

DIVISION DE CIENCIAS BIOLOGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE PRODUCCION AGRICOLA Y ANIMAL
MAESTRIA EN CIENCAS AGROPECUARIAS

**CONSTRUCCIÓN DE REDES GENÉTICAS PARA LA
IDENTIFICACIÓN DE PROCESOS INMUNOLÓGICOS
RELACIONADOS AL SÍNDROME DE MANCHA BLANCA EN
*LITOPENAEUS VANNAMEI***

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS
AGROPECUARIAS

PRESENTE

Biol. Paz Chamorro José Eduardo

DIRECTOR:

Dr. Martínez Cortés Ismael

CO-DIRECTOR:

Dr. Campos Montes Ricardo Gabriel

ASESORA:

Dra. Enciso García Jennifer

Agradecimientos

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por el apoyo invaluable brindado durante el desarrollo de esta tesis. La beca otorgada no solo representó un respaldo económico indispensable, sino también una motivación constante para esforzarme en la realización de este proyecto.

Gracias a este apoyo, fue posible dedicarme plenamente al estudio y a la investigación, lo que permitió alcanzar los objetivos planteados y culminar con éxito este trabajo académico.

Mi gratitud es también extensiva a las personas y equipos detrás de esta institución, quienes hacen posible que estudiantes e investigadores podamos materializar nuestros proyectos y aspiraciones.

Por todo ello, reitero mi reconocimiento y aprecio al CONAHCYT.

Numero de Beca: 823515

CONTENIDO

Resumen.....	4
Abstract.....	5
Marco de referencia/justificacion.....	6
Marco Teórico.....	8
- Camarón blanco del Pacífico (Litopenaeus vannamei)	8
- Sistema inmune.....	10
- Síndrome de mancha blanca (SMB).....	20
- Estrategias de acción contra el virus.....	22
- Redes genéticas.....	24
Objetivo.....	25
Hipótesis y pregunta de investigacion.....	26
Metodología.....	26
Resultados.....	30
Discusión	38
Conclusion.....	46
Referencias.....	47

RESUMEN

Litopenaeus vannamei es la especie de camarón más cultivada, por ello la especie más importante en la camaronicultura, industria fuertemente afectada por los brotes de enfermedades, dentro los cuales se encuentra el virus del síndrome de mancha blanca, mortal para el organismo debido por sus características físicas propias y cómo funciona su sistema inmunológico, se conoce muy poco sobre los mecanismos precisos que realiza el sistema inmune de *L. vannamei* ante esta enfermedad viral, por lo que mediante la utilización de herramientas, como una red genética, podría llevar a acercarnos a estos procesos aun desconocidos, mediante la realización de la red genética obtenida de un reto viral con síndrome de mancha blanca pudimos obtener rutas de interés para investigación en campo así como también retos controlados en laboratorio que den mayor certeza de los métodos para combatir la enfermedad, de igual manera el análisis de la red genética nos permitió observar relaciones que no han sido analizadas a profundidad, dando una visión general más amplia de cómo funciona la resistencia de *L.vannamei* ante el virus del síndrome de mancha blanca.

Abstract

Litopenaeus vannamei is the most widely cultivated shrimp species, therefore the most important species in shrimp farming, an industry strongly affected by disease outbreaks, among which is the white spot syndrome virus, fatal to the organism due to its own physical characteristics and how its immune system works, very little is known about the precise mechanisms carried out by the immune system of *L. vannamei* against this viral disease, so by using tools such as a genetic network, it could lead to getting closer to these processes. Still unknown, by carrying out the genetic network obtained from a viral challenge with white spot syndrome we were able to obtain routes of interest for field research as well as controlled challenges in the laboratory that give greater certainty of the methods to combat the disease, in the same way the analysis of the genetic network allowed us to observe relationships that have not been analyzed in depth, giving a broader general vision of how the resistance of *L. vannamei* against the white spot syndrome virus works.

Marco referencial/justificación

Dentro del cultivo del camarón, *Litopenaeus vannamei* (Blanco del Pacífico) es la especie más cultivada a nivel mundial debido a que ofrece mejores rendimientos de crecimiento y una mayor tolerancia a las condiciones ambientales en cautiverio (Pérez, 2018). La industria camaronera es afectada por diversos factores como la calidad del agua, el clima donde se encuentran las granjas y la presencia de enfermedades como el Síndrome de Mancha Blanca (SMB) (FAO., 2020). El SMB fue reportado por primera vez en México en 1999, donde se vio afectado el estado de Sonora, llegando a tener pérdidas económicas importantes en el 2010 ya que el virus responsable de la enfermedad es capaz de acabar con el 100% de organismos en un estanque (COSAES., 2013), teniendo brotes esporádicos que siguen afectando la industria hoy en día. Esta enfermedad es difícil de controlar ya que se transmite tanto de manera horizontal como vertical, y cuenta con una amplia variedad de portadores del virus, que incluyen aves y otros crustáceos (Liu Z et al., 2007).

Para combatir esta enfermedad se han abordado diferentes estrategias, incluyendo alimentación enriquecida con distintos suplementos como zinc y carotenos con el fin de estimular la respuesta innata (López E., 2016), uso de vacunas de diversa naturaleza con distintos grados de eficacia a nivel de entrenamiento innato (Feng S., 2017), e incluso se ha logrado el mejoramiento genético mediante selección de líneas resistentes de camarón a través de retos de infección viral controlada (Feng S., 2018).

A pesar de las distintas estrategias para estimular la respuesta inmune del camarón, no se ha obtenido un resultado óptimo. Por lo cual, se han implementado estrategias moleculares con el fin de comprender mejor el sistema inmune del camarón y su interacción con el virus de SMB (Li F., 2013). Sin embargo, aún es muy limitado el conocimiento sobre los procesos genéticos específicos durante la infección, entre ellos, los procesos relacionados al sistema inmune. Por lo que el análisis de genes

relacionados con la actividad del sistema inmune puede favorecer la predicción de las vías de acción específicas ante la infección viral del SMB.

Las redes genéticas son una herramienta para contextualizar datos de co-expresión de genes ante estímulos específicos y que permite predecir los procesos bioquímicos que realizan las células (Lillehammer M., 2020). Entre la información que se puede obtener de estos análisis, se encuentra el enriquecimiento de vías bioquímicas, así como identificación de probables blancos moleculares, que se refiere a completar información importante en procesos biológicos y buscar puntos específicos en estos procesos. Lo que se traducen en probables estrategias de regulación de respuestas celulares, incluyendo regulaciones que pueden derivar en el tratamiento de patologías (Tovar H., 2015).

Con el manejo de las redes genéticas es posible obtener un panorama más completo de la interacción entre el virus y el hospedero (Pérez R., 2018). Las redes genéticas se han usado recientemente para entender patologías complejas en humanos de las que no se tiene mucho conocimiento como las enfermedades neurodegenerativas, autoinmunes o el cáncer (Kelly J., 2020). En *L. vannamei* se han utilizado redes genéticas en la enfermedad del síndrome de necrosis aguda de la hepatopáncreas, generando información de genes que regulan río arriba y río abajo (previas y post a la regulación génica específica) vías implicadas en procesos de oxidación (Velázquez et al., 2019).

La generación de redes genéticas en este trabajo permite describir de forma más específica los mecanismos inmunes involucrados en el reconocimiento y acción contra el virus del SMB con la posibilidad de proponer alternativas específicas para combatirlo.

Marco teórico

Camarón blanco del Pacífico (*Litopenaeus vannamei*)

El crustáceo de mayor producción y crecimiento anual es *Litopenaeus vannamei* que en el 2018 representaba el 52% del total de los crustáceos producidos, mientras que el segundo lugar es el cangrejo de las marismas, el cual representó un 18% (FAO., 2020).

Desde la década de los 90's, Asia y específicamente China, han mantenido de forma regular el primer puesto en la producción de camarón (FAO., 2020). En México, en los años 80's se formalizó la producción de camarón para fines comerciales, y junto a otros países como Ecuador han logrado que la camaronicultura en América Latina mantenga el crecimiento más elevado a escala global, superando constantemente el 9% anual promedio en las últimas dos décadas, colocándola como el sector primario productor de alimentos con mayor desarrollo (INAES., 2018). Según datos de la Comisión Nacional de Acuacultura y Pesca, el cultivo de *L. vannamei* tiene impactos sociales y económicos muy importantes, principalmente en los estados de Sonora y Sinaloa. En el año 2021, la producción de camarón en México aumentó 3.7% respecto a 2020 (INAPESCA., 2021), dejando ver una industria en constante crecimiento.

Se considera que las enfermedades de los animales acuáticos son una de las limitaciones más graves para la expansión y el desarrollo de la acuicultura sostenible. Las afectaciones ambientales, sociales y económicas de los brotes de enfermedades en la acuicultura pueden llegar a ser graves (Shinn et al., 2018). Lo cual se ve reflejado en la disminución de producción debido a la alta mortalidad y el crecimiento lento llevando a pérdidas económicas; el cierre temporal o permanente de las unidades acuícolas que ocasionan pérdida de empleos en la acuicultura y en las industrias de esta cadena productiva; también se da la disminución del comercio y la pérdida de mercados debido a las prohibiciones de exportación, que llevan a pérdidas nacionales masivas debido a la preocupación pública por la inocuidad del consumo de camarón (Shinn et al., 2018). Existen diferentes enfermedades

(bacterianas virales, parásitos) que afectan a los camarones y, por lo tanto, a la industria, dependiendo de la especie del patógeno, la cepa, la edad del camarón y el estado nutricional, entre otros.

Anatomía del camarón blanco

L. vannamei conocido también por su nombre común como camarón patiblanco o camarón blanco del Pacífico, es el más cultivado a nivel mundial debido a que posee características que lo hacen eficiente en la producción, por ejemplo, posee un alto grado de tolerancia y adaptación fisiológica a la salinidad, así como a los recambios de agua, buena adaptabilidad a temperaturas es omnívoro y crece bien en altas densidades (Godínez-Siordia et al., 2011). El cuerpo del *L. vannamei* es cilíndrico y se puede dividir en 3 secciones externas: el cefalotórax, el abdomen y el telson. Los apéndices del cefalotórax son: las anténulas, y las antenas, cuya función es sensorial; las mandíbulas, las maxilas, y los maxilípedos, tienen como función la ayuda en la toma de alimento; y los pereiópodos, que tienen una función de patas caminadoras. Después, en el abdomen, está formado por seis segmentos y seis pares de apéndices llamados pleópodos, que son utilizados como propulsores que permiten el nado hacia adelante. Los últimos apéndices abdominales forman parte de la cola, son llamados urópodos y junto con el telson, permiten al camarón nadar hacia atrás, y lo ayudan a dirigirse cuando debe nadar hacia adelante (Medrano., 2019).

En cuanto a la parte interna del camarón se consideran distintos sistemas, incluyendo un sistema circulatorio abierto compuesto por el corazón, las arterias, las venas y los senos hemales. Estos senos hemales almacena y transporta hemolinfa, están bordeados por tejido conectivo y participan activamente, en el suministro de oxígeno, nutrientes y circulación de hemocitos a los diversos órganos.

