La posibilidad de que el tamaño del fragmento haya sido inadecuado para esta técnica queda descartada, pues el protocolo describe que esta metodología puede ser utilizada con fragmentos que van desde 400 hasta 5000 pb (Boehringer Mannheim, 1998). El fragmento a recuperar en este trabajo fue de 1800 pb y debido a los anterior se recomienda la utilización de agarosa de bajo punto de fusión, para evitar que se vayan residuos tanto de la matriz de sílica así como sales y proteínas en la solución de ADN, los cuales pueden ser inhibidores para posteriores reacciones enzimáticas. Otra opción para solucionar este problema puede ser el emplear otro sistema de purificación de

agarosa, por ejemplo los sistemas de extracción de ADN de Qiagen han dado muy buenos resultados para el caso de muestras que presentan gran cantidad de pigmentos, como son las larvas de camarón que contienen pigmentos en los ojos. Sin embargo esta técnica no fue probada en la extracción de ADN de hepatopáncreas debido al desconocimiento de ella. Por lo tanto pudiera probarse la técnica de Qiagen para purificación de agarosa, donde el protocolo especifica que no se necesita utilizar otra agarosa que no sea la convencional y específica no tener limitaciones con respecto a la concentración de agarosa empleada.

Los periodos de exposición a la luz ultravioleta en el momento de cortar el gel y la longitud de onda empleada son factores que pueden influir en la calidad de ADN, ya que prolongados periodos de exposición a una longitud de onda corta intervienen en el rompimiento del ADN. En este trabajo los tiempos de exposición se trataron de reducir al máximo, empleando longitud de onda corta sólo para la observación del fragmento, y longitud de onda larga en el momento del corte, para evitar la ruptura de las cadenas de ADN (Farrel, 1993). Sin embargo, la corta experiencia en el manejo de estas técnicas pudo dificultar el manejo y aumentar así dichos tiempos de exposición, dando como resultado pérdidas en el producto de la extracción.

#### Marcaje con digoxigenina.

A pesar de haber varios métodos utilizados para el marcaje de sondas, la digoxigenina ha mostrado dar buenos resultados y es actualmente el tipo de marcaje más empleado en las técnicas moleculares aplicadas al diagnóstico de enfermedades de camarón. Para el marcaje se probaron diferentes tiempos de incubación para obtener el mayor rendimiento posible. El éxito en el marcaje dependió en gran medida tanto de la eficiencia de incorporación de la

digoxigenina al ADN, así como de la cantidad de ADN disponible. Se trató de tener una reacción eficiente sin embargo, en algunos casos se tuvo una baja cantidad de ADN con alta eficiencia de incorporación de la digoxigenina, lo cual dio como resultado una buena sonda; contrario a esto, hubo ocasiones en que la cantidad de ADN disponible era alta pero la incorporación de digoxigenina fue baja, esto resultó en una sonda no muy funcional posiblemente debido a la competencia por el sitio de hibridación entre el ADN marcado y el ADN no marcado; por último, en el peor de los casos se tuvo una baja cantidad de ADN con baja incorporación de digoxigenina, lo cual dio como resultado una sonda de mala calidad que no funcionó. Debido a esto cabe resaltar la importancia de realizar la cuantificación no solo del ADN presente en la reacción, sino también de la eficiencia de incorporación de la molécula de marcaje antes de su utilización. Esta última es la que indicó la cantidad de sonda marcada, disponible para la hibridación.

La cuantificación de digoxigenina incorporada, permitió conocer la concentración a la cual se debe utilizar la sonda, a manera de dar una mejor interpretación al resultado de hibridación. Esto siempre y cuando la técnica sea manejada cuidadosamente. Una prueba preliminar con el fin de corroborar el buen funcionamiento de ésta y la utilización de controles positivos y negativos, son importantes para un diagnóstico confiable.

#### Aplicación de la sonda mediante la técnica de dot-blot.

Los cinco lotes analizados en este trabajo resultaron ser positivos para el virus de HPV detectado mediante la técnica de dot-blot. Las prevalencias fueron variadas en los cinco lotes. El virus se encontró en porcentajes elevados, del 60 % para C y D, así como para el lote H con un 50 %. El lote A mostró una

prevalencia moderada del 22.5 % y el lote B una prevalencia baja del 5 %. Los altos grados de infección de algunos lotes coinciden con lo reportado por Hernández (2000), quien encontró prevalencias del 50% de HPV para camarones silvestres del estado de Nayarit.

