



MECANISMOS DE DEFENSA DE LOS CAMARONES PENEIDOS DURANTE UN PROCESO INFECTIVO: UNA REVISIÓN

DEFENSE MECHANISMS OF PENAEID SHRIMP DURING THE INFECTIVE PROCESS: A REVIEW

Nora Cárcamo-Aréchiga^{1,2}, José Manuel Grijalva-Chon^{1*}, Jorge Hernández-López³, Alejandro Varela-Romero¹, Marco Antonio López-Torres¹, Luis Ángel Medina-Juárez¹

¹ Universidad de Sonora. Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas. Ave. Colosio s/n, entre Reforma y Sahuaripa, Col Centro. Hermosillo, Sonora, México 83000.

² Dirección permanente: Universidad Autónoma de Sinaloa. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Boulevard San Ángel S/N, Fraccionamiento San Benito. Culiacán, Sinaloa, México 80260.

³ Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. Laboratorio de Referencia, Análisis y Diagnóstico en Sanidad Acuícola. Calle Hermosa 101, Col. Los Ángeles. Hermosillo, Sonora, México 83106.

RESUMEN

La inmunidad de un organismo es el estado de resistencia natural o adquirida frente a una determinada enfermedad o al ataque de un agente infeccioso o tóxico. En el caso del camarón, ésta recae en la inmunidad innata, en donde los sistemas humoral y celular juegan papeles muy importantes en la defensa de los organismos. El proceso de defensa inicia en el exoesqueleto y si esta barrera es rebasada, el patógeno deberá sortear una serie de factores inmunes derivados de hemocitos y plasma y se generarán una serie de eventos para lograr su eliminación o desarrollar una enfermedad en el hospedero. De esta forma, se discute el papel de los hemocitos, la señalización y la fagocitosis, además de los procesos involucrados en la expresión de proteínas plasmáticas, la fenoloxidasas, la tripsina, la α 2-macroglobulina, la lisozima y los péptidos antimicrobianos.

Palabras clave: Patología, inmunología, cultivo de camarón, patógenos de camarón.

ABSTRACT

The immunity of an organism is the state of natural or acquired resistance against a particular disease or attack by an infectious or toxic agent. In the case of shrimp, defense lies in innate immunity, where humoral and cellular systems play important roles. The defense process begins at the exoskeleton and if this first barrier is exceeded, the pathogen must overcome a number of hemocytes and plasma derived immune factors and a series of events will be generated to achieve their elimination or developing a disease in the host. Thus, the role of hemocytes, signaling, and phagocytosis is discussed in addition to the processes involved in the expression of plasma proteins, phenoloxidase, trypsin, α 2-macroglobulin, lysozyme and antimicrobial peptides.

Keywords: Pathology, immunology, shrimp farming, shrimp pathogens.

INTRODUCCIÓN

La acuicultura juega hoy en día un papel primordial en el aporte de proteína animal de origen acuático para el

consumo humano (Reynaud, 2008). Entre los productos provenientes de la acuicultura, el camarón es uno de los de mayor utilización y ante el agotamiento de sus poblaciones silvestres, su cultivo (camaronicultura) satisface gran parte de su demanda. A nivel mundial, los crustáceos representan el 9.7% de la producción acuícola, precedidos por los peces de agua dulce y los moluscos, pero en cuanto a valor comercial ocupan la segunda posición, después de los peces (FAO, 2014).

De la familia Penaeidae, el camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) es la especie más cultivada en el hemisferio occidental, dado que su desarrollo larvario no presenta grandes complicaciones debido a que tolera amplios intervalos de salinidad y temperatura (Wyban *et al.*, 1995; Ponce-Palafox *et al.*, 1997; Manzo, 2000; McGraw *et al.*, 2002; Granja *et al.*, 2003; Brigs *et al.*, 2005) pero con diferentes repercusiones en la sobrevivencia dependiendo de la combinación salinidad-temperatura y de los agentes infecciosos involucrados en una epizootia (Vidal *et al.*, 2001; Guan *et al.*, 2003; Carbajal-Sánchez *et al.*, 2008; Le Moullac y Haffner, 2000; Rahman *et al.*, 2006, 2007; Phuoc, 2008; Wongmaneeprateep *et al.*, 2010; Navarro-Nava *et al.*, 2011; Moser *et al.*, 2012).

Existen varios agentes infecciosos que pueden comprometer seriamente la viabilidad de un cultivo, siendo los virus los patógenos de especial atención en el sector acuícola (Munro y Owens, 2007; Sánchez-Martínez *et al.*, 2007; Escobedo-Bonilla *et al.*, 2008; Sánchez-Paz, 2010; Rai *et al.*, 2012; Grijalva-Chon y Castro-Longoria, 2015) y las posibilidades de interacción en infecciones múltiples no son eventos raros en los sistemas de cultivo (Dhar *et al.*, 2002; Mouillessaux *et al.*, 2003; Natividad *et al.*, 2006; Phalitakul *et al.*, 2006; Ueda *et al.*, 2008; Stentiford *et al.*, 2009; Overstreet *et al.*, 2009; Martorelli *et al.*, 2010; Panichaeron *et al.*, 2011; Aranguren *et al.*, 2012). Es por eso que la salud de las especies acuáticas depende de la interacción entre el medio ambiente, los patógenos y el hospedador. Bajo un cultivo intensivo de camarón, las condiciones ambientales se pueden tornar adversas, causando estrés significativo a los organismos cultivados y un ambiente propicio para el desarrollo de una infección.

*Autor para correspondencia: José Manuel Grijalva-Chon
Correo electrónico: manuel.grijalva@unison.mx

Recibido: 05 de mayo de 2015
Aceptado: 23 de septiembre de 2015

Esta revisión hace una descripción de las principales armas de defensa con las que cuentan los camarones peneidos para hacer frente a un proceso infectivo.

Exoesqueleto

En insectos, la cutícula es la capa más externa secretada por la epidermis y se continua por el estomodeo, proctodeo y la tráquea, protegiendo por tanto, no solo la superficie externa, sino también las internas que son accesibles a invasores externos. Esta cutícula esclerotizada es una barrera contra heridas e invasión microbiana. Las cutículas están principalmente compuestas por quitina (polímeros de β -1,4 acetilglucosamina) y proteínas, éstas son reforzadas por esclerotización (Gupta, 1999).

En los crustáceos, la primera línea de defensa contra la invasión de los microorganismos está constituida por una cutícula rígida que actúa como una barrera física y consiste en un exoesqueleto rígido que protege de daños y ataques microbianos. El exoesqueleto está compuesto de carbonato de calcio y proteínas, y contribuye a diferentes procesos fisiológicos asociados con la respuesta inmune (Chappe-Bonichon, 2006; Aguirre-Guzmán *et al.*, 2009).

Proteínas plasmáticas

Los patógenos que logran cruzar a través de las partes protectoras del animal se encontrarán con una serie de factores inmunes derivados de hemocitos y plasma. Un primer paso crítico en cualquier respuesta inmune es el reconocimiento de los organismos invasores como extraños. Bacterias y hongos presentan en su superficie moléculas como polisacáridos y β -1,3 glucanos que son reconocidos como moléculas extrañas y producen una reacción inmune tanto en vertebrados como en invertebrados (Roux *et al.*, 2002). Además de otras funciones, el sistema de defensa de los invertebrados está fuertemente comprometido con la eliminación de patógenos. Por ello, las señales más importantes que ellos deben reconocer son las extrañas, presentes en la superficie de los patógenos.

En los camarones, los dos componentes microbianos que se ha demostrado que están involucrados en la estimulación de las funciones celulares son los lipopolisacáridos (LPS) y los β -glucanos. Aunque la interacción en ambos casos puede ser similar (directamente o a través de las proteínas plasmáticas), los marcadores celulares y los sistemas de activación son diferentes. Los componentes microbianos son capaces de activar las funciones celulares directamente, pero la participación de las proteínas plasmáticas mejora la eficiencia de la respuesta del sistema inmune. Estas proteínas, definidas como proteínas de reconocimiento, reaccionan a los componentes microbianos y también previenen la activación celular innecesaria o, si es necesario, incrementan la respuesta de las células efectoras.

Un primer grupo de proteínas de reconocimiento está constituido por aglutininas multivalentes de unión a azúcares, también llamadas hemoaglutininas o lectinas.