Cuenta con un sistema digestivo que está compuesto por la boca, el estómago y el hepatopáncreas los cuales están situados en el cefalotórax, mientras que el intestino, y glándulas digestivas se encuentran en el abdomen; Por último, se

encuentra el ano, situado centralmente donde comienza el telson (Martin y Hose, 2010). El hepatopáncreas es considerado uno de los órganos más importante e interviene en muchas funciones metabólicas tales como síntesis, absorción, secreción, y metabolismo de lípidos e hidratos de carbono (Martin y Hose., 2010).

Debido a su fisionomía misma, las enfermedades en este organismo son más específicas en comparación a mamíferos o aves diferentes mamíferos o aves.

Sistema inmune de *L. vannamei*

Debido al aumento en la densidad de siembra de *L. vannamei* la proliferación de las enfermedades dentro de las granjas productoras se han vuelto un aspecto importante para considerar, ya que inhiben la expansión y desarrollo de la industria (FAO., 2020). Existen diferentes enfermedades descritas, reportándose enfermedades virales, bacterianas y otras relacionadas a otros organismos como rotíferos o incluso propiciadas por el ambiente relacionadas a calidad del agua (Morales., 2008).

L. vannamei cuenta con un sistema inmune (SI) distinto al de los vertebrados. Una diferencia por destacar es la ausencia de inmunoglobulinas y células linfoides (Rendón., 2016), lo que resulta en la falta de un sistema inmune adaptativo, por lo que la defensa ante infecciones se realiza por medio de mecanismos del SI innato. En el camarón, los hemocitos son las células inmunitarias más importantes que participan ante la defensa contra agentes extraños, los cuales tienen mecanismos de acción parecidos a los neutrófilos y macrófagos de los mamíferos (Morales., 2008).

El SI de *L. vannamei* está organizado en distintos niveles, iniciando con barreras físicas como son: el exoesqueleto y el epitelio cuticular; así como órganos entre los que destacan: el órgano linfóide y el tejido hematopoyético; a su vez el SI contiene elementos celulares clasificados como hemocitos y elementos humorales como son el sistema profenoloxidasa y las proteínas plasmáticas. Todos estos elementos actúan en conjunto como defensa ante patógenos (Martin y Hose., 2010).

Barreras físicas

Exoesqueleto. Es una cutícula rígida semitransparente que actúa como una barrera que protege contra los daños físicos y/o mecánicos y patógenos, está compuesto de carbonato de calcio y proteínas. También tiene quitina y quitosano, las cuales son reforzadas por medio de la esclerotización para su creación (Gupta, 1999) el exoesqueleto participa en procesos fisiológicos como son, la muda, el crecimiento y en camarones forman parte del recubrimiento digestivo, así como de los procesos de respuesta inmune por medio de dominios de unión a quitina, que en el caso del SMB estos dominios de unión a quitina permiten la entrada del virus al camarón por medio de tropismo de las partículas virales (Aguirre-Guzmán et al., 2009).

Epitelio cuticular. En los camarones sanos el epitelio cuticular permite el intercambio de líquidos entre el camarón y el ambiente, así como de sus fluidos corporales, lo que le permite mantener la ósmosis celular. Está conformado por células nucleadas columnares bien organizadas debajo de la cutícula, así como factores inmunes derivados de hemocitos conocidos como proteínas de reconocimiento (proteínas plasmáticas) las cuales tienen como función el reconocimiento de patógenos. Estas proteínas de reconocimiento se dividen en dos grupos; un primer grupo constituido por aglutininas multivalentes de unión a azúcares, también llamadas hemaglutininas o lectinas sensibles a lipopolisacáridos (LPS) de bacterias de tipo Gram negativas. Un segundo grupo esta constituido por proteínas de unión a los β -glucanos (PUBG), que tienen la capacidad de reconocer β -glucanos de las membranas de las bacterias y paredes de los hongos por lo tanto son sensibles a bacterias Gram positivas y negativas, así como hongos como se muestra en la figura 1 (Morales V, 2008). Tanto las hemaglutininas como los PUBG desencadenan procesos relacionados a mecanismos propios de los hemocitos como son la fagocitosis, la encapsulación y la nodulación.

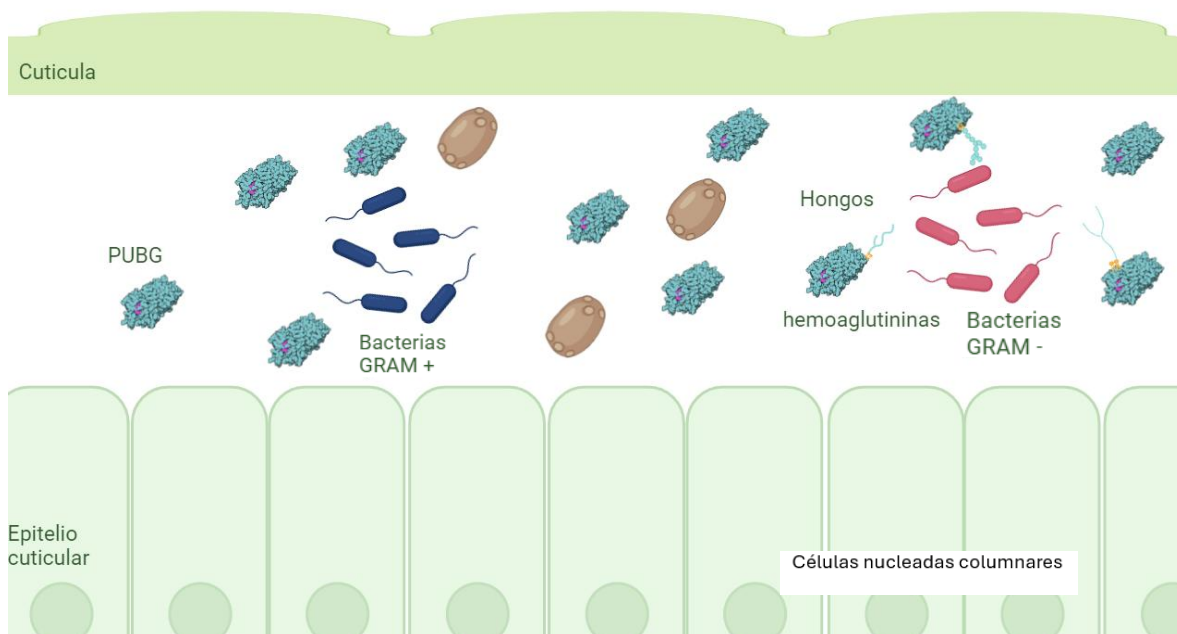


Figura 1. Estructura del epitelio cuticular de *L. vannamei*. En la imagen se pueden observar las células nucleadas columnares, la cutícula y el espacio de intercambio de líquidos, entre estas estructuras se encuentran las hemaglutininas, los PUBG, y se llevan a cabo las interacciones de reconocimiento de patógenos.

En el espacio de intercambio de líquidos del epitelio cuticular también existen receptores de reconocimiento de patrones solubles (PRR) por sus siglas en inglés, los cuales en camarones se han clasificado como un conjunto de proteínas de unión a lipopolisacáridos y glucanos y son conocidas como PULG. Las PULG, son capaces de reconocer a los β -1,3 glucanos de la membrana bacteriana y al LPS de bacterias Gram negativas y posterior a su reconocimiento estos PULG median reacciones inmunes, siendo las encargadas de iniciar el mecanismo de defensa del hospedero de tipo innato conocido como sistema profenoloxidasa (proPO) como se muestra en la Figura 2 (Amparyup et al., 2012).

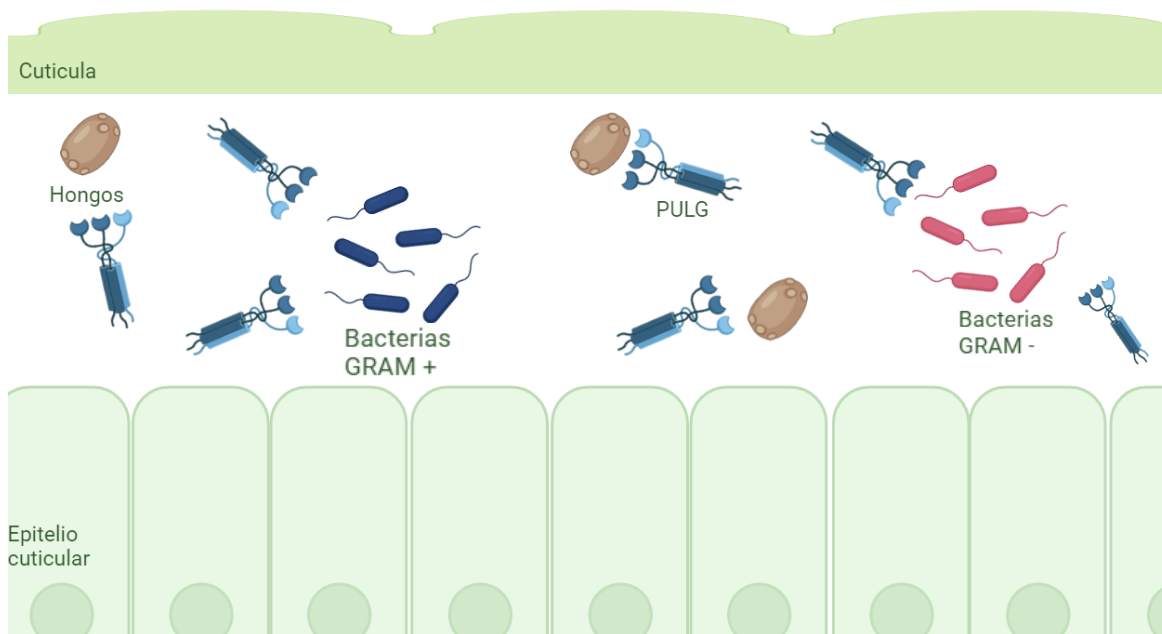


Figura 2. Estructura del epitelio cuticular y localización de los PULG en *L. vannamei*. En la imagen se puede observar las células nucleadas columnares, la cutícula y el espacio de intercambio de líquidos, las cuales alojan a los PULG, los cuales censan a bacterias Gram + así como Gram - y hongos, desencadenando la activación del sistema proPO.

El sistema proPO es responsable de la melanización (Söderhäll., 1992), proceso de oxidación de fenoles en quinones los cuales se polimerizan en melanina, la cual actúa como inhibidora de procesos de infección de la actividad de enzimas bacterianas y fúngicas ya que es capaz de promover la encapsulación de hifas de hongos además de que en sus síntesis se generan aniones superóxido e hidroxilo que poseen propiedades antimicrobianas (Söderhäll., 1992). Los PULG se unen a los 1-3 glucanos atrayendo a los hemocitos al lugar por lo que son proteínas de fase aguda inducible y con evidencia de que estos reconocen bacterias y no virus (Lan et al., 2013).