Los resultados positivos para HPV obtenidos mediante esta técnica, no coincidieron en todos los casos con lo observado por histopatología. A pesar de que todos los lotes a excepción del H, presentaron daños tisulares en el hepatopáncreas, solo en dos de ellos (D y H) se observaron escasos cuerpos de inclusión parecidos a HPV. Cabe mencionar que estos dos últimos lotes fueron los que mediante dot-blot, presentaron las mas altas prevalencias de organismos infectados con HPV, 60 % y 50 %, respectivamente. No así en el lote C, donde se observó también una elevada prevalencia (60 %) pero no fue posible la observación de ningún cuerpo de inclusión parecido a HPV.

En este trabajo se pudo confirmar la presencia de HPV en organismos analizados de los estados de Sinaloa y Nayarit, tanto silvestres como cultivados para el periodo comprendido entre junio de 1997 y noviembre de 1998, que es cuando se realizaron los muestreos. La variación de prevalencias del virus de HPV encontradas entre los diferentes lotes indicaron el buen funcionamiento de la sonda.

Cabe mencionar que las técnicas de hibridación de ácidos nucleicos requieren de una adecuada estandarización así como del manejo estricto de las condiciones de hibridación y proceso de extracción de ADN, sobre todo en el caso de emplear tejidos como el hepatopáncreas debido a que la gran cantidad tanto de enzimas digestivas como de lípidos dificultan su manejo. En el caso de las enzimas, si la muestra no se trabaja en condiciones de baja temperatura, éstas terminan degradando rápidamente los tejidos y con ello el ADN tanto viral

como del organismo. En el caso de los lípidos, éstos impiden que el producto de la extracción de ADN sea cristalino dando, además de coloración al extracto, dificultad de manejo por el alto contenido de grasa. Todas estas condiciones manejadas cuidadosamente son las que conllevan a la obtención de resultados confiables en el análisis.

Un ejemplo de condiciones de manejo adecuadas para un buen dot-blot, es el grado de astringencia en los lavados de las membranas, ya que éste es un factor que permite una mejor eliminación de la sonda que no encontró su sitio de hibridación, reduciendo así el manchado de la membrana ("background"). Esto ayuda a lograr una mejor detección, siempre y cuando la exposición al cromógeno (NBT/BCIP para el caso de la fosfatasa alcalina), se lleve a cabo también en condiciones adecuadas. Los tiempos de exposición al NBT/BCIP pueden ser muy variables pues se observó que en ocasiones cuatro horas no fueron suficientes para una buena detección, como lo marca Boheringer Mannheim (1998), de tal modo que el incremento en el tiempo de incubación fue necesario para lograr la reacción. Este tiempo llegó a ser hasta de 16 horas para obtener así una señal positiva. El resultado fue satisfactorio solo cuando el bloqueo de la membrana se hizo correctamente, pues de lo contrario la membrana puede mancharse de tal manera que impida la observación de la reacción positiva.

El hepatopáncreas es un órgano que posee una gran cantidad de enzimas las cuales una vez que muere el organismo se descomponen con gran facilidad. Esto se debe principalmente a la presencia de nucleasas que se liberan de forma natural, y son capaces de fragmentar el ADN que esté a su paso (ya sea del camarón o del virus que se encuentre presente dentro de las células del camarón). En el caso de una fijación o preservación inadecuada, éstas nucleasas pueden ser liberadas y degradar una gran cantidad del ADN

viral, ocasionando así la disminución o pérdida total de este y dando lugar a un ineficiente análisis, tanto histopatológico como molecular, lo cual puede dar como resultado un falsa señal negativa. Es por ello que la adecuada fijación de los organismos a analizar es un paso indispensable en el diagnóstico de enfermedades de camarón.