La segunda proteína de reconocimiento detectada en el plasma del camarón tiene la capacidad de reaccionar con los β -glucanos, y por ello es llamada proteína de unión a los β -glucanos (PUBG) (Vargas-Albores *et al.*, 1998). Las proteínas que reconocen a los LPS y β -1,3 glucanos son conocidas como proteínas de patrón de reconocimiento (PPR). Los receptores PPR son moléculas esenciales que tienen la habilidad para reconocer e iniciar los mecanismos de defensa del hospedero (Amparyup *et al.*, 2012).

En los crustáceos se han aislado y caracterizado en detalle varias PPR. Estas incluyen las PUBG, proteínas de unión a lipopolisacáridos y glucanos (PULG), algunas proteínas enmascaradas como homologas a proteinasa de serina (HPS) y un gran número de lectinas. Las PULG y los PUBG se unirán los 1-3 glucanos y después de esta unión dispararán las reacciones inmunes (Yu *et al.*, 2002; Yu y Kanost, 2002; Cerenius *et al.*, 2010).

En el camarón, el gen de las proteínas PULG se encontró sobreexpresado en los animales infectados con el virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV), lo que sugiere que PULG es una proteína de fase aguda inducible que puede jugar un papel crítico no solo en la patogénesis bacteriana y fúngica, sino también en la viral. La sub expresión de Profenoloxidasas (proFO) sugiere que el WSSV puede emplear una vía novedosa para regular la activación y/o actividad de la cascada de proFO para evadir las defensas del hospedador (Roux *et al.*, 2002).

Señalización

También las PUBG, que no están estructuralmente relacionadas a las PULG, son capaces de unirse a los β -1,3 glucanos y mediar reacciones inmunes, así como de prestarse a ser activadas por bacterias Gram negativas ya que estas son capaces de unirse a los LPS y después de esto mediar la activación del sistema proFO, fagocitosis, formación de nódulos y encapsulación. Las vías de señalización Janus quinasa (JAK) y el transductor de señales y activador de la transcripción (TSAT), los receptores tipo Toll (RTL) y la de deficiencia inmune (DIN) son vistas como las que regulan la respuesta inmune en los invertebrados. Así, la vía de señalización JAK-TSAT esta usualmente involucrada en la defensa antiviral ya que un estudio reciente sugiere que TSAT puede ser anexado por el WSSV para mejorar la expresión de un gen viral temprano inmediato en los camarones infectados.

Se ha demostrado que en un cultivo de células de órganos linfoides de camarones infectados, un TSAT activado era translocado del citoplasma al núcleo. Esto provee evidencia experimental de que el TSAT en camarones es activado en respuesta a una infección con WSSV. Estos resultados apoyan un hallazgo anterior de que el WSSV no interrumpe la vía JAK-TSAT, sino al contrario, beneficia la activación del TSAT en el camarón hospedero (Chen *et al.*, 2008). Li y Xian (2013) encontraron que la transcripción de TSAT en camarones era modulada después de una infección con WSSV, lo que sugiere que puede existir una vía JAK-TSAT putativa en los camarones y que puede ser muy importante en las infecciones virales.

Otros resultados sugieren que muchos mecanismos de defensa fueron inducidos sobre una infección con WSSV, incluyendo la activación del sistema proFO y de la vía de transducción de señales JAK-TSAT. Inversamente, el sistema de coagulación y la expresión de péptidos antimicrobiales son subexpresados en una infección con WSSV. Aun así, las respuestas dañan a la célula hospedadora así como al patógeno invasor y la regulación de las respuestas de defensa necesitan por tanto, ser algo sofisticadas (Mavrouli *et al.*, 2005).

Los receptores RTL son glicoproteínas de membrana que consisten en un ectodominio, abarcando repeticiones ricas en leucina (RRL) en tándem, un segmento que abarca membrana y un dominio citoplasmático de receptores Toll/interleucina1 (RTI). Ellos detectan microbios con base a los patrones moleculares asociados a patógenos (PMAP). Algunos RTL se expresan en la membrana celular y su ectodominio reconoce a los PMAP extracelulares, mientras que otros son expresados en endosomas para detectar a los PMAP internalizados (Rolland, 2010).

Los RTL han sido encontrados en cuatro especies de crustáceos, todos pertenecientes a la familia Penaeidae. Hay tres tipos de estos receptores y su localización celular es diferente: LvToll1 y LvToll3 están presentes tanto en citoplasma como en membrana, mientras que LvToll2 se restringe solo a citoplasma. Ellos están constitutivamente expresados en muchos tejidos incluyendo branquias, estómago, intestinos, nervios, músculo, ciego pilórico, espermario y epidermis, con menor nivel de expresión en pedúnculo ocular y hepatopáncreas (Yang *et al.*, 2007; Coscia *et al.*, 2011).

Sobre los cambios de expresión ante la presencia de *Vibrio alginolyticus* y WSSV, los tres LvTolls mostraron diferente respuesta: LvToll1 fue sobre expresado con ambos retos; LvToll2 fue sobre expresado únicamente con el reto de WSSV; y LvToll3 es sobre expresado en ambos retos como LvToll1, pero a distintos tiempos y también pueden estar involucrados en la fagocitosis (Coscia *et al.*, 2011). En *L. vannamei* con la proteína de interacción con TOLL (piLvToll) bloqueadas, los niveles de expresión de genes de proteínas antimicrobianas (PAM) de penaeidina 4 (PEN4) se incrementaba. Pero aún así, los niveles de mortalidad en los camarones con piLvToll bloqueado no fueron significativamente diferentes de los del grupo control, lo que sugiere que la piLvToll puede estar involucrada en una regulación negativa de las PEN4 y que la expresión de piLvToll puede ser respuesta a infecciones microbianas (Wang *et al.*, 2013).

Por otra parte, en las branquias, después de un reto con *V. alginolyticus*, LvToll1 era sobre expresado, pero LvToll2 y LvToll3 no mostraron cambios obvios. Las proteínas tipo Spätzle de *L. vannamei* (LvSpz tipo 1 y 2) fueron fuertemente inducidas por un reto contra *V. alginolyticus*, pero LvSpz2 únicamente mostró una leve sub expresión. En las branquias, después de un reto con WSSV, tanto LvToll1, LvToll2, LvToll3, LvSpz1 y LvSpz3 se sobre expresaron, pero LvSpz2 no mostró cambios, excepto por una leve sub expresión a las 12 horas post inyección de WSSV (Wang *et al.*, 2012).

La vía de señalización DIN es importante en la inmunidad de invertebrados ya que es visto como adaptador clave para unir las señales extracelulares e intracelulares (Feng *et al.*, 2014) y media la inmunidad contra bacterias Gram-negativas en *Drosophila*. Estudios recientes muestran que la vía DIN también involucra una respuesta inmune innata de tipo antiviral. Un estudio con ARN de transferencia mostró que la vía DIN está involucrada en la regulación de la expresión de tres tipos de genes, incluyendo las crustinas, factores anti lipopolisacárido y lisozima en camarones y cangrejo de río (Lan *et al.*, 2013).

Hemocitos

La comunicación y cooperación celular es necesaria para por lo menos una de las reacciones de defensa y ocurre cuando los microorganismos o parásitos son reconocidos y se monta una respuesta inmune. Por ejemplo, durante una infección por hongos, la PUBG en el plasma primero reconoce y se une a la pared celular del hongo. Luego, los hemocitos semigranulares y granulares responden al complejo PUBG/glucanos por degranulación, incluyendo la adhesión celular y proteínas opsoninas almacenadas en los gránulos. Finalmente, la liberación de las opsoninas puede estimular la fagocitosis por las células hialinas o la encapsulación por las células semigranulares. Las células granulares y semigranulares pueden ser citotóxicas y lisan las células eucarióticas extrañas (Johansson *et al.*, 2000). Los cambios en la expresión de estos genes están asociados con el estrés medioambiental y esto puede ser influenciado por variaciones en la abundancia relativa de diferentes poblaciones de hemocitos (De la Vega *et al.*, 2007).