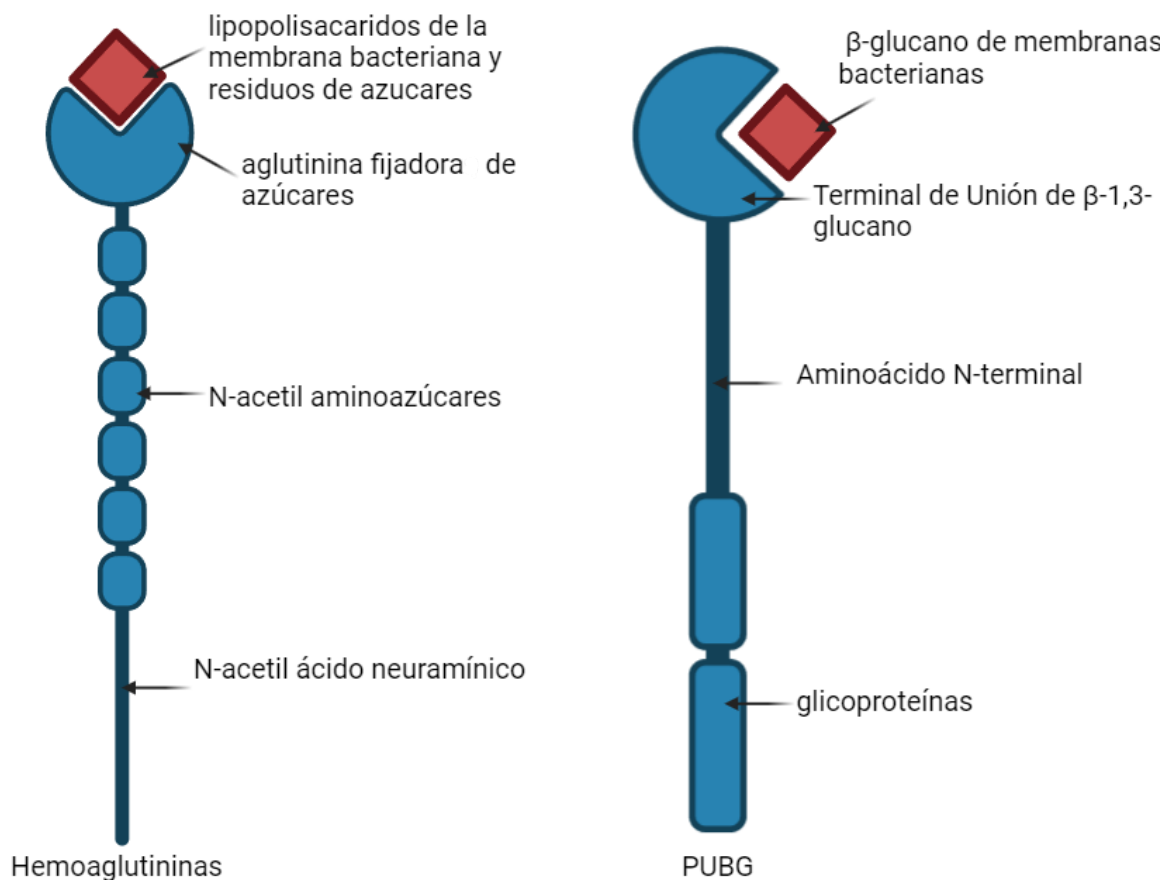


Figura 3. Estructura de elaboración propia de las hemaglutininas y los PUBG, donde se han observado estructuras homólogas en diferentes especies, sin embargo, su composición y estructura no han sido del todo investigadas en *L.vannamei*. Hasta ahora la estructura de los PULG no han sido descritas sin embargo se cree que poseen estructuras más parecidas a los PUBG (Imágenes representativas).

L.vannamei también cuenta con PRRs asociados a membrana como los receptores Tipo Toll (TLR). Para esta especie se han descrito nueve TLRs (LvToll1-LvToll9) y su nomenclatura se describe como Lvtoll. Su localización en la célula varía. LvToll1 y LvToll3 están presentes tanto en citoplasma como en la membrana celular. LvToll2 se restringe solo a citoplasma y se sobre expresa ante enfermedades virales como el SMB. Los demás LvTolls (LvToll 4-9) han sido descritos en la membrana

plasmática y el retículo endoplásmico. (Lan et al., 2013) Los LvTolls se expresan altamente en prácticamente todos los tejidos del organismo sin embargo no han sido ampliamente estudiados y caracterizados para estímulos específicos (Gong X., 2024). Los LvTolls detectan patógenos a través de los patrones moleculares asociados a patógenos (PMAP).

El reconocimiento de las PMAP puede realizarse de manera extracelular o intracelular, esto último ocurre, cuando los patógenos son internalizados. Una vez que se lleva a cabo el reconocimiento, se transduce la señal en cascada a través de proteínas con dominio de cinasas, promoviendo la regulación de genes en el núcleo (Figura 4).

La acción en conjunto de todos los receptores descritos permite la activación de procesos celulares como la fagocitosis, encapsulación y formación de nódulos además de la estimulación de producción de algunos péptidos antimicrobianos esenciales como el crustin y peneidin. (Lan et al., 2013). Estos procesos celulares pueden ser mediados por receptores de tipo toll. En camarón estos procesos celulares relacionados a inmunidad innata pueden ser activados por otras vías de señalización, como pueden ser por medio de Janus Cinasa (JAK) y el transductor de señales y activador de la transcripción (STAT). Estas vías pueden activarse en los hemocitos y son desencadenadas por lipopolisacáridos (LPS). La vía JAK-STAT se ha investigado en la defensa antiviral observando que interactúa con el SMB para mejorar la expresión de un gen viral temprano inmediato en los camarones infectados, porque la infección viral no interrumpe la vía JAK-STAT, sino al contrario, beneficia la activación del STAT en el camarón hospedero (Amparyup et al., 2012).

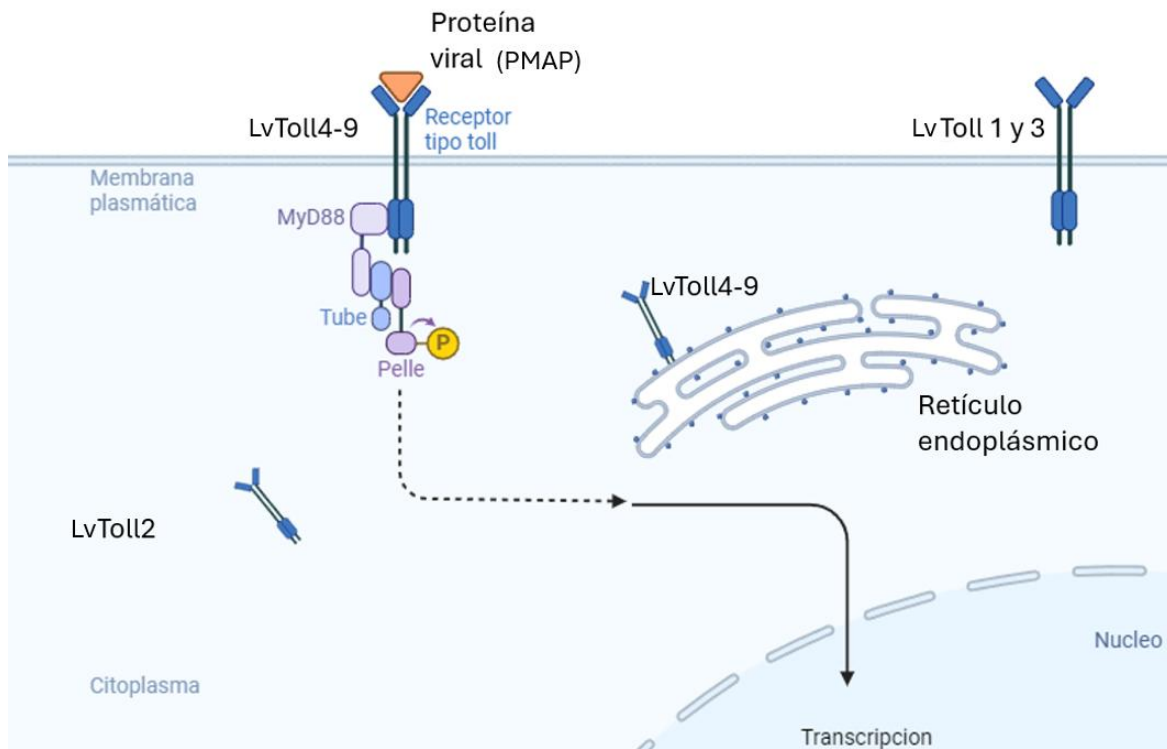


Figura 4. Ubicación de receptores Lvtoll en la membrana e intracelulares como el retículo endoplásmico y el citoplasma de *L.vannamei*, así como también se muestran sus diferentes partes hasta llegar al núcleo para empezar transcripciones específicas.

Pese a todas estas barreras, el SMB sigue evadiendo de forma efectiva los mecanismos de respuesta inmune del hospedero. Sin embargo, existen distintos órganos especializados y elementos celulares involucrados con las defensas de *L.vannamei* (Söderhäll., 1992).

Órganos especializados

Algunos órganos junto a los hemocitos y otras células miden en conjunto las respuestas celulares y humores del sistema inmunológico para eliminar microorganismos potencialmente infecciosos. Los órganos que conforman los

mecanismos de respuesta inmune en el camarón son: corazón, tejido hematopoyético y órgano linfoide.

- *Corazón.* Los camarones presentan un sistema de circulación de tipo abierto, que conduce la hemolinfa, que es el componente humoral más importante del camarón que sería el equivalente a la sangre para los mamíferos. Este órgano lleva a la hemolinfa a través de conductos hasta llegar a los senos hemales, participando activamente en el suministro de oxígeno, nutrientes y circulación de hemocitos, los cuales derivan del tejido hematopoyético, a los diversos órganos (Martin y Hose, 2010). La hemolinfa contiene una gran cantidad de hemocianina la cual es una proteína acarreadora de oxígeno lo que da un color azul verdoso a esta, también contiene el oxígeno requerido por las células y sus nutrientes para su mantenimiento en los diferentes tejidos, la hemolinfa también contiene a los hemocitos los cuales las únicas poblaciones celulares del SI (Söderhäll., 1992).

- *Tejido hematopoyético.* Es un órgano lobulado donde maduran y se diferencian los hemocitos y todas las células inmunitarias. Se han identificado en su interior 4 tipos de células (tipo 1-4). Las células de tipo 1 son células precursoras que dan lugar a hemocitos inmaduros conocidos como células tipo 2 y 3. Las células de tipo 2 y 3 son estirpes de maduración y diferenciación de hemocitos inmaduros que dan origen a un hemocito maduro. Las células tipo 4 son células intersticiales como se puede observar en la figura 5.

Las células tipo 1 se localizan en la corteza, mientras que los hemocitos inmaduros se localizan en la médula, donde pueden liberarse hacia los senos hemales (Van B., 2002).