El manejo individual de los organismos, así como la elaboración de una serie de diluciones de cada muestra permitió en el primer caso, conocer con más precisión la prevalencia de Individuos infectados, y en segundo lugar corroborar que la señal era fidedigna y no ocasionada por algún tipo de contaminación de la membrana. Estos dos factores contribuyen a la confiabilidad de los resultados.

Un resultado interesante en este trabajo, fue la estandarización y evaluación de la técnica de detección por quimioluminiscencia. Aplicando ambas técnicas; colorimétrica y quimioluminiscente. En uno de los lotes analizados al cual se le aplicaron ambas técnicas, se pudo observar que la segunda presentó mayor sensibilidad que la primera como se encuentra reportado por Wilkinson (1992). Un factor que puede ser determinante para la elección entre estas dos técnicas es que aunque la quimioluminiscente es más sensible, requiere de un cuarto oscuro y material fotográfico para su revelado, lo cual puede ser un inconveniente si no se cuenta con ello. Mientras que la colorimétrica se puede realizar en el laboratorio sin necesidad de instalaciones especiales. Sin embargo, en el caso particular del virus de HPV, existe un factor adicional que debe tomarse en cuenta, y es que el hepatopáncreas es un tejido que presenta muchos pigmentos, los cuales, en la mayoría de los casos permanecen en el ADN extraído, de tal manera que pueden llegar a teñir la membrana fácilmente y confundirse con falsos positivos al ser detectada mediante colorimetría. En este caso la quimioluminiscencia presenta una

ventaja adicional debido a que la detección se lleva a cabo mediante la emisión de fotones sobre una placa fotográfica, de tal modo que aún cuando la membrana se encuentre contaminada con tejido del camarón esta contaminación jamás aparecerá sobre la placa de revelado en la cual solo se observará la emisión de fotones producto de una hibridación que indica una reacción positiva al virus.

Es importante resaltar que aunque en México se sabe de la existencia de HPV, existen pocos datos publicados. En el transcurso de los 90's HPV era comúnmente reportado en diagnósticos hechos a camarones pertenecientes tanto a granjas de engorda como al medio silvestre. Sin embargo, para finales de esta década y principios del 2000, los reportes de este virus en México han disminuido notablemente hasta convertirse en uno de los menos mencionados, a excepción de algunos reportes aislados que no han sido publicados. Por otro lado, las técnicas moleculares se han ido perfeccionando en los últimos años, y actualmente son utilizadas como herramienta de diagnóstico. Tomando en cuenta esto, cabe la posibilidad de que en la disminución de reportes de HPV en México, pueda influir el hecho de que no todos los laboratorios que realizan diagnóstico cuentan con sondas para detectar este virus. Ya que como se observó tanto en este trabajo como en el de Hernández (2000), los resultados positivos para HPV en análisis histopatológico pueden en algunos casos, estar subestimados al no corroborarse con una técnica molecular.

Por otro lado, es importante resaltar que el desarrollo de estas técnicas debe ser aplicado para el control de las enfermedades virales de camarón, incluso de aquellas que no se han reportado como causantes de altas mortalidades. Un ejemplo de estas enfermedades que han sido subestimadas en México es el de HPV, pues aparentemente no ha causado problemas al sector acuícola, sin embargo, las altas prevalencias encontradas en este

trabajo, deberían alertar en cuanto a un posible impacto de las poblaciones silvestres. Aún cuando la prevalencia y severidad del virus sean bajas en las poblaciones, esto no garantiza la susceptibilidad del organismos a desarrollar la enfermedad, a transmitirla o en dado caso a presentar el camarón una mayor susceptibilidad de contraer alguna otra enfermedad.

Este impacto puede verse reflejado principalmente en afectaciones importantes del hepatopáncreas, ya que una prevalencia del 50 al 60 % en una población silvestre es bastante elevada.

Al igual que HPV, hay muchos virus de los cuales poco se conoce, y que probablemente estén siendo introducidos a los medios de cultivo sin ningún control.

Aunado a lo anterior, es conveniente que los laboratorios de diagnóstico que manejan estas técnicas no dependan únicamente de los "kits" comerciales que existen en el mercado. Pues aunque estos son una buena opción para el diagnóstico, es importante tomar conciencia de la importancia que tiene el desarrollo de material molecular, ya que ayuda a tener mayor control sobre el manejo de los resultados y así lograr perfeccionar cada vez mas estas herramientas de trabajo. Por otro lado esto puede resultar en una independencia tecnológica enfocada al mejoramiento tanto de la investigación como del servicio que se puede brindar a una actividad socioeconómica tan importante en México, como es la camaronicultura.