Los hemocitos en los crustáceos son principalmente subdivididos en tres tipos de células: hialinas, semigranulares y granulares (Battistella *et al.*, 1996; Laxmilatha y Laxminarayana, 2004). Difieren no solo en sus características morfológicas, sino también bioquímicas y en su comportamiento *in vitro*. Las células hialinas son las más pequeñas, con un núcleo grande y central rodeado por citoplasma basofílico, escaso retículo endoplásmico y ribosomas; el aparato de Golgi puede estar ausente. Aunado a esto, no presentan gránulos distintivos y actividad de fenoloxidasas. *In vitro*, estas células desarrollan pseudópodos y fácilmente se adhieren y se dispersan en las superficies de vidrio. Son capaces de fagocitosis en crustáceos (Battistella *et al.*, 1996), con un tamaño promedio de $3.35 \times 4.76 \mu\text{m}$. Son de ovoides a esféricos con cromatina nuclear dispersa. El núcleo ocupa gran parte de la célula, es generalmente ovoide y la relación núcleo-citoplasma es normalmente alta. La envoltura nuclear es lisa y las inclusiones citoplasmáticas son pocas o ausentes, el retículo endoplasmático liso y rugoso es raramente visto en este tipo de hemocitos: los agranulocitos muestran pocas señales de diferenciación (Laxmilatha y Laxminarayana, 2004).

Las células semigranulares son transicionales entre las células hialinas y granulares. Tienen un núcleo esférico, bilobulado y central o excéntrico, así como ribosomas libres, retículo endoplásmico, dos o más aparatos de Golgi

y numerosos gránulos eosinofílicos pequeños. Estas células son muy inestables *in vitro* y requieren manejo delicado, de otra manera rápidamente se lisan y liberan su contenido. Una característica importante de las células granulares y semigranulares de los crustáceos es la presencia, dentro de los gránulos, de proFO, responsables de la síntesis de melanina. Las células semigranulares reaccionan a los polisacáridos microbiales, como a los lipopolisacáridos y los β -1,3 glucanos por una respuesta de degranulación y liberación del sistema proFO (Battistella *et al.*, 1996). Son ovoides o en forma de huso, algunas veces irregulares, con un tamaño promedio de $4.16 \times 7.18 \mu\text{m}$.

Otra característica importante de las células semigranulares es la presencia de gránulos citoplasmáticos, más numerosos que en los agranulocitos. Estas inclusiones usualmente son mucho más pequeñas que las encontradas en los granulocitos densos, y miden aproximadamente $0.043 \mu\text{m}$. El núcleo en este tipo de hemocitos es también de varias formas, pero no ocupa el volumen celular completo. Presenta numerosas regiones de heterocromatina densa y empacada alrededor y dentro de la envoltura nuclear. En algunos casos, el núcleo es muy reducido y el retículo endoplasmático rugoso es más desarrollado. También se aprecian vesículas secretoras con contenido electrodenso y mitocondrias (Laxmilatha y Laxminarayana, 2004).

El tercer tipo de hemocitos son los granulares; son los más grandes y tienen un núcleo pequeño, excéntrico y bilobulado. Casi siempre está presente un aparato de Golgi. Alrededor del núcleo y a lo largo de la periferia celular, están los retículos endoplásmicos lisos y rugosos. Tiene ribosomas libres en el citoplasma, conteniendo grandes gránulos rodeados por membrana, las cuales son electro densas y usualmente fuertemente acidofílicas, presentando diferentes contenidos como mucopolisacáridos, glicoproteínas, oligosacáridos (carbohidratos), proteínas básicas, etc. Este hallazgo de alta heterogeneidad de gránulos apoya la afirmación de que los plasmocitos y/o células granulares juegan un papel esencial en varias actividades fisiológicas. Así, estas células pueden ser importantes en la defensa inmunológica y de síntesis de hemocianinas.

Las células granulares, por lo menos en el langostino *Pacifastacus leniusculus*, parecen ser repositorios para el sistema de activación del sistema proFO (Battistella *et al.*, 1996) y por microscopia electrónica se ha demostrado que las peneidinas (una familia de péptidos antimicrobianos, con capacidades antifúngicas y antibacterianas) están presentes en los gránulos de estas células (Destomieux *et al.*, 2000; Roux *et al.*, 2002). Estos hemocitos son bien diferenciados y poseen gran número de gránulos densos. Son generalmente ovoides y más grandes que los otros hemocitos: en promedio $4.72 \times 5.85 \mu\text{m}$. El núcleo no ocupa todo el espacio citoplasmático, puede tener varias formas y una masa de heterocromatina densa está presente cerca de la envoltura nuclear. La característica más distintiva de estos hemocitos es la presencia de gránulos gruesos y densos, con tamaños entre los 0.1 a $0.56 \mu\text{m}$, que forman la base de identificación de estos hemocitos.

Los gránulos son rodeados por una membrana y generalmente poseen un contenido homogéneo electrodenso, pero algunas veces exhiben una estructura interna heterogénea, hecha de áreas electrodensas y electrolucientes. El citoplasma de estos hemocitos contiene únicamente pocos ribosomas y retículo endoplasmático, y unas pocas vacuolas. También pueden desarrollar extensiones a manera de pseudópodos en contacto con cualquier superficie (Laxmilatha y Laxminarayana, 2004).

Con el fin de sobrevivir en un mundo cargado con microorganismos, la respuesta del sistema inmune innata se refiere a la primera línea de defensa del hospedero, la cual actúa unas horas después de la exposición microbiana a las superficies mucosas, después de la identificación de los patrones de reconocimiento microbiano (Marshall y Arenas, 2003). Los camarones poseen un sistema circulatorio abierto que les permite a los hemocitos infiltrarse y adherirse a muchos tejidos. Todas las expresiones genéticas son de los hemocitos infiltrados y los niveles de expresión relativas de estos genes se reflejarán en la cantidad de hemocitos infiltrados o fijados en estos tejidos (Swapna *et al.*, 2011).

La fagocitosis es el proceso de ingestión y digestión de pequeñas partículas extrañas y en los camarones la fagocitosis es realizada por los hemocitos granulares y semigranulares, que además sintetizan y almacenan en sus gránulos proteínas del sistema inmune, como aglutininas, pironectinas, enzimas citolíticas, enzimas del sistema proFO y péptidos antimicrobianos que son liberados a la hemolinfa sobre el sitio de infección o herida. Por otra parte, las células hialinas juegan un papel en la coagulación (Herbinière, 2005). En caso de patógenos (como por ejemplo huevos de parásitos o nematodos) que son muy grandes para ingerirlos, estos hemocitos pueden formar capsulas de múltiples capas que inmovilizan a los organismos invasores. Cuando las bacterias o los hongos están en gran número, tanto los hemocitos como las proteínas plasmáticas se pueden agregar, resultando en la formación de nódulos (Gupta, 1999).

Fenoloxidasa

La fenoloxidasa (FO, EC 1.14.18.1), es una tirosinasa que contiene cobre, juega un papel importante en la melanización, reparación de heridas y esclerotización de la cutícula. En los crustáceos está localizada dentro de los hemocitos como una enzima inactiva llamada profenoloxidasa (proFO) y su transformación de proFO a FO involucra muchas reacciones conocidas como el sistema de activación de la proFO. En el camarón el sistema es activado por β -1,3 glucanos y LPS e involucra dos pasos, el primero es la degranulación que ocurre cuando los hemocitos son estimulados por bacterias, LPS o β -1,3 glucanos para liberar las formas inactivas de proFO y la enzima activadora de proFO (EAproFO). El segundo paso requiere la participación del calcio para la conversión de la EAproFO inactiva en una proteinasa activa que en su momento transforma la proFO en FO activa. Entonces, la EAproFO en condiciones *in vivo*, es activada por calcio plasmático después de la degranulación de los hemocitos, la cual

es inducida por estímulos externos, como LPS y los beta glucanos (Vargas-Albores *et al.*, 1998; Fagutao *et al.*, 2011). Se ha demostrado que el calcio estimula la actividad proteolítica que transforma la proFO, por lo que se puede sugerir que el calcio solo participa una vez que la EAprFO y la proFO han sido liberadas de las células, lo que ocurriría después de un estímulo (Gollas-Galván *et al.*, 1997).

En los camarones, la melanización de patógenos es debida a la acción de la FO que promueve la hidroxilación de los monofenoles y oxidación de los difenoles a quinonas, en respuesta a materia extraña invadiendo el hemocele y durante la reparación de heridas. Estas quinonas son subsecuentemente transformadas en melanina por reacciones no enzimáticas. Posteriormente, la melanina se une a la superficie de las bacterias e incrementa la adhesión de hemocitos a la bacteria, acelerando así su remoción por formación de nódulos (Fagutao *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2015). Aun cuando se ha descrito una actividad antimicrobiana directa para la melanina, la producción de especies de oxígeno reactivas como los aniones súper óxido y radicales hidroxilo durante la generación de las quinoides también tienen un papel importante como antimicrobianos. Aunado a esto, se activan las reacciones biológicas como la fagocitosis, encapsulación y nodulación (Gupta, 1999).