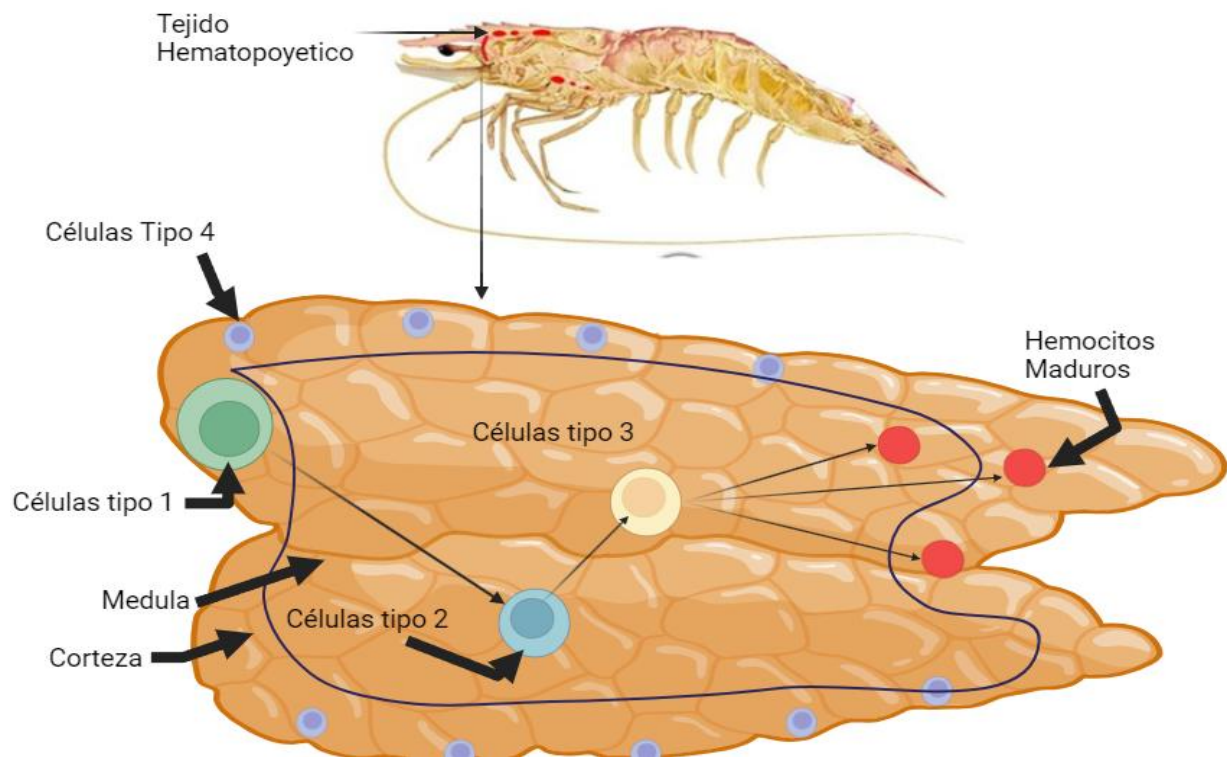


Figura 5: Imagen representativa del tejido hematopoyético, donde se muestra su ubicación anatómica en el camarón, así como sus componentes descritos.

- **Órgano linfoide.** Este órgano está localizado en ambos lados del estómago y estructuralmente se compone de un par de lóbulos, que son similares entre ellos, rodeados por cápsulas de tejido conectivo y están conectados directamente al corazón a través de la arteria sub gástrica (Figura 6). Es el órgano más efectivo en el filtrado y eliminación de patógenos, permitiendo el paso a hemocitos con material extraño para una subsecuente eliminación de residuos (Martin - Hose., 2010). Este órgano es un sitio primario de acumulación de sustancias extrañas. Además, se sugiere que el órgano linfoide es un sitio importante para la degradación viral mediante la formación de células esferoides (Rusaini - Owens L., 2010).

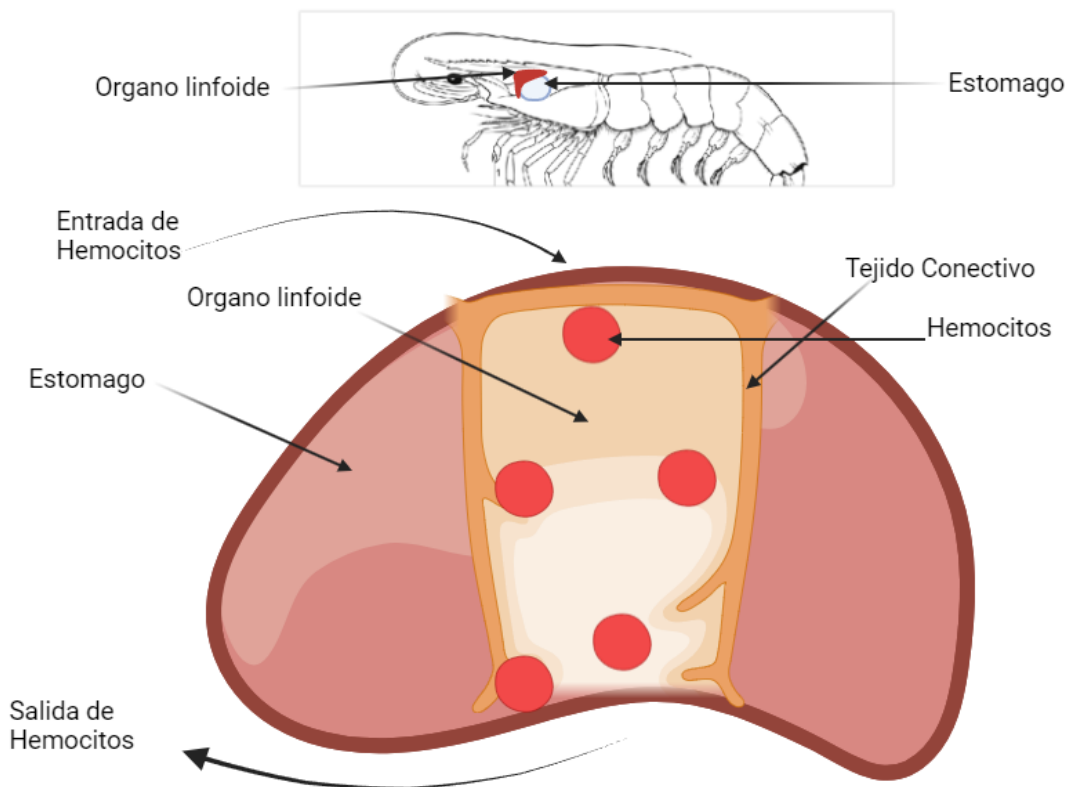


Figura 6: Imagen representativa del órgano linfoide , donde se muestra su ubicación fisiológica en el camarón, así como sus componentes descritos anteriormente.

Elementos celulares y humorales

Los hemocitos son células cruciales en las reacciones inmunitarias ya que son capaces de realizar diferentes funciones como fagocitosis, encapsulación de patógenos y formación de nódulos. Además de generación de moléculas citotóxicas como el óxido nítrico (NO) y el peroxinitrito (ONOO-), de enzimas lisosomales y de antioxidantes como el superóxido dismutasa (SOD), catalasa y la glutatión peroxidasa, siendo factores humorales y participando en la reparación de heridas (Söderhäll., 1992).

Pese a que a los hemocitos se les considera la principal célula inmunitaria, existen otras células involucradas en el SI como los podocitos o nefrocitos.

- *Podocitos o nefrocitos.* Están localizados en las branquias, entre sus funciones se encuentra el proceso de pinocitosis, en el caso del camarón está más relacionado con la pinocitosis de proteínas virales (Chen., 2011).
- *Células fagocíticas.* Se presentan en el corazón y están involucradas en filtrar sustancias del ambiente externo las cuales pueden contener residuos moleculares que pueden activar el SI. Sin embargo, no existe evidencia de que estén relacionadas con la fagocitosis de bacterias o virus como el del SMB (Cárcamo., 2016).
- *Fagocitos fijos.* Estos están ubicados en los espacios hemales del hepatopáncreas donde fagocitan gran cantidad de partículas como proteínas sueltas, bacterias y algunas proteínas virales (Chen., 2011).

Síndrome de mancha blanca (SMB).

Una de las enfermedades virales más importantes para la industria camaronera y para *L. vannamei* es el síndrome de mancha blanca (SMB), la cual es causada por un virus perteneciente a la familia Nimaviridae que comprende solo al género Whispovirus. Este virus cuenta con genoma de ADN de doble cadena, es de gran tamaño con viriones con ancho de 80-120 y largo de 250-380 nm y su genoma posee aproximadamente 290 kbp, con envoltura y posee forma elíptica (Jehle et al., 2006). Sus viriones, que es la parte la partícula vírica morfológicamente completa e infecciosa, son de forma ovoide a baciliforme con un apéndice en forma de cola en un extremo y circulan de forma ubicua en la hemolinfa de los camarones infectados. Los viriones poseen una nucleocápside en forma de bastoncillo, que normalmente mide de 65 a 70 nm de diámetro y 300 a 350 nm de longitud. Estas nucleocápsides contienen un núcleo de proteína de ADN delimitadas por una capa distintiva de la cápside que le da una apariencia entrecruzada, se envuelven individualmente para dar forma al virión (Van et al., 2001).

El virus del SMB al igual que muchos otros virus, requiere de la maquinaria nuclear de las células hospedera para poder sintetizar sus proteínas y con ellos infectar más células, el mecanismo que se cree que utiliza el virus es mediante endocitosis donde una vez el virus se encuentra en el endosoma es liberado el material genético uniéndose al material del núcleo (Yu D., 2022).

El SMB bajo condiciones de estanque, se manifiesta con la expansión de cromatóforos, lo que hace que tenga una coloración canela. Durante los primeros 30-50 días de cultivo en los estanques de producción, la aparición de manchas blancas embebidas en la cutícula del exoesqueleto indica la presencia de la enfermedad aun que en el cultivo de México los organismos suelen morir antes de presentarse las manchas. Los animales infectados nadan lentamente de forma errática cerca de la superficie, se van al fondo y mueren (Lightner D., 1996).

En las primeras etapas de la infección, diversos estudios han identificado que el epitelio cuticular es el principal tejido blanco del SMB, seguido por el tejido conectivo del organismo, el tejido hematopoyético y la glándula antenal (Medrano., 2019).

A nivel histopatológico, en los camarones infectados con SMB se observan células degeneradas, con cuerpos de inclusión intranuclear en núcleos hipertrofiados de células ectodermales y mesodermales de los apéndices, branquias, estómago, tejido conectivo, glándula antenal, órgano linfóide, tejido hematopoyético, hemolinfa y corazón (Syed - Musthaq et al., 2006). También se ha reportado necrosis general en el órgano linfóide caracterizada por la presencia de células con picnosis (Wang Y., 2002).

A nivel celular, inicialmente hay un evento de reconocimiento molecular y posteriormente se dan interacciones moleculares. Un ejemplo son los dominios tipo integrina, los cuales están presentes en las membranas de los hemocitos y células hematopoyéticas que actúan como receptores de los virus envueltos como el del SMB. Algunas proteínas de la envoltura viral tienen secuencias RGD (arginina-glicina-ácido aspártico) que pueden mediar la adhesión del virus a la integrina donde se interiorizan a la célula por medio de endosomas, soltando el material genético

hacia el núcleo, para su replicación y posteriormente provocar lisis celular expulsando más virus. Los tripéptidos RGD tienen funciones de reconocimiento celular e infectividad en una gran variedad de patógenos, así como receptores de quitina que poseen tropismos específicos con algunas proteínas virales (Chen et al., 2011; Li et al., 2016). Gracias al sistema circulatorio abierto, y que la hemolinfa baña todos los tejidos del organismo, convierte a los hemocitos en efectivas células transportadoras del virus.

Estrategias de acción contra el virus.

Se han realizado diferentes estrategias para combatir el SMB. Por un lado, la FAO (2020) dice que se ha apostado en mayor medida a la bioseguridad en las granjas camaroneras, ya que como actualmente han aumentado los conocimientos acerca de los factores que impulsan la aparición de la enfermedad en la acuicultura, los factores y vías que intervienen en la propagación de la enfermedad y gracias a este conocimiento, es posible llevar estrategias de bioseguridad más competentes. Sin embargo, las infecciones siguen ocurriendo pese a esto, además la identificación del virus se realiza de manera tardía cuando ya se haya esparcido.