## CONCLUSIÓN

Las sondas moleculares han demostrado ser una buena opción a utilizar para la detección de patógenos en camarón. La posibilidad de aplicarlas en diferentes técnicas permite considerarlas dentro de las diferentes estrategias de prevención, diagnóstico y control de virus y enfermedades virales.

La técnica de hibridación en soporte sólido es una buena herramienta de diagnóstico para la detección de HPV, y otras enfermedades virales en camarón, que puede dar un diagnóstico confirmativo en infecciones tempranas. El dot blot aunque es una prueba cualitativa y no cuantitativa, bajo condiciones estrictas se puede determinar un relativo grado de infección.

El análisis histopatológico mostró algunas patologías en el hepatopáncreas que coinciden con una señal positiva para HPV mediante hibridación en soporte sólido solo en el caso de infecciones de moderadas a severas, sin embargo no se pudieron detectar con claridad los cuerpos de inclusión característicos. Esto debido probablemente a la sensibilidad de las sondas, ya que estas pueden detectar la presencia del agente viral antes de que éste llegue a ser evidente mediante un corte histológico.

La histopatología en combinación con las técnicas moleculares son de gran utilidad en el diagnóstico de enfermedades virales de camarón.

Se observó una elevada prevalencia del virus de HPV en camarones peneidos de la región noroeste de México en poblaciones silvestres y cultivadas, durante el periodo de junio de 1997 y octubre de 1998.

El desarrollo de técnicas moleculares puede ser una de las mejores alternativas para la detección de virus en camarón, sin embargo es importante la adecuada estandarización en cada laboratorio donde se vayan a implementar para obtener resultados confiables y de utilidad para la industria acuícola. Esto es algo importante, sobre todo si consideramos la problemática por la que está pasando actualmente la camaronicultura debido a brotes infecciosos no solo de HPV sino de otros virus y bacterias.

## LITERATURA CITADA.

- Abubakr, M.A. 1991. Studies on the functional morphology of the decapod larval gut in relation to diet. Ph.D. tesis. School of Ocean Science, University College of North Wales, United Kingdom. 132 pp.
- Abubakr, M. A. & D.A. Jones. 1992. Funtional Morphology and ultrastructure of the anterior mid-gut diverticulae of larvae of *Penaeus monodon*. Fabricius, 1798 (Decapoda, Natantia). *Crustaceana*, 62: 142-158.
- Adiyodi, K.G. & R.G. Adiyodi. 1970. Endocrine control of reproduction in Decapod crustacea. *South India Biological Reviews*, 45: 121-165.
- Al-Mohanna, S.Y 1991. Studies on the functional morphology of the decapod larval gut in relation to diet. Ph.D. tesis. School of Ocean Science, University College of North Wales, United Kingdom, p. 11-65.
- Al-Mohanna, S.Y. & J.A. Nott. 1987. R-cell and digestive cycle in *Penaeus semisulcatus* (Crustacea: Decapoda) *Marine Biology*, 95: 129-137.
- Al-Mohanna, S.Y. & J.A. Nott. 1989. Funtional cytology of the hepatopancreas of *Penaeus semisulcatus* (Crustacea: Decapoda) during the moult cycle. *Marine Biology*, 18: 535-544.
- Bell, T.A & D.V. Ligtner. 1988. A handbook of normal penaeid shrimp histology. World Aquaculture Society, Baton Rouge. U.S.A. 114 pp.
- Blood, R. & C. Studdert. 1988. Baillière's Comprehensive Veterinary Dictionary. Carling R.C.J.(ed). Bailliere Tindall. London, U.K. 1123 pp.