Tripsina

La tripsina y las enzimas tipo tripsina han sido estudiadas extensivamente en una gran variedad de filos debido a su papel central en la digestión y en otros procesos fisiológicos (por ejemplo: coagulación sanguínea, fibrinólisis, inmunidad celular y humoral, fertilización y desarrollo embrionario). La tripsina en los invertebrados tiene características tales como una independencia aparente de los iones de calcio, actividad hacia sustratos proteínicos naturales, un gran número de isoformas y pobre estabilidad a pH ácido. En el caso de los crustáceos, mucha de esta información ha sido obtenida en estudios en extractos crudos de enzimas parcialmente purificadas (Perera *et al.*, 2012). Las tripsinas de los crustáceos han sido caracterizadas en langostinos, camarones y el cangrejo rey y en estas especies es más estable que la de los mamíferos. Un factor importante que determina esta estabilidad es resultado del reducido número de localizaciones alteradas de sitios de hendiduras autolíticas (Hehemann *et al.*, 2008).

La tripsina es una de las más importantes proteasas y contribuye con cerca del 6% de las proteínas solubles en la glándula digestiva (Shi *et al.*, 2010). Lai *et al.* (2005) usaron la tripsina para activar la FO y concluyeron que la tripsina y el dodecil sulfato de sodio (SDS) actúan directamente en la proFO, pero las LPS, β -1,3 glucanos, zimosano y alginato de sodio necesitan afiliarse con un sistema complejo de reconocimiento y reacción, mientras la tripsina (la cual es similar a la EAprFO), puede incidir a la proFO activándola entonces a FO (Perazzolo y Barracco 1997; Lai *et al.*, 2005).

La proFO puede rápidamente ser activada a FO por un sistema de activación endógeno y los inductores exógenos como la tripsina, LPS y el zimosano. En muchos insectos

y crustáceos, esta activación ha sido usada por ser susceptibles a la inhibición por inhibidores de proteasa de serina. Al incubar el fluido humoral de anfioxos, con los inhibidores de proteasa de serina STI y PUBG, antes de reaccionar con tripsina, zimosano o LPS, previene la activación de proFO por lo menos en un 79%. Esto sugiere la presencia de proteasas de serina naturales en forma inactiva en el fluido humoral del sistema de activación de proFO. Se ha mostrado que la activación de proFO en el fluido humoral de anfioxos por inductores exógenos es significativamente incrementada en presencia de calcio 10mM. Esto concuerda con la sugerencia de que la activación de proFO es un proceso dependiente de calcio, debido a su papel en la regulación de la actividad de proteasa endógena (Pang *et al.*, 2004). Además de la proFO, las hemocianinas también pueden ser activadas por tripsina (Cammarata y Parrinello, 2009).

Fagocitosis, especies reactivas de oxígeno y antioxidantes

El sistema de inmunidad innata activado también utiliza la fagocitosis para eliminar los microorganismos invasores. Durante este proceso se producen especies microbicidas oxígeno reactivas (ORs), como anión superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), iones hidróxido (OH^-), oxígeno simple y los intermediarios de oxígeno reactivos (IOR) que se necesitan que sean prontamente eliminados con la ayuda de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT) encontradas en virtualmente casi todos los organismos que respiran oxígeno. Estas pueden destruir cuerpos invasores eficientemente si son dirigidos contra el blanco correcto (Holmblad y Söderhäll, 1999).

La eliminación rápida y efectiva de las ROs es esencial para mantener el estado de salud y la supervivencia de los organismos. Por eso se han desarrollado defensas antioxidantes, incluyendo mecanismos enzimáticos y no enzimáticos que eliminan eficientemente el peróxido de hidrógeno de las células. La SOD posee la capacidad de disminuir el anión superóxido generando como resultado agua y peróxido de hidrógeno. Las SOD se han clasificado en tres grupos mayores, dependiendo del ion metálico que contengan. La Mn-SOD se encuentra en las mitocondrias, la Fe-SOD en bacterias y la Cu/Zn-SOD en eucariotas. La SOD extracelular (EC-SOD) coopera en la destrucción de parásitos ingeridos o encapsulados durante la explosión respiratoria generada durante la fagocitosis (Campa-Córdova *et al.*, 2005; Gómez-Anduro *et al.*, 2006).

Los hemocitos de *L. vannamei* pueden ser estimulados por acetato de forbolmiristato (AFM), zimosano, LPS y laminarina, los que los llevan a producciones similares de aniones superóxido. Se ha asumido que las capacidades de defensa de los hemocitos estarán relacionadas con la edad del camarón. Bajo condiciones experimentales, comparando *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio anguillarum* y *Vibrio harveyi*, todas las cepas excepto *V. haveiyi*, se unían a los hemocitos como inductores de fagocitosis y cuando eran usadas vivas eran capaces de inducir la generación de iones

superóxido y la respuesta de los hemocitos fue dependiente de la concentración de bacterias (Muñoz *et al.*, 2000).

Los IOR y ORs son producidos durante el metabolismo aeróbico normal y se incrementan en condiciones fisiológicas que resultan en estrés oxidativo y durante reacciones de defensa. Los IOR y ORs son entonces rápidamente eliminados por las enzimas antioxidantes, las cuales pueden participar en la producción de compuestos oxígeno reactivos usados en la destrucción de parásitos englobados o encapsulados (Campa-Córdova *et al.*, 2002). Ji *et al.* (2011) encontraron un incremento significativo en la producción de aniones superóxido en camarones después de ser inyectados con *Vibrio parahaemolyticus* y WSSV, concluyendo que el sistema ORs juega un papel muy importante en la defensa contra patógenos extraños.

α 2-macroglobulina

La α 2-macroglobulina (A2M) es un elemento evolutivamente conservado del sistema inmune innato, cuya función es la limpieza de las proteasas activas de los fluidos tisulares, ya que estas proteasas cuando están libres en la sangre o espacios tisulares pueden ocasionar un daño considerable, y en respuesta a este reto, los animales han desarrollado una colección de diversos inhibidores de proteasas. Los inhibidores de proteasas son de dos clases fundamentales, una de las cuales es la A2M, que reacciona por un mecanismo único que involucra el envolvimiento físico de la proteasa blanco con el doblamiento de la molécula de A2M. Al unirse al sitio activo de la proteasa, el sitio activo inhibidor destruye su actividad proteolítica.

La A2M muestra un mecanismo único de interacción con su proteasa blanco el cual es iniciado por su hendidura proteolítica a un motivo definido que es construido como un tramo expuesto y muy flexible de 30 a 40 aminoácidos que presenta una serie de enlaces peptídicos que invitan a los blancos de la mayoría de las proteasas existentes. Esto significa que, cual sea la proteasa, encontrará un blanco para su ataque proteolítico en esta región "cebo" de la molécula de A2M. La hendidura proteolítica de la región cebo realiza un rápido doblamiento de la molécula de A2M para producir un bolsillo interior cerrado que ahora contiene la proteasa blanco, atrapada en los dobleces de la A2M.

Aun cuando la A2M ha sido vista como un inhibidor de proteasa, debe ser considerada como una molécula de unión de proteasas cuya principal función es entregar su cargamento de proteasas a una vía endocítica de limpieza de proteasas, que se encarga de degradarlo a componentes de bajo peso molecular que aparecen después en la hemolinfa. El cambio conformacional de la A2M sirve tanto para entrapar a la proteasa como para exponerla a un dominio en el término carboxilo que es reconocido por los receptores de superficie celulares, lo que lleva a la unión y endocitosis del complejo proteasa-A2M. Esto remueve la proteasa de la circulación, neutralizando por tanto, sus acciones potencialmente perjudiciales (Enghild *et al.*, 1990; Saravan *et al.*, 2003; Armstrong, 2010).