Se han desarrollado estrategias que involucran al sistema inmune como son la inmunoestimulación o entrenamiento innato con retos del virus en poblaciones controladas por medio de dietas ricas en carotenos siendo importantes para el reconocimiento celular ante patógenos buscando reforzar las defensas y mantener sano el sistema inmune con el fin de una participación más activa ante el SMB y evitar coinfecciones, obteniendo diversos grados de eficacia (Cárcamo., 2016).

Incluso se han diseñado vacunas, que pese a la falta de sistema inmune adaptativo del camarón se busca alcanzar cierto grado de tolerancia e inmunización al virus mediante el entrenamiento de su sistema inmune innato. Entre estas vacunas se encuentran las de proteínas de subunidades (como la VP26), virus completos inactivados, vacunas de ADN y vacunas basadas en ARN, siendo esta última la de mayor tasa de protección sobre los otros tipos de vacuna (Feng S., 2018). Sin embargo, la protección no es permanente por lo que debe ser administrada de

manera constante lo que implica más dosis y esto a su vez implica un importante gasto (Feng S., 2018).

Otras estrategias que se han empleado son las enfocadas al mejoramiento genético, esto con el fin de tener líneas de *L. vannamei* resistentes a la enfermedad (Lillehammer M., 2020). Un ejemplo de ello es la utilización de programas de selección genética de *L. vannamei* en el cual se aplica el método de la selección genómica, que en comparación con la selección masal ha tenido mejores resultados. El uso de los datos genómicos dio como resultado estimaciones de heredabilidad más altas y mejoraron la precisión de la selección de organismos resistentes al SMB, sin embargo, no se sabe inmunológicamente donde se encuentran estas variaciones más allá de algunos marcadores genéticos. Por lo que la información a nivel celular, fenotípica y genotípica es necesaria para complementar estas estrategias y puedan tener una mayor precisión al momento de la selección o elaboración de alguna otra estrategia (Campos-Montes et al., 2020).

Análisis de asociación del genoma completo.

Con la aparición de paneles de genotipado de polimorfismo de nucleótido simple (SNP) de todo el genoma, la arquitectura genética de los rasgos cuantitativos y los loci que los controlan se han estudiado con un nivel más profundo de resolución mediante la aplicación de análisis de asociación del genoma completo (GWAS por las siglas en inglés de genome-wide association) (Georges M, 2019). Los GWAS aprovechan el desequilibrio de ligamiento de la población (LD) para identificar la asociación entre variantes genéticas particulares y la variación fenotípica de los rasgos relevantes que pueden ayudar en esquemas de selección (Yáñez J, 2013). Los GWAS pueden servir como base al brindar información sobre la arquitectura genética del rasgo que se desea investigar ya que evalúan la asociación entre cada marcador genotipado y un fenotipo de interés (Korte A, 2013), ya que arrojan datos genéticos, que pueden ser de interés para investigación genéticas más puntuales, dando información suficiente para la elaboración de una red genética. Los GWAS permiten detectar marcadores SNP con importancia significativa en la varianza del

fenotipo estudiado y que pueden estar relacionados con regiones del genoma ligadas a genes relacionados al carácter. Esto se realiza por medio del uso de herramientas básicas de alineación local (BLAST por la siglas en inglés de Basic Local Alignment Search Tool) que contrastan regiones genómicas relacionadas al SNP con bibliotecas de bases de datos públicas de genes, lo que permite la relación de SNP con genes particulares relacionados al fenotipo de interés.

Redes genéticas.

Entre las alternativas genéticas, una manera de abordar el problema de la falta de información experimental es mediante la creación de redes genéticas. Entendiendo que el gen es la unidad física y funcional básica de la herencia, los cuales están codificados en el ADN. Algunos genes actúan como instrucciones para producir moléculas llamadas proteínas por medio de la transcripción, el proceso de generación de una copia de ARN a partir de una secuencia de ADN de un gen (Watson, 2016). Por ello las redes genéticas son una herramienta representativa de la interacción que pueden llegar a tener estos genes, y las ordenes subsecuentes hasta realizar cierta función, por lo que representan una estrategia importante para contextualizar datos de expresión de genes ante estímulos específicos. Sirven para poder comprender los procesos bioquímicos que ocurren dentro de las células y que pueden influir en la expresión de un fenotipo específico. En este tipo de redes los genes son representados mediante nodos y, la co-expresión o co-relación estadística entre los genes es representada por vértices uniendo los nodos. Entre la información que puede obtenerse de estos análisis, se encuentra la identificación de procesos bioquímicos y celulares mediante enriquecimiento de vías bioquímicas, así como, la identificación de probables blancos moleculares para regular las vías involucradas en un proceso específico. Adicionalmente, el análisis de redes como modelos dinámicos permiten proponer elementos o procesos no descritos previamente (Nacu, 2007).

En general, las redes son herramienta para análisis a nivel de sistemas genéticos sobre el destino celular a través de la interconexión de elementos moleculares,

como señales bioquímicas proporcionadas por el microambiente (Enciso, 2019). En las primeras propuestas de redes genéticas que se crearon, los nodos podían ser de dos tipos: los “lugares”, que permiten representar las variables de estado del sistema, y las transiciones, que están relacionadas con la evolución de los estados del sistema y en segundo lugar, los “valores” de las variables de estado, que determinan el estado del sistema y está compuesto por las marcas contenidas en cada lugar (Latorre, 2022).

La representación y análisis de sistemas como redes tiene su origen en 1969 con la red Booleana descrita por Stuart Kauffman para modelar redes de regulación genética (Kauffman, 1969). Kauffman describe a los organismos como autómatas moleculares, por lo que crear un modelo de red con una función booleana (encendido – apagado) que comprende números binarios, podría dejar ver que, si cada gen está directamente afectado por otros dos o tres genes, entonces dicha red se comporta con cierto orden y estabilidad, además de que experimentan ciclos de comportamiento cuya duración predice el tiempo de replicación celular en función del número de genes por célula, con ello sugirió la posibilidad de una teoría general del comportamiento metabólico. El modelado de sistemas por redes genéticas es muy útil cuando la información de cierto proceso o evento que involucre genes es escasa. Es posible obtener mediante procesos computacionales o de forma manual relaciones que no son visibles por modelos experimentales, además de que pueden realizarse a diferentes niveles, lo que se traduce a que puede trabajarse e interpretarse no solo con genes, sino también con moléculas o macromoléculas ayudando aún más cuando la información es escasa haciéndolas flexibles para el investigador.

OBJETIVO

Generar una red genética que permita analizar y comprender los mecanismos de la respuesta inmune de *L. vannamei* ante la infección por el virus del Síndrome de Mancha Blanca.

Pregunta de investigación

¿Cómo puede una red genética contribuir a la identificación de procesos inmunológicos clave en la respuesta del camarón *Litopenaeus vannamei* al síndrome de mancha blanca?

Hipótesis

La creación de una red genética permitirá un entendimiento más integral de la interacción entre el virus del SMB y el *L.vannamei*

METODOLOGÍA

Origen de los datos

La obtención de los datos se tomó a partir de una población de *L.vannamei* la cual se originó en el núcleo genético de la empresa Maricultura del Pacífico, ubicado en Rosario, Sinaloa, en el noroeste de México. Se utilizó información del ciclo de selección de 2020, partiendo de 176 familias que fueron desafiadas a una infección controlada del virus del SMB. El desafío experimental se realizó en la Unidad de Desafío a Enfermedades (UDE) de la misma empresa. Los organismos fueron inoculados con el virus en el Laboratorio de Virología del CIAD (Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, utilizando un aislado viral de un brote natural en una granja camaronera intensiva ubicado en el sur del estado de Sinaloa, México. Camarones saludables (promedio de 14 g) fueron inoculados por vía intramuscular con 100 µL de un 10⁻³ dilución del aislado viral. Al presentar síntomas de SMB o muerte, fueron muestreados y recolectados para confirmar la presencia del virus por PCR. Los genes con sus proteínas que codifican para el inicio de la red genética se detectaron vía estudio de asociación del genoma completo con un Chip desarrollado por Neogen® (Nebraska, EE. UU.), que contiene 50.811 SNP y a partir de un GWAS de *L. vannamei* se detectaron genes de relevancia, resultando en una lista de 27 genes putativos con sus respectivas proteínas (LOC113824579, Arylsulfatase B-like, GDNF-inducible zinc finger protein 1-like, D-beta-hydroxybutyrate

dehydrogenase mitochondrial-like, Putative mediator of RNA polymerase II transcription subunit 26, Histone acetyl transferase KAT6A-like, Zinc finger protein 346-like, Proline-rich protein PRCC-like, Leucine-rich repeat transmembrane neuronal protein 4-like, Beta-1,3-galactosyltransferase 5-like, LOC113821448, Selenocysteine lyase-like, Protein SMG9-like, 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2-like, Zinc finger protein 395-like, THO complex subunit 2-like, Glycine, alanine and asparagine-rich protein-like, Glycine-rich protein 5-like, Keratin, type I cytoskeletal 10-like, Risikin-39-like, Keratin, type II cytoskeletal 3-like, Acanthoscurrin-1-like, LOC113811337, RNA polymerase II elongation factor ELL-like, Filaggrin-2-like, Exocyst complex component 1-like, Putative uncharacterized protein YHR217C). Conteniendo información del cromosoma donde se encuentra (Medrano-Mendoza et al., 2023).

Generación de la red curada manualmente

Se realizó una búsqueda exhaustiva en la literatura a partir de los genes putativos obtenidos sobre la participación de los genes obtenidos en la respuesta inmune y otras vías fisiológicas de *L. vannamei* o especies similares. El tipo de datos que se buscaron fueron descriptivos, sobre la función, factores transcripcionales e interacciones específicas, así como los procesos o ruta metabólica en el que interviene. La información se recolectó a partir de la revisión de artículos científicos donde se haya mencionado la participación del gen en cuestión, estos artículos científicos se obtuvieron de bases de datos como la EBSCO y la biblioteca electrónica de la UAM.

A sí mismo, para la corroboración de datos obtenidos a partir de la literatura se utilizaron herramientas como STRING (<https://string-db.org/>) y la Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG). STRING es un portal de acceso libre donde se tienen datos de interacciones proteína - proteína que ya han sido descritas o cuentan con homologías en distintas especies, ya que las proteínas están asociadas cuando existe evidencia que sugiere una asociación funcional específica entre las dos. Con herramientas como STRING es posible obtener información de proteínas que están físicamente asociadas entre sí en un complejo proteico o en

una interacción transitoria, pero también proteínas que están indirectamente asociadas y que pueden trabajar hacia un objetivo común en una vía metabólica o de señalización, que pueden regularse entre sí a través de intermediarios contribuir conjuntamente a una estructura celular común (Nacu., D, 2007). KEGG es un recurso de base de datos curado manualmente que integra varios objetos biológicos categorizados en información de sistemas, genómica, química y de salud por lo que, a diferencia de los modelos de inteligencia artificial y aprendizaje automático KEGG se crea manualmente utilizando inteligencia humana y capturando el conocimiento informado en la literatura publicada la cual ya posee con rutas conocidas para genes en distintos organismos y proceso en el que están involucrados.