- Bonami, J.R., M. Berlin, J. Mari, B. Trumper & D.V. Lightner. 1990. Purification and characterization of the infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus of penaeid shrimps. *Journal General Virology*, 71: 2657-2664.
- Bonami, J.R., J. Mari, B.T. Poulos & D.V. Lightner. 1995. Characterization of hepatopancreatic parvo-like virus, a second unusual parvovirus pathogenic for penaeid shrimp. *Journal General Virology*, 76: 813-817.
- Bonami, J.R., K.W. Hasson, J. Mari, B.T. Poulos & D.V. Lightner. 1997. Taura syndrome of marine penaeid shrimp: Characterization of the viral agent. *Journal General Virology*, 78: 313-319.
- Chou, H.Y., C.Y. Huang, C.H. Wang, H.C. Chiang & C.F. Lo. 1995. Pathogenicity of a baculovirus infection causing white spot syndrome in culture penaeid shrimp in Taiwan. *Diseases Aquatic Organisms*, 23:165-173.
- D'Abramo, L., E. Conklin & M. D. Akiyama. 1997. Crustacean Nutrition. In: Louis R., D'Abramo, E. Douglas, E. Conklin & M.D. Akiyama (eds). *Advances in World Aquaculture*, 587 pp.
- Espinoza de los Monteros, J. & U. Lubarta. 1988. *Patología en Acuicultura* Comisión Asesora de Investigación Científica y Técnica. Madrid, España. 550 pp.
- Farell, R. E. 1993. *RNA methodologies*. Academic Press, Inc. San Diego, U.S.A. 317 pp.

- FIRA. 1996. Elementos de análisis de las cadenas productivas de camarón. FIRA. Documento técnico. México. p. 7-44 p.
- Hasson, K.W., D.V. Lightner, B.T. Poulos, R.M. Redman, B.L. White, J.A. Brock & J.R. Bonami. 1995. Taura syndrome in *Penaeus vannamei*: Demonstration of a viral etiology. *Diseases of Aquatic Organisms*, 23: 115-126.
- Hasson, K.W, D.V. Lightner, R.M. Redman, L.L. Mohny, B.T. Poulos & B.M. White. 1998. The Taura syndrome virus (TSV) disease cycle in *Litopenaeus vannamei*. Colombia a la vanguardia de la camaronicultura sostenible. Cartagena, Colombia, 18 pp.
- Hernández, V. 2000. Prevalencia de las infecciones virales en el camarón blanco (*Penaeus vannamei*) de origen silvestre en el estado de Nayarit. Tesis de maestría. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. Mazatlán, Sinaloa. 89 pp.
- Kalagayan, H., D. Godin, R. Kanna, G. Hagino, J. Sweeney, J. Wyban & J. Brock. 1991. IHHN virus as an etiological factor in runt deformity syndrome (RDS) of juvenile *P. vannamei* cultures in Hawaii. *Journal World Aquaculture Society*, 22: 235-243.
- Kawase, S., S. Garzon, D.M. Su & P. Tijssen. 1991. Insect parvovirus diseases. In: Tijssen P. (ed) *Handbook of Parvoviruses*. CRC Press. Boca Raton, U.S.A. 213-218.

- Lester, R.J.G., P.J. Ketterer & J.L. Paynter. 1987. Intranuclear inclusion bodies in the hepatopancreas of the brown *Penaeus esculentus*. *Aquaculture*, 67: 238-239.
- Lighthner, D.V. 1990. Viruses section: Introductory remarks. In: F.O. & T. Cheng (eds). *Pathology in Marine Aquaculture*. Science Academic Press, p. 257-283 p.
- Lightner, D.V. 1993. Diseases of cultured penaeid shrimp. In: McVey (ed). *CRC Handbook of Mariculture: Crustacean Aquaculture*. CRC Press, Boca Raton, U.S.A, p. 293-346.
- Lightner, D.V. 1995. Taura Syndrome: An economically important viral disease impacting the shrimp farming industries of the Americas including the United States. *Proceedings of the Annual Meeting USAHA*. Reno, U.S.A p.12.
- Lighthner, D.V. 1996. A handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures for diseases of cultured penaeid shrimp. *World Aquaculture Society*, Baton Rouge, U.S.A. 93 pp.
- Lightner D.V., R.M. Redman, T.A. Bell & J.A. Brock. 1983. Detection of IHHN virus in *P. stylirostris* y *P. vannamei* imported into Hawaii. *Journal of the World Mariculture Society*, 14: 212-225.
- Lightner, D.V. & R.M, Redman. 1984. Intranuclear crystalline bodies in the hepatopancreas of the blue shrimp, *Penaeus stylirostris*. *Journal Invertebrate Pathology*, 43: 270-273.