Lisozima

La lisozima fue una de las primeras proteínas antibacterianas conocidas. En los invertebrados es bien sabido que la expresión de la lisozima es regulada y responde a un reto bacteriano y es comúnmente incluida en la familia de los péptidos antibacterianos, basados en su pequeño peso molecular y efecto bacteriolítico. Aún así, la lisozima ejerce su función antibacteriana de tipo C catalizando la hidrólisis de los peptidoglicanos de la pared celular de las bacterias (Jolles y Jolles, 1984; Sotelo-Mundo *et al.*, 2003), y actúa como una defensa inmune no específica en los camarones peneidos. La lisozima de los camarones ha sido bien caracterizada, es una proteína específica de los hemocitos que posee actividad lítica contra una variedad de especies de bacterias Gram positivo y negativo, incluyendo el patógeno *Vibrio* spp.

La actividad enzimática de la lisozima es específica en lisados de hemocitos, siendo ausente en hemolinfa libre de células, y se estima que comprende aproximadamente el 4% de la proteínas de los hemocitos en *L. vannamei*. La caída rápida y sostenida del número circulante de hemocitos es acompañada por un incremento significativo y persistente de transcritos de lisozima lo que sugiere que conforme la bacteria se disemina vía circulación, el tránsito de hemocitos a los tejidos va siguiendo un patrón predecible. Burge *et al.* (2007) sugirieron que la disminución de marcas de lisozima vistas en los tejidos (y hemocitos circulantes) durante una fase temprana de la infección es debida a una infiltración masiva de hemocitos granulares en el sitio de infección, ya que en el sitio de inyección con *Vibrio* aumentó el mRNA de lisozima, lo que los llevó a concluir que la migración de hemocitos hacia el sitio de inyección (herida) ocurre rápidamente después de que el cuerpo es comprometido y que altas concentraciones de hemocitos expresando lisozima permanecen en la locación por lo menos 48 horas después del reto.

Se han realizado diversos estudios para evaluar la acción de lisozima en varias especies de camarones en donde se ha encontrado que la lisozima de *Marsupenaeus japonicus* desarrolla actividades líticas contra muchas especies de *Vibrio* incluyendo *Vibrio penaeicida* y a una gran variedad de patógenos (Hikima *et al.*, 2003). La actividad antibacteriana de la lisozima del camarón *L. vannamei* contra *Vibrio* sp. es al menos igual a los valores contra la Gram positiva *Micrococcus luteus* y más activa contra los patógenos del camarón *V. alginolyticus* y *V. parahemolyticus* (de la Re-Vega *et al.*, 2006). La proteína recombinante de *Fenneropenaeus chinensis* mostró alta actividad antibacteriana contra algunas bacterias Gram positivas, y relativamente baja actividad contra Gram negativas. Todo esto sugiere que la lisozima puede ser uno de las moléculas importantes contra los patógenos en la inmunidad innata del camarón (Bu *et al.*, 2008).

Péptidos antimicrobianos

Los péptidos antimicrobianos (PAM) son un grupo diverso de moléculas efectoras del sistema inmune que son utilizadas por los organismos multicelulares para prevenir o combatir una infección por microbios (Cuthbertson *et al.*,

2008). La actividad de los PAM debe iniciar en la membrana citoplasmática ya que la mayoría de ellos permeabiliza la membrana microbiana. Se han propuesto muchos modelos de cómo se insertan a la membrana llevando a la formación de canales de iones, poros transmembrana o rupturas de membrana extensivas. Hay péptidos que no forman poros, pero su actividad antimicrobiana es a una concentración por lo menos cuatro veces de magnitud bajo la concentración que disturba la membrana bacteriana.

Los péptidos de cada estructura familiar recaen en un mecanismo antimicrobiano que puede no implicar despolarización de la membrana del microorganismo blanco, sugiriendo un determinante molecular interno. Ciertos péptidos son incapaces de causar despolarización de la membrana a la concentración mínima inhibitoria (CMI), mientras otros causan máxima despolarización muy abajo del valor de la CMI. Hay evidencias que soportan que ciertas macromoléculas, así como funciones intracelulares se involucran como el blanco final para la actividad antimicrobiana del PAM. Debido a que las membranas bacterianas son la vía de entrada para los PAM, juegan un papel importante en la selectividad y eficiencia de los PAM (Conde *et al.*, 2012). Los péptidos antimicrobianos son importantes en la defensa inmune innata, especialmente en aquellos animales que carecen de inmunidad adaptativa. Debido a su pequeño tamaño, estructura anfipática y carácter catiónico, pueden rápidamente difundirse al sitio de infección (Swapna *et al.*, 2011).

Los PAM que son constitutivamente expresados o inducidos, proveen medios de defensas rápidos y efectivos. La mayoría de estos genes codifican péptidos que son movilizados poco después de una infección y actúan rápidamente para neutralizar una amplia variedad de microbios (bacterias, virus y protozoarios). La naturaleza ubicua de los péptidos antimicrobianos sugiere que su papel en la naturaleza ha estado presente desde hace mucho tiempo y debe haber contribuido al mejoramiento de un organismo. Muchas de estas moléculas ejercen un mecanismo de acción que parece ser único y altamente complejo. Aun así, los PAM exhiben, en algunos casos, significativos grados de citotoxicidad para el hospedero reflejando un blanco celular no selectivo (Conde *et al.*, 2012).

Considerando que los PAM son barreras naturales contra las infecciones bacterianas, los patógenos deberían haber desarrollado una variedad de estrategias para presentar resistencia a las defensas del hospedero ante los microorganismos. Actualmente, el único modelo estructural que explica el mecanismo de acción de los PAM, dice que actúan desde el exterior y sobre la membrana del patógeno, pudiendo ser porque aumenta la permeabilidad de su membrana o por desestabilización de la misma, por cambios en la carga neta del sistema. Como las membranas biológicas son en efecto fluidos dinámicos, la generación de resistencia parece ser menos probable que ocurra. No obstante, los patógenos han desarrollado contraataques no para resistir, sino al menos para limitar la efectividad de los PAM, como modificaciones químicas y/o alteraciones de energía dependiente de las bombas a nivel de membrana (Marshall y Arenas, 2003).

Similarmente, los PAM del camarón, incluyendo las penaeidina, crustina y factores anti lipopolisacáridos (FAL), juegan un papel importante en las respuestas antibacteriales y antivirales. Particularmente, los FAL pueden proteger al camarón contra una infección por WSSV (Wang *et al.*, 2011). Un nuevo péptido antimicrobiano similar a la crustina fue identificado en los hemocitos de *Penaeus monodon* y mostró una actividad antimicrobiana fuerte tanto contra bacterias Gram positivas como Gram negativas, incluyendo *V. harveyi*, una bacteria patógena muy importante en la acuicultura (Amparyup *et al.*, 2008).

Debido a su pequeño tamaño, estructura anfipática y carácter catiónico, los PAM se pueden difundir rápidamente al punto de infección y pueden matar bacterias en concentraciones micromolares. Muchos péptidos antimicrobianos muestran una remarcada especificidad por células procariontas y baja toxicidad para las células eucariotas. Como una de los PAM importantes en crustáceos, las crustinas tienen secuencias que han sido descritas en los camarones peneidos. Se ha probado que los hemocitos son el sistema de producción y de almacenamiento de crustinas a muy altos niveles. Generalmente, las expresiones de crustina eran más elevadas en los hemocitos después de un reto con WSSV, sugiriendo su papel en la defensa antiviral (Swapna *et al.*, 2011).

Las penaeidinas fueron primeramente descubiertas en el camarón blanco del Pacífico (*L. vannamei*) por extracción de proteínas de un grupo de hemocitos de varios organismos. En la descripción inicial y consecuente examinación a través de formas recombinantes de penaeidinas, fue aparente que son activas primeramente contra bacterias Gram positivas, con algunos efectos sobre hongos a mayores concentraciones. Además, se encontró evidencia que indica que los hemocitos que contienen penaeidinas en gránulos liberan su contenido intracelularmente y pueden lisar en el proceso de entrega de las penaeidinas al sitio de infección. Además, las penaeidinas pueden estar involucradas en el reconocimiento de los fagocitos para rodear microbios por las células inmunes (aglutinación de las bacterias), esto en adición a sus actividades antimicrobianas.

La variedad que es observada en las funciones de las penaeidinas muestra el potencial para diversidad *in vivo* de funciones inmunes y especificidad inmune (antibiótica) en ellas. La expresión de isoformas específicas de penaeidinas en diferentes tejidos, dependiendo en el tipo de inmunógeno detectado por el camarón y el camino en el cual fue detectado, puede probar que éstas moléculas son parte de un más eficiente camino de respuesta al ataque inmune y a la agresividad patogénica de los microbios (Cuthbertson *et al.*, 2008; Rolland, 2010; Woramongkolchai *et al.*, 2011).