La información recolectada de la revisión bibliográfica y el uso de las herramientas STRING y KEGG fue organizada en una base de datos sobre el tipo de interacción, se buscó priorizando que sea en *L. vannamei*, cuando no se encontró información de la especie, se buscó en la familia de los peneidos como: *Penaeus monodon*, *Litopenaeus setiferus*, *Parapenaeus longirostris*, entre otros miembros de la familia con el fin de obtener información sobre si la interacción está involucrada en el sistema inmunológico o en mecanismos de resistencia. Esta información fue organizada en una tabla donde se pudiera seguir las interacciones tanto río arriba como río abajo resaltando los genes de interés y el gen con el que se inició (input), también con la finalidad de encontrar posibles intersecciones que tengan con algún otro gen de la lista inicial. En paralelo se capturan las relaciones del gen en cuestión con sus interacciones, describiendo el tipo de proceso que realizan. Una vez obtenida la red curada de forma manual, teniendo como criterios de inclusión y un procedimiento específico para construir la red que fue:

- Si el proceso y el gen en cuestión se ha reportado en trabajos, se puede complementar la ruta involucrada con bases de datos genéticas como KEGG y STRING además de complementar información con bases como Genecards y el NCBI y conocer los genes involucrados en el proceso de la ruta.

- Una vez identificada la ruta, reunir información sobre el estado de esta sin alteración externa, es decir, es un estado sano, sin la presencia del virus y por ende de la enfermedad ya que esto podría cambiar el funcionamiento de la ruta.
- Se denota de forma visual en la red las interacciones entre genes con una simbología específica para los genes de la ruta
- En caso de la información genética subsecuente de las rutas sea escasa o inexistente, se podrá subir el nivel de interacción (moléculas, enzimas , polisacáridos, etc.)

Resultados

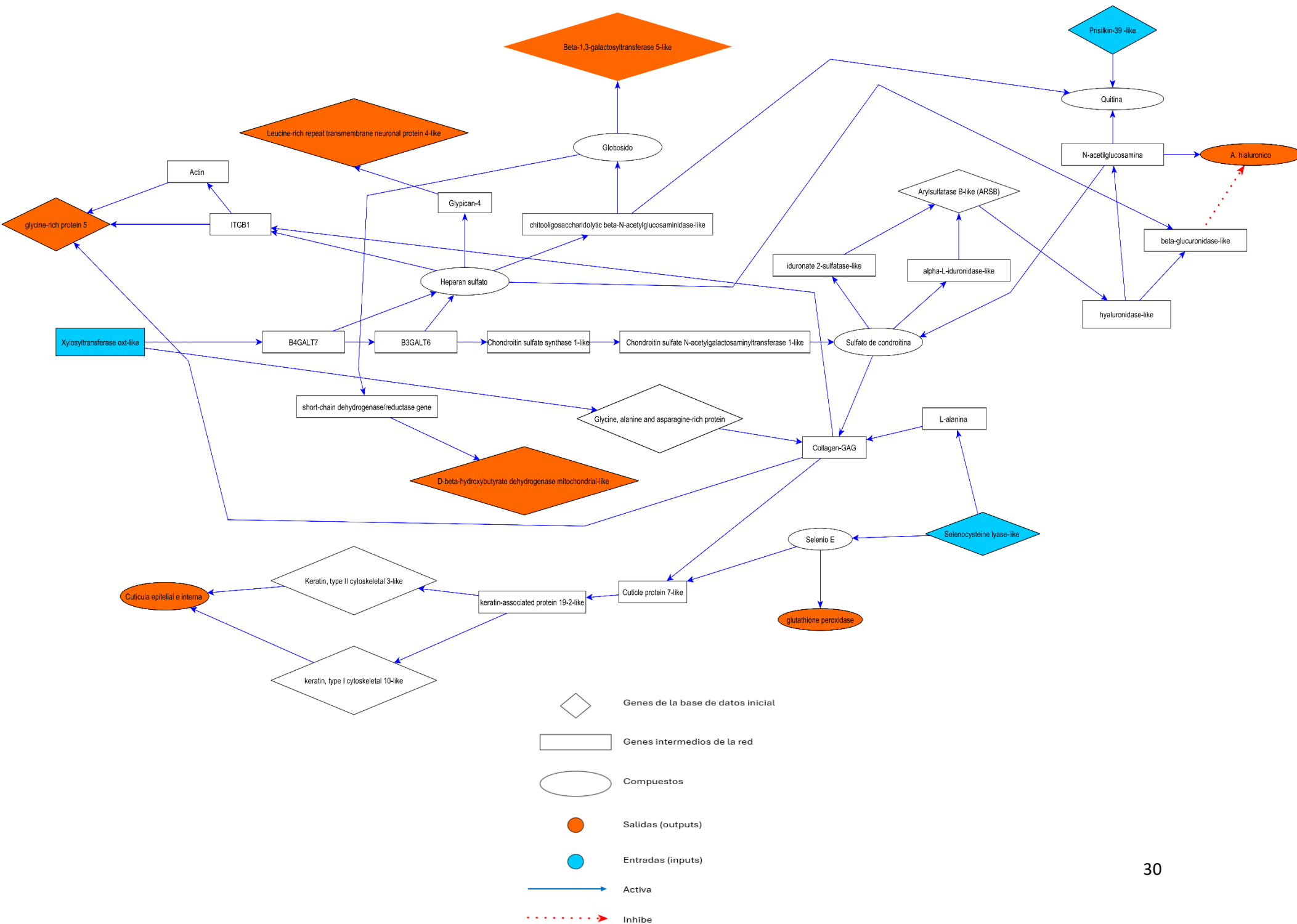


Figura 7: Red curada manualmente sobre genes y moléculas relacionadas alrededor de la base de datos inicial y los genes que esta contenía.

En la red curada manualmente, como se observa en la figura 7, existen deferentes simbologías:

- Los rombos representan los genes obtenidos del reto viral y por ende de la base de datos original
 - Los rectángulos representan genes intermedios de la red, lo que se refiere a genes obtenidos mediante la investigación de las diversas fuentes
 - Los óvalos representan compuestos entre las interacciones genéticas, esto debido a que existe poca información genética en los procesos subsecuentes y son importantes para reacciones subsecuentes
 - Las flechas azules representan una interacción positiva o activa mientras que
 - Las flechas rojas punteadas son interacciones negativas o inhibitorias,
- También existe una colorimetría, la donde el azul representa las entradas a la red o inputs y los naranjas representa las salidas u outputs.

Es necesario saber la acción específica que lleva el gen en la ruta, llevando el control en una tabla como base de datos como se puede ver en la tabla 1, proporcionando información sobre el tipo de acción del gen (inhibe o activa).

Tabla 1: Interacciones específicas entre gen (con su proteína a la que codifica) y moléculas de la red genética.					
Entrada	Salida	Reacción De la interacción	Molécula que codifica	Tipo de reacción	Referencias
Xylosyltransferase oxt-like (oxt)	Beta-1,4-galactosyltransferase 7 (B4GALT7)	Transfiere D-xilosa a residuos de serina de una proteína común	Enzima	Activa	T-3, KEGG

Beta-1,4-galactosyltransferase 7 (B4GALT7)	Beta-1,3-galactosyltransferase 6-like (LOC113821037)	Une la primera galactosa en el enlace carbohidrato-proteína	Proteína	Activa	T-3, KEGG
Beta-1,3-galactosyltransferase 6-like ((LOC113821037)	Chondroitin sulfate synthase 1-like (Chsy)	Transfiere galactosa de UDP-galactosa a sustratos con un residuo de galactosa	Proteína	Activa	T-3, KEGG
Chondroitin sulfate synthase 1-like (Chsy)	Chondroitin sulfate N-acetylgalactosaminyltransferase 1-like (LOC113827476)	Transfiere ácido glucurónico	Enzima	Activa	T-3, KEGG
Chondroitin sulfate N-acetylgalactosaminyltransferase 1-like (LOC113827476)	Sulfato de condroitina	Transfiere 1,4-N-acetilgalactosamina	Enzima	Activa	T-3, KEGG
Sulfato de condroitina	Iduronate 2-sulfatase-like (ids)	Hidroliza el enlace éster de sulfato C2	glucosaminoglucano sulfatado	Activa	T-3, KEGG
Sulfato de condroitina	Alpha-L-iduronidase-like (Idua)	Hidrolizar ácido alfa-L-idurónico no sulfatado	glucosaminoglucano sulfatado	Activa	T-3, KEGG
Iduronate 2-sulfatase-like (ids)	Arylsulfatase B-like (ARSB)	Hidrolizar S-glicosilo	Enzima	Activa	T-2
Alpha-L-iduronidase-like (Idua)	Arylsulfatase B-like (ARSB)	Hidrolizar S-glicosilo	Enzima	Activa	T-2
Arylsulfatase B-like (ARSB)	Hyaluronidase-like (LOC113823457)	Hidroliza los grupos sulfato de N-Acetil-D-galactosamina	Proteína	Activa	T-2
N-acetilglucosamina	Quitina	Polimerización	Aminomonosacárido	Activa	T-1
Quitina	Chitin-binding protein	Polimerización	Polisacárido	Activa	T-1
Hyaluronidase-like (LOC113823457)	Beta-glucuronidase-like (LOC113809135)	Despolimeriza los enlaces 1-4 de N-acetil y glucoronato	Proteína	Activa	T-1
Beta-glucuronidase-like (LOC113809135)	A. hialuronico	Hidrolizar O- y S-glicosilo	Enzima	Innive	T-2
Heparan sulfato	Glypican-4	Formación enlace glicosil fosfatidilinositol para heparan con la	glucosaminoglucano sulfatado	Activa	T-2

		membrana celular			
Beta-1,4-galactosyltransferase 7 (B4GALT7)	Heparan sulfato	Une la primera galactosa en el enlace carbohidrato-proteína	Enzima	Activa	T-2
Beta-1,3-galactosyltransferase 6-like (B3GALT6)	Heparan sulfato	Transfiere galactosa de UDP-galactosa a sustratos con un residuo de galactosa	Enzima	Activa	T-2
Glypican-4	Leucine-rich repeat transmembrane neuronal protein 4-like (LOC113821325)	Actúan como receptores funcionales para la molécula de adhesión postsinaptogénica	Proteína	Activa	T-2
Chitooligosaccharidolytic beta-N-acetylglucosaminidase-like (LOC113804791)	Globósido	Cataliza la hidrólisis de p-nitrofenil-beta-D-GlcNAc	Enzima	Activa	T-4
Globosido	Beta-1,3-galactosyltransferase 5-like ((B3GAL3)	Cataliza la transferencia de Gal a aceptores basados en GlcNAc	Oligosacárido	Activa	T-4
Chitooligosaccharidolytic beta-N-acetylglucosaminidase-like (LOC113804791)	Quitina	Cataliza la hidrólisis de p-nitrofenil-beta-D-GlcNAc	Enzima	Activa	T-4
Globosido	Short-chain dehydrogenase (LOC113801949)	Oxidoreductas a dependiente de NADPH que cataliza la reducción de compuestos dicarbonilo.	Proteína	Activa	T-5, T-6
Short-chain dehydrogenase/reductase gene (LOC113801949)	D-beta-hydroxybutyrate dehydrogenase mitochondrial-like (LOC113800614)	Cataliza la reducción de compuestos dicarbonílicos.	Enzima	Activa	T-5, T-6
Heparan sulfato	ITGB1	Trabaja en conjunto con la matriz de la membrana celular	glucosaminoglucano sulfatado	Activa	T-5, T-6
ITGB1	Actin	Cataliza cascada de reconocimiento	Proteína	Activa	T-7, T-8