- Lightner, D.V. & R.M. Redman. 1985. A parvo-like virus disease of penaeid shrimp. *Journal of Invertebrate Pathology*, 45: 47-53.
- Lightner, D.V & R.M. Redman. 1991. Host geographic range and diagnostic procedures for the penaeid virus diseases of concern to shrimp culturists. In: DeLoach, P., W.J. Dougherty and M.A. Davidson (eds). *Frontiers in Shrimp Research*, Elsevier Science Publishers B.V., Netherlands, p. 173-196.
- Lightner, D.V, R.M. Redman, R.M. Williams, T.A. Bell & R.B. Thurman. 1992. Geographic dispersion of the viruses IHHN, MBV and HPV as a consequence of transfers and introduction of the penaeid shrimp to new regions for aquaculture purpose. In: A. Rosenfield & R. Mann, (eds). *Dispersal of living organisms into aquatic ecosystems*. Maryland Sea Grant College, UM-SG-TS-92-01, College Park, MD, p. 155-173.
- Lightner, D.V., R.M. Redman, D.W. Moore & M.A. Park. 1993. Development and application of a simple and rapid diagnostic method to studies on hepatopancreatic parvovirus of penaeid shrimp. *Aquaculture*, 116: 15-23.
- Lightner D.V, B.T. Poulos, L. Bruce, R.M. Redman, L. Nunan, C. Pantoja, J. Mari & J.R. Bonami. 1994. Development and application of genomic probes for use as diagnostic and research reagents for the penaeid shrimp parvoviruses IHHNV and HPV and the baculoviruses MBV and BP. In: McIlwain TD, R. Pruder (eds). *USMSFP 10<sup>th</sup> Anniversary Review*, GCRL, Ocean Springs, Mississippi, Special Publication, 1: 59-85.
- Lightner, D.V & R.M. Redman. 1998. Strategies for the control of viral diseases of shrimp in the Americas. *Fish Pathology*, 33: 165-180.

- Lightner, D.V., R.M. Redman, B.T. Poulos, L.M. Nunan, L.H. Mohny, J.L. Mari, K.W. Hasson, C.R. Pantoja, K.T. Nelson, J.L. Zhou, Q. Wang, J. Garza & B.L. White. 1998. Viral diseases of shrimp in the Americas: diagnosis, distribution and control strategies. In: Jory, D.E. (ed). *Memorias del Primer Congreso Latinoamericano de Camaronicultura*. Panamá. Versión electrónica.
- Mari, J., D.V. Lightner, B.T. Poulos & J.R. Bonami. 1995. Partial cloning of the genome of an unusual shrimp parvovirus (HPV): use of gene probes in disease diagnosis. *Diseases of Aquatic Organisms*, 22: 129-134.
- Mialhe, E., V. Boulo, E. Bachere, D. Hervio, K. Cousin, D. Noel, T. Noel, M. Ohresser, R. M. le Deuff, B. Despres & S. Gendrau. 1992. Development of new methodologies for diagnosis of infectious diseases in mollusk and shrimp aquaculture. *Aquaculture*, 107: 155-164.
- Mohan, C.V., K.M. Shankar, S. Kulkarni & P.M. Sudha. 1998. Histopathology of cultured shrimp showing gross signs of yellow head syndrome and white spot syndrome during 1994. *Indian epizootics. Diseases of Aquatic Organisms*, 34: 9-12.
- Owens, L., S. De Beer & J. Smith. 1991. Lymphoidal parvovirus like particles in Australian penaeid prawns. *Diseases of Aquatic Organisms*, 11: 129-134.
- Pantoja, C.R. 1996. Principales enfermedades de camarón en México 1996. *Foro Internacional de Camaronicultura*. Mazatlán, Sinaloa. 1-3 agosto. Banco de México-FIRA, p. 1-11.