CONCLUSIONES

Cada uno de los aspectos que intervienen en la inmunidad del camarón involucra complejos procesos bioquímicos que son importantes en su defensa contra los patógenos. Una vez vencida la primera barrera (el exoesqueleto) se desarrolla una cascada de eventos que desencadenarán la

activación del sistema proFO, la fagocitosis, la formación de nódulos y la encapsulación. Aun cuando la literatura científica es amplia, todavía hacen falta estudios sobre la relación que guardan cada uno de los elementos que intervienen en la inmunidad en cuanto a factores que pueden alterar el momento del inicio de la respuesta, la función y la acción efectiva de defensa.

REFERENCIAS

- Aguirre-Guzmán, G., Sánchez-Martínez, J.G., Campa-Córdova, A.I., Luna-González, A. y Ascencio, F. 2009. Penaeid shrimp immune system. *Thai Journal of Veterinary Medicine*. 39: 205-15.
- Amparyup, P., Kondo, H., Hirono, I., Aoki, T. y Tassanakajon, A. 2008. Molecular cloning, genomic organization and recombinant expression of a crustin-like antimicrobial peptide from black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Molecular Immunology*. 45: 1085-1093.
- Amparyup, P., Sutthangkul, J., Charoensapsri, W. y Tassanakajon, A. 2012. Pattern recognition protein binds to lipopolysaccharide and β -1,3-glucan and activates shrimp prophenoloxidase system. *Journal of Biological Chemistry*. 287: 10060-10069.
- Aranguren, L.F., Tang, K.F.J. y Lightner, D.V. 2012. Protection from yellow head virus (YHV) infection in *Penaeus vannamei* pre-infected with Taura syndrome virus (TSV). *Diseases of Aquatic Organisms*. 98: 185-192.
- Armstrong, P.B. 2010. Role of α -macroglobulin in the immune responses of invertebrates. *Invertebrate Survival Journal*. 7: 165-180.
- Battistella, S., Bonivento, P. y Amirante, G.A. 1996. Hemocytes and immunological reactions in crustaceans. *Italian Journal of Zoology*. 63: 337-343.
- Brigs M., Funge-Smith, S., Subasinghe, R.P. y Phillips, M. 2005. Introductions and movement of two penaeid shrimp species in Asia and the Pacific. *FAO Fisheries Technical Paper*. Food And Agriculture Organization Of The United Nations. Vol. 476. Pp. 73.
- Bu, X., Du, X., Zhou, W., Zhao, X. y Wang, J. 2008. Molecular cloning, recombinant expression and characterization of lysozyme from Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*. 24: 723-32.
- Burge, E.J., Madigan, D.J., Burnett, L.E. y Burnett, K.G. 2007. Lysozyme gene expression by hemocytes of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, after injection with *Vibrio*. *Fish and Shellfish Immunology*. 22: 327-339.
- Cammarata, M. y Parrinello, N. 2009. The ascidian prophenoloxidase activating system. *Invertebrate Survival Journal*. 6: 567-576.
- Campa-Córdova, A.I., Hernández-Saavedra, N.Y., De Philippis, R. y Ascencio, F. 2002. Generation of superoxide anion and SOD activity in haemocytes and muscle of American white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) as a response to beta-glucan and sulphated polysaccharide. *Fish and Shellfish Immunology*. 12: 353-366.
- Campa-Córdova, A.I., Hernández-Saavedra, N.Y., Aguirre-Guzmán, G. y Ascencio, F. 2005. Respuesta inmunomoduladora de la superóxido dismutasa en juveniles de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) expuestos a inmunoestimulantes. *Ciencias Marinas*. 31: 661-669.
- Carbajal-Sánchez, I.S., Castro-Longoria, R. y Grijalva-Chon, J.M. 2008. Experimental WSSV challenge of juvenile *Litopenaeus vannamei* at different salinities. *Aquaculture Research*. 39: 1588-1596.
- Cerenius, L., Jiravanichpaisal, P., Liu, H.P. y Söderhill, I. 2010. Crustacean immunity. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 708: 239-259.
- Chappe-Bonnichon, V. 2006. Infections virales chez les crevettes: interférence, inhibition plasmatique et développement d'un modèle in vitro. Tesis Doctoral Universidad de Montpellier II. Francia. 160 pp.
- Chen, W.Y., Wang, H.C. y Lo, C.L. 2008. Modulation of bio-defense genes in WSSV-infected *Penaeus monodon*. En: *Diseases in Asian Aquaculture VI*. M.G. Bondad-Reantaso, C.V. Mohan, M. Crumlish y R.P. Subasinghe (eds.), pp 399-408. Asian Fisheries Society, Manila, Philippines.
- Condé, R., Argüello, M., Izquierdo, J., Noguez, R., Moreno, M. y Lanz, H. 2012. Natural Antimicrobial Peptides from Eukaryotic Organisms. En: *Antimicrobial Agents*. V. Bobbarala (ed). pp 51-72. InTech.
- Coscia, M.R., Giacomelli, S. y Oreste, U. 2011. Toll-like receptors: an overview from invertebrates to vertebrates. *Invertebrate Survival Journal*. 8: 210-226.
- Cuthbertson, B.J., Deterding, L.J., Williams, J.G., Tomer, K.B., Etienne, K., Blackshear, P.J., Büllsbach, E.E. y Gross, P.S. 2008. Diversity in penaeidin antimicrobial peptide form and function. *Developmental and Comparative Immunology*. 32: 167-181.
- de la Re-Vega, E., García-Galaz, A., Díaz-Cinco, M.E. y Sotelo-Mundo, R.R. 2006. White shrimp (*Litopenaeus vannamei*) recombinant lysozyme has antibacterial activity against Gram negative bacteria: *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio cholerae*. *Fish and Shellfish Immunology*. 20: 405-408.
- De la Vega, E., Degnan, B.M., Hall, M.R. y Wilson, K.J. 2007. Differential expression of immune-related genes and transposable elements in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) exposed to a range of environmental stressors. *Fish and Shellfish Immunology*. 23: 1072-1088.
- Destoumieux, D., Muñoz, M., Cosseau, C., Rodriguez, J., Bulet, P., Comps, M. y Bachère, E. 2000. Penaeidins, antimicrobial peptides with chitin-binding activity, are produced and stored in shrimp granulocytes and released after microbial challenge. *Journal of Cell Science*. 113: 461-469.
- Dhar, A.K., Roux, M.M. y Klimpel, K.R. 2002. Quantitative assay from measuring the Taura syndrome virus and yellow head virus load in shrimp by real-time RT-PCR using SYBR Green chemistry. *Journal of Virological Methods*. 104: 69-82.
- Enghild, J.J., Thøgersen, I.B., Salvesen, G., Fey, G.H., Figler, N.L., Gonias, S.L. y Pizzo, S.V. 1990. Alpha-macroglobulin from *Limulus polyphemus* exhibits proteinase inhibitory activity and participates in a hemolytic system. *Biochemistry*. 29: 10070-10080.
- Escobedo-Bonilla, C.M., Alday-Sanz, V., Wille, M., Sorgeloos, P., Pensaert, M.B. y Nauwynck, H.J. 2008. A review on the morphology, molecular characterization, morphogenesis and pathogenesis of white spot syndrome virus. *Journal of Fish Diseases*. 31: 1-18.
- Fagutao, F.F., Kondo, H., Aoki, T. y Hirono, I. 2011. Prophenoloxidase has a role in innate immunity in penaeid shrimp. En: *Diseases in Asian Aquaculture VII*. M.G. Bondad-Reantaso, J.B. Jones, F.