ITGB1	Glycine-rich protein 5 (LOC113811343)	Caliza la producción y dispersión de crustin	Proteína	Activa	T-7, T-8
Actin	Glycine-rich protein 5 (LOC113811343)	Caliza la producción y dispersión de crustin	Proteína	Activa	T-7, T-8
Sulfato de condroitina	Collagen-GAG	Actúan en conjunto para la formación de la matriz de la membrana celular	Glicosaminoglucano	Activa	T-9
Collagen-GAG	Glycine-rich protein 5 (LOC113811343)	Vinculación al núcleo del polipéptido para conectar dos fibrillas/fibras de colágeno y proporcionar la fuerza intermolecular	Glucoproteína	Activa	T-9
Selenocysteine lyase-like (LOC113821395)	L-alanina	Cataliza la conversión de L-selenocisteína dependiente de fosfato 5-primo de piridoxal	Proteína	Activa	T-9
L-alanina	Collagen-GAG	Creación de cadenas polipeptídicas para hidroxilación de otros aminoácidos	Aminoácido	Activa	T-9
Selenocysteine lyase-like (LOC113821395)	Selenio E	Cataliza la conversión de L-selenocisteína dependiente de fosfato 5-primo de piridoxal	Proteína	Activa	T-9
Selenio E	Glutathione peroxidase	Reducción a seleniuro por los sistemas glutatión-glutarredoxina y tioredoxina	Compuesto	Activa	T-9
Collagen-GAG	Glycine, alanine and asparagine-rich protein (LOC113811340)	La triple hélice de colágeno está compuesta por tres cadenas de procolágeno interconectada	Aminoácidos	Activa	T-10, kegg

		s por enlaces covalentes formados por glicina			
Xylosyltransferase oxt-like (oxl)	Glycine, alanine and asparagine-rich protein (LOC113811340)	Crean constricción dentro de la hendidura de la molécula para la unión del péptido serina seguido de alanina o glicina	Aminoácido	Activa	T-3, kegg
Collagen-GAG	Cuticle protein 7-like (LOC113803368)	Ayuda a uno proteínas entre sí por uniones C-C entre residuos de tirosina para una esclerotización	Proteína	Activa	T-10
Selenio E	Keratin-associated protein 19-2-like	Ayuda a uno proteínas entre sí por uniones C-C entre residuos de tirosina para una esclerotización	Proteína	Activa	T-10
Keratin-associated protein 19-2-like (LOC113805240)	Keratin, type I cytoskeletal 10-like (LOC113811344)	Ayuda a uno proteínas entre sí por uniones C-C entre residuos de tirosina para una esclerotización	Proteína	Activa	T-10
Keratin-associated protein 19-2-like (LOC113805240)	Keratin, type II cytoskeletal 3-like (LOC113811342)	Ayuda a uno proteínas entre sí por uniones C-C entre residuos de tirosina para una esclerotización	Proteína	Activa	T-10
Prisilkin-39 -like (LOC113811345)	Quitina	Participa en el proceso de construcción de cutículas quitinosas	Proteína	Activa	T-11

Tabla 2: Genes de la red genética que se encontraban en la base de datos original con los procesos/vías donde están involucrados

No	Gen/ID	Proteína	Interacción directa en la red	Proceso/función reportada
1	ARSB	Arylsulfatase B-like	hyaluronidase-like	Degradación de Sulfato de condroitina
2	LOC113824573	D-beta-hydroxybutyrate dehydrogenase mitochondrial-like	short-chain dehydrogenase/reductase gene	Cataliza cuerpos cetónicos producidos durante el catabolismo de los ácidos grasos en la membrana mitocondrial
3	LOC113821325	Leucine-rich repeat transmembrane neuronal protein 4-like	Glypican-4	Permite unión de heparán sulfato en células nerviosas
4	B3GALT5	Beta-1,3-galactosyltransferase 5-like	Globósido	Participa en la ruta de síntesis de glicosfingolípidos en la membrana globo e isoglobo
5	LOC113821395	Selenocysteine lyase-like	L-alanina Selenio E	participa en el metabolismo de los selenoaminoácidos y síntesis de enzimas antioxidantes
6	LOC113811340	Glycine, alanine and asparagine-rich protein-like	Xylosyltransferase oxt-like Collagen-GAG	Involucrado en la síntesis de péptidos antimicrobianos
7	LOC113811343	Glycine-rich protein 5-like	Actin ITGB1 Collagen-GAG	Participa en síntesis de crustin
8	LOC113811344	Keratin, type I cytoskeletal 10-like	keratin-associated protein 19-2-like	Participa en la modulación de la integración del citoesqueleto
9	LOC113811345	Prisilkin-39-like	Quitina	Participa en la creación de exoesqueleto y conchas al unirse a la quitina y la esclerotización de esta

10	LOC11381134 6	Keratin, type II cytoskeletal 3-like	keratin-associated protein 19-2-like	Participa en la modulación de la integración del citoesqueleto
----	------------------	---	---	---

Una vez identificadas las interacciones donde se encuentran los genes de la base de datos es posible aislarlos y con ello tener una visión más general de los procesos donde están involucrados los genes como se ve en la tabla 2 y con ello una posible visualización de su alteración ante la infección por el SMB.

La red se realizó pensando en *L.vannamei* en un estado sano o neutro (sin alteraciones), desde aquellos genes putativos obtenidos del GWAS para resistencia a SMB para posteriormente discutir como estos genes pudieron actuar en esta población resistente retada con el virus teniendo en consideración la interacciones que existen en ese estado sano como se puede ver en la tabla 2. Y con el fin de una discusión más ordenada para las posibles interacciones con el virus, estos genes con sus interacciones se clasificarán en diferentes niveles con relación a su función y localización a nivel celular.

Se realizó la red genética curada manualmente con información genética sin embargo Para mayor comprensión de la red se llevó su simbología a nivel de nombre de proteína como se puede observar en la figura 7, esto debido a que se llevó a cabo considerando conexiones a diferentes “niveles”, como son proteínas, enzimas e incluso compuestos complejos y dado a que la simbología de muchos de los genes obtenidos tanto los iniciales por el GWAS como aquellos genes obtenidos de bases de datos y artículos científicos tienen un nombre/símbolo que puede resultar confuso es que fue considerado poner el nombre de la proteína a la codifican.

Discusión.

Algunos de los genes putativos (aquellos mostrados en la tabla 2) reportados a partir del análisis del genoma completo después del reto viral, se han relacionado a ciertos procesos celulares que podrían tener importancia durante la infección ante el virus del SMB. Estos procesos celulares están regulados por vías de señalización que determinan funciones fisiológicas y celulares (Morales., 2008; Medrano M., 2019). En este estudio se clasificaron estos genes en diferentes niveles con relación a su función y localización a nivel celular.

En primer nivel, se tienen los genes involucrados en vías a nivel de citoesqueleto epitelial y utilización de quitina para la cutícula (de orígenes extracelulares). Como segundo nivel se clasificaron los genes relacionados a la membrana celular y la matriz extracelular (de origen extracelular, pero se interiorizan los procesos). En el tercer nivel se clasificaron los genes relacionados a productos celulares como moléculas (de origen intracelular que se exteriorizan).

En referencia al primer nivel se tienen los genes y sus proteínas que codifican:

- LOC113811344 (Keratin, type I cytoskeletal 10-like)
- LOC113811346 (Keratin, type II cytoskeletal 3-like)
- LOC113811345 (Prisilkin-39-like)

Las proteínas *Keratin, type I cytoskeletal 10-like* y *Keratin, type II cytoskeletal 3-like* modulan la integración del citoesqueleto en las células epiteliales; esto permite el soporte estructural intracelular, el transporte de materiales y el movimiento de cromosomas durante la división celular del epitelio cuticular (Wang., 2014). El epitelio cuticular es donde el exoesqueleto se forma durante el crecimiento del camarón, esto mediante proteínas fijadoras de quitina, que son capaces de unir la quitina a las células del epitelio cuticular (Yang et al., 2020). En el estudio de Chen et al. (2007) se describió una proteína fijadora de quitina de *Penaeus monodon* (PmPFQ), la cual interactúa específicamente con una proteína de la envoltura del virus del SMB definida como VP53A de forma positiva y esta interacción promueve

la infección viral temprana; mientras que la neutralización *in vivo* de VP53A y de PmPFQ redujo y retrasó la mortalidad en camarones infectados. Las proteínas *Keratin, type I cytoskeletal 10-like* y *Keratin, type II cytoskeletal 3-like*, al promover la integración de citoesqueleto de las células del epitelio cuticular permiten condiciones óptimas y saludables para favorecer el crecimiento del camarón. La expresión de estos genes que codifican a estas proteínas podría favorecer a una menor penetración del virus en una infección temprana hacia el epitelio cuticular. Yu et al. (2022) observó en un reto de infección con SMB una sobre expresión de genes estructurales, entre ellos genes que codificaban a las proteínas *Keratin, type I cytoskeletal 10-like*, *Keratin, type II cytoskeletal 3-like* y como resultado de ello una menor infección temprana. Con base en los antecedentes experimentales y nuestros resultados se puede proponer, que como mecanismo de patogenicidad el virus presenta tropismo hacia las células del epitelio cuticular, donde la expresión putativa de los genes antes descritos, modulan la interacción del virus SMB con el epitelio cuticular lo que se ve reflejado en una disminución de la infección temprana que tiene como consecuencia una menor mortalidad del camarón.

Estos genes también estimulan respuestas inmunitarias en el camarón una vez montada la infección viral. Wang L. (2014) observó que mediante estimulaciones continuas con proteínas virales del SMB llevaban a una integración más rápida del citoesqueleto, promoviendo a su vez respuestas fagocíticas y de síntesis de PA por parte de los hemocitos, a pesar de que en nuestra investigación no se evaluó la carga viral *in vivo* se sabe por antecedentes que la tasa de supervivencia de camarones infectados con SMB fue mayor en comparación a otras líneas de camarón (Gallaga-Maldonado et al., 2020; Campos-Montes et al., 2020). Los genes y sus proteínas (*Keratin, type I cytoskeletal 10-like*, *Keratin, type II cytoskeletal 3-like*) no han sido descritos a detalle en todos los procesos en los que están involucrados y por lo tanto su importancia ante el SMB no está del todo documentada pese a que hay antecedentes de su relación en la enfermedad (Yu et al., 2022; Wang et al., 2014; Wang et al., 2021) donde podrían favorecer mecanismos inmunológicos innatos para combatir al virus, sin embargo es necesaria más investigación para evaluar y comprobar los mecanismos específicos.

El Prisilkin-39-like está relacionado al proceso de esclerotización mediante la utilización de sales minerales formando la estructura de la misma cutícula (Zhang et al.,2015), los cuales se llevan a cabo en dos sitios anatómicos; el exoesqueleto y la cutícula gastrointestinal (Yang et al., 2020). En crustáceos el intestino está cubierto por cutícula la cual forma parte de las barreras físicas que proporcionan la primera línea de defensa contra ataques físicos, daño químico e infección por patógenos (Yang et al., 2020). Esta la proteína codificada por LOC113811345 es uno de los detectados por medio del GWAS en los camarón del reto viral, lo cual podría ser un indicador de un proceso de esclerotización más rápida durante la infección, aunque con esto existe la posibilidad de un crecimiento menor de los camarones infectados; esto concuerda con observaciones en campo (datos no publicados) de líneas de camarones resistentes a SMB que presentan un menor tamaño. Por otro lado, Chen K et al., (2009) encontró que una proteína fijadora de quitina interactúa con al menos otras diez proteínas de la envoltura del virus del SMB (VP24, VP110,VP53B, VP337, VP32, VP124, VP41A, VP51B, VP60A y VP39B) lo que da una evidencia de lo importante que es el proceso de formación de la cutícula en la infección viral y por lo tanto es un punto para poder reducir su patogenicidad. Podríamos suponer que si la cutícula se endurece más rápido existirían menos proteínas fijadoras de quitina disponibles ante las proteínas virales, llevando a una menor probabilidad de infección, dando evidencia a mecanismos de protección.