- Pantoja, C. 1999. Hepatopancreatic parvovirus of penaeid shrimp (HPV): Partial cloning and genome characterization, *in situ* hybridization at the ultrastructural level, geographic diversity and non-invasive detection. Ph.D tesis. Department of Veterinary Science and Microbiology, University of Arizona. Arizona, U.S.A, 159 pp.
- Paynter, J.L., D.V. Lightner & R.J.G. Lester. 1985. Prawn virus from juvenile *Penaeus esculentus*. In: Rothlisberg P.C., B.J. Hill, D.J. Staples (eds), Second Australian National Prawn Seminar. NPS2. Cleveland, Australia, p. 61-64.
- Perez-Farfante and Kensley. 1997. Penaeoid and sergestoid shrimps and prawns of the world. Keys and diagnoses for the families and genera. *Memories du Museum National d'Histoire Naturelle*, 175: 1-233.
- Poulos, B. T., D. V. Lightner & B. Trumper. 1994. Monoclonal antibodies to penaeid shrimp parvovirus, infectious hypodermal and hematopoyetic necrosis virus (IHHNV). *Journal of Aquatic Animal Health*, 6: 149-154.
- Robertson, L., W. Bray, Leung-Trujillo & A. Lawrence. 1987. Practical molt staging of *Penaeus setiferus* and *Penaeus stylirostris*. *World Aquaculture*, 18: 180-185.
- Rosas, C., Bolongaro-Crevenna, A. Sánchez, A.G. Gaxiola, L. Soto & E. Escobar. 1995. Role of digestive gland in the energetic metabolism of *Penaeus setiferus*. *Biological Bulletin*, 189: 168-174.
- Rosenberry, B. (Ed). 1997. World shrimp farming 1997. *Shrimp News International*. U.S.A. 284 pp.

- Rosenberry, B. (Ed). 2001. World shrimp farming 2001. Shrimp News International. U.S.A. 316 pp.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch & T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: A laboratory manual. 2<sup>a</sup> Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. U.S.A.
- SEMARNAP. 2000. Anuario Estadístico de Pesca, 1999. Versión Electrónica. México, D.F.
- Spann, K.M, R.D. Adlard, D.A. Hudson, S.B. Pyecroft, T.C. Jones & M.O. Voigt. 1997. Hepatopancreatic parvo-like virus (HPV) of *Penaeus japonicus* cultured in Australia. *Diseases of Aquatic Organisms*, 31: 239-241.
- Sukhumsirichart, W. C., V. Wongteerasupaya , S. Boonsaeng, S. Panyim, S. Sriurairatana, B. Withyachumnarnkul & T.W. Flegel. 1998. Genome organization and detection of Hepatopancreatic Parvovirus (HPV) from *Penaeus monodon* in Thailand. In: Flegel T.W (ed). *Advances in shrimp biotechnology*. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok. Versión electrónica.
- Supamattaya, K., R.W. Hoffmann, S. Boonyaratpalin & P. Kanchanaphum. 1998. Experimental transmission of the white spot syndrome virus (WSSV) from black tiger shrimp *Penaeus monodon* to the sand crab *Portunus Pelagicus*, mud crab *Scylla serrata* and krill *Acetes*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 32: 79-85.

- Turnbull, J.F., P.E. Larkins, C. McPadden & R. Matondang. 1994. A histopatological disease survey of cultured shrimp in North East Sumatera, Indonesia. *Journal of Fish Diseases*, 17: 57-65.
- van Hulten, M.C.W., M.F. Tsai, C.A. Schipper, C.F. Lo, G.H. Kou & J.M. Vlak. 2000. Analysis of a genomic segment of white spot syndrome virus of shrimp containing ribonucleotide reductase genes and repeat regions. *Journal General Virology*, 81: 307-316.
- van Hulten, M.C.W., J. Witteveldt, S. Peters, N. Kloosterboer, R. Tarchini, M. Fiers, H. Sandbrink, R.K. Lankhorst & J.M. Vlak. 2001. The white spot syndrome virus DNA genome sequence. *Virology*, 286: 7-22.
- Vega-Villasante, F. & M. E. Puente. 1993. A review of viral diseases of cultures shrimp. *Preventive Veterinary Medicine*, 17: 271-282.
- Willkinson, D. G. 1992. *In situ* hybridization. A practical approach. IRL Press at Oxford University Press, New York, 163 pp.