- Corsin y T. Aoki (eds.), pp. 171-176. Asian Fisheries Society, Selangor, Malaysia.
- FAO. 2012. State of World Fisheries and Aquaculture. FAO. Roma, Italia.
- Feng, N., Wang, D., Wen, R. y Li, F. 2014. Functional analysis on immune deficiency (IMD) homolog gene in Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. *Molecular Biology Reports*. 41: 1437-1444.
- Gollas-Galván, T., Hernández-López, J. y Vargas-Albores, F. 1997. Effect of calcium on the prophenoloxidase system activation of the brown shrimp (*Penaeus californiensis*, Holmes). *Comparative Biochemistry and Physiology*. 117A: 419-425.
- Gómez-Anduro, G.A., Barillas-Mury, C.A., Peregrino-Uriarte, A.B., Gupta, L., Gollas-Galván, T. y Hernández-López, J. 2006. The cytosolic manganese superoxide dismutase from the shrimp *Litopenaeus vannamei*: Molecular cloning and expression. *Developmental and Comparative Immunology*. 30: 893-900.
- Granja, C.B., Aranguren, L.F., Vidal, O.M., Aragón, L. y Salazar, M. 2003. Does hyperthermia increase apoptosis in white spot syndrome virus (WSSV)-infected *Litopenaeus vannamei*? *Diseases of Aquatic Organisms*. 54: 73-78.
- Grijalva-Chon, J.M. y Castro-Longoria, R. 2015. Viral threats in aquaculture: the battle continues. *Journal of Virology and Antiviral Research*, 4: 1000e107.
- Guan, Y., Yu, Z. y Li, C. 2003. The Effects of temperature on White Spot Syndrome infection in *Marsupenaeus japonicus*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 83: 257-260.
- Gupta, S. 1999. Molecular interactions among PAP-1, SPHs and proPO in activation of prophenoloxidase. Tesis de Maestría en Ciencias en Acuicultura. Oklahoma State University.
- Hehemann, J.H., Redecke, L., Murugaiyan, J., von Bergen, M., Betzel, C. y Saborowski, R. 2008. Autoproteolytic stability of a trypsin from the marine crab *Cancer pagurus*. *Biochemistry and Biophysics Research Communications*. 370: 566-571.
- Herbinière, J. 2005. Contribution à la mise en évidence des effecteurs impliqués dans l'immunité innée d'*Armadillidium vulgare*, crustacé isopode terrestre infecté par une bactérie du genre *Wolbachia*. Tesis Doctoral. Universidad De Poitiers. Facultad de Ciencias Fundamentales y Aplicadas. Francia.
- Hikima, S., Hikima, J., Rojtinakorn, J., Hirono, I. y Aoki, T. 2003. Characterization and function of kuruma shrimp lysozyme possessing lytic activity against *Vibrio* species. *Gene*. 316: 187-195.
- Holmblad, T. y Söderhäll, K. 1999. Cell adhesion molecules and antioxidative enzymes in a crustacean, possible role in immunity. *Aquaculture*. 172: 111-123.
- Jolles, P. y Jolles, J. 1984. What's new in lysozyme research? Always a model system today and yesterday. *Molecular and cellular biochemistry*. 63: 165-189.
- Ji, P.F., Yao, C.L. y Wang, Z.Y. 2011. Reactive oxygen system plays an important role in shrimp *Litopenaeus vannamei* defense against *Vibrio parahaemolyticus* and WSSV infection. *Diseases of Aquatic Organisms*. 96: 9-20.
- Johansson, M.W., Keyser, P., Sritunyalucksana, P. y Söderhäll, K. 2000. Crustacean haemocytes and haematopoiesis. *Aquaculture*. 191: 45-52.
- Lai, C.Y., Cheng, W. y Kuo, C.M. 2005. Molecular cloning and characterisation of prophenoloxidase from haemocytes of the White shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish and Shellfish Immunology*. 18: 417-430.
- Lan, J.F., Zhou, J., Zhang, X.W., Wang, Z.H., Zhao, X.F., Ren, Q. y Wang, J.X. 2013. Characterization of an immune deficiency homolog (IMD) in shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*) and crayfish (*Procambarus clarkii*). *Developmental and Comparative Immunology*. 41: 608-617.
- Laxmilatha, P. y Laxminarayana, A. 2004. Fine structure of the haemocytes of the Indian white shrimp, *Fenneropenaeus indicus* (H. Milne Edwards, 1837). *Crustaceana*. 77: 835-848.
- Le Moullac, G. y Haffner, P. 2000. Environmental factors affecting immune responses in Crustacea. *Aquaculture*. 191: 121-131.
- Li, F. y Xiang, J. 2013. Signaling pathways regulating innate immune responses in shrimp. *Fish and Shellfish Immunology*. 34: 973-980.
- Manzo, D.H. 2000. Efecto de cuatro densidades de siembra sobre el crecimiento del camaron blanco *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) cultivado en estanques rústicos, en Manzanillo, Colima. Tesis de Maestría en Ciencias. Facultad de Ciencias Marinas. Universidad de Colima. México.
- Mavrouli, M.D., Tsakasa, S., Theodoroub, G.L., Lampropoulou, M. y Marmarasa, V.J. 2005. MAP kinases mediate phagocytosis and melanization via prophenoloxidase activation in medfly hemocytes. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1744: 145-156.
- Marshall, S.H. y Arenas, G. 2003. Antimicrobial peptides: A natural alternative to chemical antibiotics and a potential for applied biotechnology. *Electronic Journal of Biotechnology*. 6: 271-284.
- Martorelli, S.R., Overstreet, R.M. y Jovonovich, J.A. 2010. First report of viral pathogens WSSV and IHNV in Argentine crustaceans. *Bulletin of Marine Science*. 86: 117-131.
- McGraw, W.J., Davis, D.A., Teichert-Coddington, D. y Rouse, D.B. 2002. Acclimation of *Litopenaeus vannamei* postlarvae to low salinity: Influence of age, salinity endpoint, and rate of salinity reduction. *Journal of the World Aquaculture Society*. 33: 78-84.
- Moser, J.R., Galván-Álvarez, D.A., Mendoza-Cano, F., Encinas-García, T., Coronado-Molina, D.E., Portillo-Clark, G., Marques, M.R.F., Magallón-Barajas, F.J. y Hernández-López, J. 2012. Water temperature influences viral load and detection of White Spot Syndrome Virus (WSSV) in *Litopenaeus vannamei* and wild crustaceans. *Aquaculture*. 326-329: 9-14.
- Mouillessieux, K.P., Klimpel, K.R. y Dhar, A.K. 2003. Improvement in the specificity and sensitivity of detection for the Taura syndrome virus and yellow head virus of penaeid shrimp by increasing the amplicon size in SYBR Green real-time RT-PCR. *Journal of Virological Methods*. 111: 121-127.
- Munro, J. y Owens, L. 2007. Yellow head-like viruses affecting the penaeid aquaculture industry: a review. *Aquaculture Research*. 38: 893-908.
- Muñoz, M., Cedeño, R., Rodríguez, J., van der Knaap, W.P.W., Mialhed, E. y Bachère, E. 2000. Measurement of reactive oxygen intermediate production in haemocytes of the penaeid shrimp, *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*. 191: 89-107.
- Natividad, K.D.T., Migo, M.V.P., Albaladejo, J.D., Magbanua, J.P.V., Nomura, N. y Matsumura, M. 2006. Simultaneous PCR detection of two shrimp viruses (WSSV and MBV) in postlarvae of *Penaeus monodon* in the Philippines. *Aquaculture*. 257: 142-149.
- Navarro-Nava, F., Castro-Longoria, R., Grijalva-Chon, J.M., Ramos-Paredes, J. y de la Rosa-Vélez, J. 2011. Infection and mortality of *Penaeus vannamei* at extreme salinities when