## GLOSARIO

- ADN POLIMERASA.**- Enzima que sintetiza una nueva banda de ADN en la dirección 5' – 3' usando una banda antiparalela de ADN como molde.
- ANTICUERPO MONOCLONAL.**- Es producido a partir de un solo clon de células y posee una estructura y especificidad única.
- ARN.**- Polímero de nucleótidos conectados vía una fosfato-ribosa; relacionados en la síntesis de proteínas.
- ARNm.**- Molécula de ARN transcrita a partir del ADN que contiene la información genética necesaria para codificar a una proteína específica.
- ATROFIA.**- Falta de desarrollo normal de cualquier parte del cuerpo. Disminución del volumen de un tejido u órgano, con pérdida de su funcionalidad.
- CARIOPLASMA.**- Parte líquida que se forma en el núcleo de la célula en donde se encuentra suspendido el material genético.
- CATÁLISIS.**- Alteración de la velocidad de una reacción o un proceso sin modificar las condiciones del equilibrio.
- CLONACIÓN MOLECULAR.**- Aislamiento e incorporación de un fragmento de ADN dentro de un vector donde puede ser replicado.
- CUERPO DE INCLUSIÓN.**- Inclusión celular que puede ser redonda ovalada o irregular y se encuentra dentro del citoplasma o del núcleo de la célula, puede ser indicador de infección viral.
- CUERPO DE OCLUSIÓN.**- Matriz proteica que se encuentra envolviendo gran número de partículas virales o viriones dentro del citoplasma o núcleo de una célula.
- ENZIMAS DE RESTRICCIÓN.**- Enzimas que reconocen una secuencia específica en el ADN para realizar un corte.
- ELECTROFORESIS.**- Es la separación de moléculas cargadas dentro de un campo eléctrico.

**HAPTENO.-** Pequeña molécula orgánica o inorgánica que no tiene propiedades antigénicas pero puede estar ligada a una proteína y ser acarreada por ella.

**HIBRIDACIÓN.-** Formación natural o construcción artificial de una molécula doble de ácido nucleico por complementariedad de bases entre dos bandas de ácidos nucleicos derivadas de diferentes fuentes.

**HIPERTROFIA.-** Aumento exagerado del peso y tamaño de un órgano, tejido o parte del mismo, por el incremento de volumen de los elementos que lo constituyen.

**LÁBIL.-** Compuesto fácil de transformar en otro más estable.

**LISIS.-** Remisión lenta y progresiva de una enfermedad. Destrucción de las membranas celulares.

**MONOCISTRÓNICO.-** Es un mRNA que codifica a un polipéptido simple.

**PCR.-** (Reacción en cadena de la polimerasa del ADN). Método utilizado para amplificar *in vitro*, una secuencia específica de ADN a partir de primers específicos y la enzima ADN polimerasa.

**PLÁSMIDO.-** Elemento genético extracromosomal.

**POLIMERIZACIÓN.-** Es la combinación de una serie de compuestos simples para formar un polímero.

**POLICISTRÓNICO.-** Es un mRNA que codifica a varios polipéptidos.

**PRIMER.-** Es una molécula (generalmente un polinucleótido) empleada en la amplificación de fragmentos mediante PCR. Nombrada también Oligo.

**SONDA DE ÁCIDOS NUCLEICOS.-** Es una banda de ácido nucleico que es marcada y usada para hibridar a una molécula complementaria.

**TRADUCCIÓN.-** Síntesis de una proteína utilizando la información genética de un ARNm.

**TRANSCRIPCIÓN.**- Síntesis de una molécula complementaria de ARN a una de las dos bandas de una molécula de ADN.

**TRANSCRIPCIÓN REVERSA.**- Es el proceso de sintetizar una cadena de ADN a partir de un ARN haciendo una copia idéntica donde son substituidos los uracilos por timinas.

**UNIDAD ENZIMÁTICA.**- Es la actividad enzimática necesaria para cortar 1  $\mu\text{g}$  de DNA  $\lambda$  en una hora a 37 °C.

(Tomado de: Blood & Studdert, 1988)