- challenged with Mexican yellow head virus (YHV). *Journal of Fish Diseases*. 34: 327-329.
- Overstreet, R.M., Jovonovich, J. y Ma, H. 2009. Parasitic crustaceans as vectors of viruses, with an emphasis on three penaeid viruses. *Integrative and Comparative Biology*. 49: 127-141.
- Panichaeron, B., Khawsak, P., Deesukon, W. y Sukhumsirichart, W. 2011. Multiplex real-time PCR and high-resolution melting analysis for detection of white spot syndrome virus, yellow-head virus, and *Penaeus monodon* densovirus in penaeid shrimp. *Journal of Virological Methods*. 178: 16-21.
- Pang, Q., Zhang, S., Wang, C., Shi, X. y Sun, Y. 2004. Presence of prophenoloxidase in the humoral fluid of amphioxus *Branchiostoma belcheritsingtaense*. *Fish and Shellfish Immunology*. 17: 477-487.
- Perazzolo, L.M. y Barracco, M.A. 1997. The prophenoloxidase activating system of the shrimp *Penaeus paulensis* and associated factors. *Developmental and Comparative Immunology*. 21: 385-395.
- Perera, E., Rodríguez-Casariago, J., Rodríguez-Viera, L., Calero, J., Perdomo-Morales, R. y Mancera, J.M. 2012. Lobster (*Panulirus argus*) hepatopancreatic trypsin isoforms and their digestion efficiency. *The Biological Bulletin*. 222: 158-170.
- Phalitakul, S., Wongtawatchai, J., Sarikaputi, M. y Viseshakul, N. 2006. The molecular detection of Taura syndrome virus emerging with White spot syndrome virus in penaeid shrimps of Thailand. *Aquaculture*. 260: 77-85.
- Phuoc, L.H. 2008. Single and dual experimental infection of specific pathogen-free *Litopenaeus vannamei* shrimp with White Spot Syndrome Virus and *Vibrio* species. Tesis Doctoral. Universidad de Gante. Bélgica.
- Ponce-Palafox, J., Martínez-Palacios, C.A. y Ross, L.G. 1997. The effects of salinity and temperature on the growth and survival rates of juvenile white shrimp, *Penaeus vannamei*, Boone, 1931. *Aquaculture*. 157: 107-115.
- Rahman, M.M., Corteel, M., Wille, M., Alday-Sanz, V., Pensaert, M.B., Sorgeloos, P. y Nauwynck, H.J. 2007. The effect of raising water temperature to 33 °C in *Penaeus vannamei* juveniles at different stages of infection with white spot syndrome virus (WSSV). *Aquaculture*. 272: 240-245.
- Rahman, M.M., Escobedo-Bonilla, C.M., Corteel, M., Dantas-Lima, J.J., Wille, M., Alday-Sanz, V., Pensaert, M.B., Sorgeloos, P. y Nauwynck, H.J. 2006. Effect of high water temperature (33 °C) on the clinical and virological outcome of experimental infections with white spot syndrome virus (WSSV) in specific pathogen-free (SPF) *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*. 261: 842-849.
- Rai, P., Safeena, M.P., Krabsetsve, K., La Fauce, K., Owens, L. y Karunasagar, I. 2012. Genomics, molecular epidemiology and diagnostics of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus. *Indian Journal of Virology*. 23: 203-214.
- Reynaud, Y. 2008. Identification de marqueurs génétiques de la virulence chez *Vibrio nigrigulchritudo*, un pathogène de crevettes péneïdes en Nouvelle-Calédonie. Tesis Doctoral. Universidad de Paris VI. Francia.
- Rolland, J.L. 2010. Aspects moléculaires et biochimiques des stylécines, peptides multifonctionnels identifiés chez la crevette bleue du Pacifique *Litopenaeus stylirostris* (Crustacea, Decapoda). Tesis Doctoral. Universidad de Montpellier II. Francia.
- Roux, M.M., Pain, A., Klimpel, K.R. y Dhar, A.K. 2002. The lipopolysaccharide and β -1, 3-glucan binding protein gene is upregulated in white spot virus-infected shrimp (*Penaeus stylirostris*). *Journal of Virology*. 76: 7140-7149.
- Sánchez-Martínez, J.G., Aguirre-Guzmán, G. y Mejía-Ruiz, H. 2007. White Spot Syndrome Virus in cultured shrimp: A review. *Aquaculture Research*. 38: 1339-1354.
- Sánchez-Paz, A. 2010. White spot syndrome virus: an overview on an emergent concern. *Veterinary Research*. 41: 43.
- Saravanan, T., Weise, C., Sojka, D. y Kopáček, P. 2003. Molecular cloning, structure and bait region splice variants of alpha2-macroglobulin from the soft tick *Ornithodoros moubata*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 33: 841-851.
- Shi, X.Z., Li, X.C., Wang, S., Zhao, X.F. y Wang, J.X. 2010. Transcriptome analysis of hemocytes and hepatopancreas in red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*, challenged with white spot syndrome virus. *Invertebrate Survival Journal*. 7: 119-131.
- Sotelo-Mundo, R.R., Islas-Osuna, M.A., de la Re-Vega, E., Hernández-López, J., Vargas-Albores, F. y Yepiz-Plascencia, G. 2003. cDNA cloning of the lysozyme of the white shrimp *Penaeus vannamei*. *Fish and Shellfish Immunology*. 15: 325-331.
- Stentiford, G.D., Bonami, J.R. y Alday-Sanz, V. 2009. A critical review of susceptibility of crustaceans to Taura syndrome, Yellowhead disease and White Spot Disease and implications of inclusion of these diseases in European legislation. *Aquaculture*. 291: 1-17.
- Swapna, P.A., Bright Singh, I.S., Sudheer, N.S., Vrinda, S., Priyaja, P. y Philip, R. 2011. Molecular characterization of a crustin-like antimicrobial peptide in the giant tiger shrimp, *Penaeus monodon*, and its expression profile in response to various immune stimulants and challenge with WSSV. *Immunobiology*. 216: 184-194.
- Ueda, R., Krabsetsve, K. y Owens, L. 2008. Polymerase chain reaction detection of Taura Syndrome Virus and infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus in frozen commodity tails of *Penaeus vannamei* Boone. *Aquaculture Research*, 2008: 1-6.
- Vargas-Albores, F., Hinojosa-Baltazar, P., Portillo-Clark, G. y Magallon-Barajas, F. 1998. Influence of temperature and salinity on the yellowleg shrimp, *Penaeus californiensis* Holmes, prophenoloxidase system. *Aquaculture Research*. 29: 549-553.
- Vidal, O.M., Granja, C.B., Aranguren, F., Brock, J.A. y Salazar, M. 2001. A profound effect of hyperthermia on survival of *Litopenaeus vannamei* juveniles infected with white spot syndrome virus. *Journal of the World Aquaculture Society*. 32: 364-372.
- Wang, P.H., Wan, D.H., Gu, Z.H., Deng, X.X., Weng, S.P., Yu, X.Q. y He, J.G. 2011. *Litopenaeus vannamei* tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6) responds to *Vibrio alginolyticus* and white spot syndrome virus (WSSV) infection and activates antimicrobial peptide genes. *Developmental and Comparative Immunology*. 35: 105-114.
- Wang, S., Chen, A.J., Shi, L.J., Zhao, X.F. y Wang, J.X. 2012. TRBP and eIF6 homologue in *Marsupenaeus japonicus* play crucial roles in antiviral response. *PLoS ONE* 7(1): e30057.
- Wang, P.H., Gu, Z.H., Wan, D.H., Zhu, W.B., Qiu, W., Chen, Y.G., Weng, S.P., Yu, X.Q. y He, J.G. 2013. *Litopenaeus vannamei* Toll-interacting protein (LvTollip) is a potential negative regulator

- of the shrimp Toll-pathway involved in the regulation of the shrimp antimicrobial peptide gene penaeidin-4 (PEN4). *Developmental and Comparative Immunology*. 40: 266-277.
- Wang, J., Jiang, K.J., Zhang, F.Y., Song, W., Zhao, M., Wei, H.Q., Meng, Y.Y. y Ma, L.B. 2015. Characterization and expression analysis of the prophenoloxidase activating factor from the mud crab *Scylla paramamosain*. *Genetics and Molecular Research*. 14: 8847-8860.
- Wongmaneeprateep, S., Baoprasertkul, P., Prompamorn, P., Thongkao, K., Limsuwan, C. y Chuchird, N. 2010. Effects of water temperature on the White Spot Syndrome Virus infection in postlarvae *Litopenaeus vannamei*. *Walailak Journal of Science and Technology*. 7: 127-134.
- Woramongkolchai, N., Supungul, P. y Tassanakajon, A. 2011. The possible role of penaeidin5 from the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, in protection against viral infection. *Developmental and Comparative Immunology*. 35: 530-536.
- Wyban, J., Walsh, W.A. y Godin, D.M. 1995. Temperature effects on growth, feeding rate and feed conversion of the Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*). *Aquaculture*. 138: 267-279.
- Yang, L.S., Yin, Z.X., Liao, J.X., Huang, X.D., Guo, C.J., Weng, S.P., Chan, S.M., Yu, X.Q. y He, J.G. 2007. A Toll receptor in shrimp. *Molecular Immunology*. 44: 1999-2008.
- Yu, X.Q. y Kanost, M.R. 2002. Binding of hemolin to bacterial lipopolysaccharide and lipoteichoic acid. An immunoglobulin superfamily member from insects as a pattern-recognition receptor. *European Journal of Biochemistry*. 269: 1827-1834.
- Yu, X.Q., Zhu, Y.F., Ma, C., Fabrick, J.A. y Kanost, M.R. 2002. Pattern recognition proteins