Estos tres genes de este nivel en conjunto promueven la utilización de los recursos (quitina y sales minerales) para la formación de cutícula, además de mantener la integridad del epitelio cuticular, haciendo más difícil la entrada del virus a los tejidos blanco (Yu et al., 2022).

El segundo nivel corresponde a los genes y su proteína que codifican:

- ARSB (Arylsulfatase B-like)
- LOC113821325 (Leucine-rich repeat transmembrane neuronal protein 4-like)
- B3GALT5 (Beta-1,3-galactosyltransferase 5-like)

- LOC113824573 (D-beta-hydroxybutyrate dehydrogenase mitochondrial-like)

Las proteínas Arylsulfatase B-like y Leucine-rich repeat transmembrane neuronal protein 4-like, están relacionadas a vías de uso y degradación de proteoglicanos, mientras que Beta-1,3-galactosyltransferase 5-like y D-beta-hydroxybutyrate dehydrogenase mitochondrial-like están relacionados a vías de uso de lípidos por parte de las células.

La condroitina en los camarones tiene participación en la síntesis y el correcto funcionamiento de la matriz extracelular (Bedini et al., 2019), promoviendo la comunicación entre células, este proteoglicano tiene complejos de acoplamiento molecular (Mizumoto., 2015). El gen ARSB, tiene un rol importante en la degradación de esta condroitina despolimerizando a monómeros sus componentes; Ren y Lu (2021) encontraron que la sobreproducción de condroitina en la matriz extracelular de camarones ante un reto con SMB aumenta la infección temprana mientras que el silenciamiento de genes relacionados a la síntesis de esta condroitina disminuye la infección temprana y la mortalidad de *L. vannamei*. Nuestra red muestra expresión de ARSB, lo que nos lleva a pensar que la resistencia a la infección mostrada en nuestros camarones retados estuviera influenciada por el efecto de la expresión de este gen; ya que habría una mayor degradación de la condroitina disponible, su degradación sobre regulada estaría evitando la interacción entre el virus y la matriz extracelular lo que disminuiría la infección de las células. También encontraron que el dominio C-terminal de proteínas de la cápside del virus definidas como VP26 y VP28 interactúan con el dominio N-terminal de la condroitina. Esto nos permite hipotetizar que una mayor degradación de la condroitina mediada por Arylsulfatase B-like (ARSB) en la matriz extracelular resultaría en menos dominios N-terminales disponibles para las proteínas virales y por ende a una menor infección celular.

El heparán sulfato es otro proteoglicano importante en el correcto funcionamiento celular, siendo importante para la plasticidad y comunicación celular. La proteína Leucine-rich repeat transmembrane neuronal protein 4-like está involucrado en el

proceso de unión del heparán sulfato a las células del sistema nervioso participando en la regulación del ensamblaje de la sinapsis y actuando dentro de la agrupación del receptor de glutamato AMPA (Bedini et al., 2019). En nuestros resultados obtenidos mediante la elaboración de la red observamos que el gen que codifica esta proteína posterior a la polimerización de monómeros y la formación de heparán sulfato tiene actividad regulando la comunicación de las células nerviosas. Se ha descrito que las células nerviosas al ser infectadas por el SMB generan signos notables durante su patogenia temprana como el letargo y la anorexia (Weiss., 2017). Li et al. (2016) observó que las células nerviosas infectadas con SMB también inducen una alta captación de glutamato, conduciendo a una anaplerosis impulsada por el glutamato, demostrando que este proceso forma parte de la patogenia del virus SMB en células nerviosas. Nuestros resultados podrían sugerir que el gen codifica a Leucine-rich repeat transmembrane neuronal protein 4-like tiene un papel de estabilizador del receptor de glutamato AMPA regulando la captación normal de glutamato y con ello favoreciendo la correcta transmisión sináptica rápida lo que se traduce en camarones con menor presencia de signos de daño nervioso antes mencionado.

El gen B3GALT5 está relacionado a la ruta de biosíntesis de glicoesfingolípidos, específicamente de la ruta globo e iso-globo, lo que lleva la creación de globósidos los cuales son un componente importante de la membrana celular, donde su grupo de azúcar se orienta hacia el espacio extracelular fungiendo en interacciones con hormonas y receptores de la maquinaria de transducción de señales y, por lo tanto, regulan las vías de señalización celular (Porubsky., 2014). Los glicoesfingolípidos en sí mismos son componentes indispensables de la membrana celular ya que regulan la capacidad osmorreguladora de los crustáceos al cambiar las estructuras de su membrana celular y ordenamiento de las bicapas lipídicas (Li et al., 2006; Chen et al., 2014). Con relación a nuestros resultados, la expresión de este gen relacionado a procesos lipídicos es importante ya que el virus del SMB ha mostrado tener capacidad de alterar estos procesos, favoreciendo la replicación viral, creemos que la expresión puntual de este gen estaría estimulando la producción de glicoesfingolípidos impidiendo el ingreso y la replicación viral (Ng et.al., 2023). Los

Globósidos e iso-globósidos desempeñan un papel importante como receptores celulares de antígenos y toxinas; con relación a algunas infecciones virales han mostrado tener tropismo con virus favoreciendo la propagación de viriones, como es el caso del parvovirus humano, donde los globósidos favorecen el escape endosómico de los viriones por disrupción de la membrana (Porubsky., 2014; Bieri., 2024), nuestros resultados indican que por medio de la expresión del gen B3GALT5, la ruta de los globósidos pudiera tener participación en la infección viral de SMB pero en este caso disminuyendo la propagación de viriones y promoviendo la resistencia al SMB. La ruta de los globósidos no ha sido ampliamente descrita e investigada en camarón lo que abre una ruta de investigación para ver sus efectos concretos de esta vía y un mejor entendimiento fisiológico en general en camarón.

La proteína D-beta-hydroxybutyrate dehydrogenase mitochondrial-like, participa en la catalización de cuerpos cetónicos producidos durante el catabolismo de los ácidos grasos en la membrana mitocondrial de forma natural (Mountassif et.al., 2007), durante la infección del virus del SMB el virus causa permeabilización de la membrana mitocondrial de los hemocitos, de células de tejido conectivo y células del epitelio cuticular de *L.vannamei* entre otras células lo que provoca la disminución de la utilización de glucosa y genera una alteración de la producción de energía en las etapas tempranas y tardías de la infección SMB (Chen et., al 2011). También Ng et al. (2023) observó cómo el virus del SMB modula el metabolismo de los ácidos grasos en células del camarón, donde afecta principalmente la mitocondria y su membrana, ya que el virus inhibe la β -oxidación mediante lipólisis inducida, sugiriendo que los ácidos grasos tienen una gran demanda en la etapa de morfogénesis del virión, resultando en aumento número de viriones en etapa temprana y tardía (Ng et.al., 2023; Chen et al., 2011). Los resultados mostrados en nuestra red podrían sugerir que LOC113824573 (D-beta-hydroxybutyrate dehydrogenase mitochondrial-like) en la vía catalítica de cuerpos cetónicos estaría ayudando en los camarones infectados a mantener el proceso normal de β -oxidación, siendo utilizados los cuerpos cetónicos en la producción de energía de la mitocondria ayudando a mantener la integridad de la membrana mitocondrial y a su vez evitando que las células infectadas se queden sin energía para realizar sus

funciones básicas. Sin embargo, aún es necesaria más información y pruebas *in vivo*.

Por último, tenemos al tercer nivel con genes y su proteínas relacionados a vías de productos celulares:

- LOC113811340 (Glycine, alanine and asparagine-rich protein-like)
- LOC113811343 (Glycine-rich protein 5-like)
- LOC113821395 (Selenocysteine lyase-like)

En caso de las dos primeras proteínas: Glycine, alanine and asparagine-rich protein-like y Glycine-rich protein 5-like están relacionados a vías involucradas en la síntesis de péptidos antimicrobianos (PA) y en el caso del Glycine-rich protein 5-like específicamente del “crustin”.

Los PA son de vital importancia ya que al ser parte de las barreras químicas actúan como componentes humorales en las infecciones bacterianas, existen distintos tipos de PA en el camarón, sin embargo, algunos de ellos como el crustin han llegado a mostrar potencial defensivo ante virus. Shen et al. (2023) observó una sobreexpresión de genes relacionados al crustin hipotetizando que este tiene una participación importante ante la infección el virus del SMB, sin embargo, los mecanismos antivirales del crustin son desconocidos. En el 2021 Wang y Fang sugieren que la actividad antiviral del crustin podría estar influenciada con la interacción de regiones ricas en glicinas y una región rica en cisteína del crustin con la proteína viral VP26, ya que el crustin es un polipéptido catiónico con altos porcentajes de glicina en comparación a otros PA lo que sugiere que podría unirse a la proteína VP26, resultando en una actividad inhibitoria en la proteína viral retrasando su potencial de infección a las células. En nuestros resultados el LOC113811343 está relacionado con la síntesis de crustin y en la línea de camarones resistentes a SMB representaría que a mayor expresión del gen existiría mayor crustin y una mayor inhibición de la infección celular, dando más evidencia de que existe alguna resistencia el virus del SMB (Shen et.al., 2023).

La proteína Selenocysteine lyase-like, se le relaciona en el metabolismo de los selenoaminoácidos a partir de selenio elemental (SE) así como en la síntesis de enzimas antioxidantes, además de que el SE es esencial para el mantenimiento, generación y estabilidad de la cutícula en invertebrados (Keating; Dagbusan., 1984). Como previamente se mencionó, la cutícula y su esclerotización funge con un rol importante para evitar la infección con SMB, donde los genes que codificaban Prsilkin-39-like, Keratin, type I cytoskeletal 10-like y Keratin type II cytoskeletal 3-like están involucrados; el análisis de la red genética nos da evidencia que la participación de los genes antes descritos en diferentes niveles en el mecanismo de formación y esclerotización cuticular es sumamente importante en la resistencia de *L.vannamei* ante el SMB. De igual manera Yu et al. (2022) al realizar una investigación con la utilización de SE y selenoaminoácidos en la dieta, observó que aumentaron significativamente las actividades de la superóxido dismutasa y de la glutatión peroxidasa, las cuales reducen el estrés oxidativo en las células infectadas aumentando la tolerancia al SMB. También Qiuran et al. (2023) obtuvo resultados parecidos, mostrando un aumento en la resistencia ante su entorno físico con la actividad de las enzimas antes mencionada. En ambos estudios fue notorio que el estrés oxidativo debido a la inactivación de enzimas antioxidantes en camarones infectados con SMB a nivel celular es lo que da lugar al fallo de sistemas completos y la muerte del organismo. Evidencia previa en investigaciones y la presencia de Selenocysteine lyase-like en nuestros resultados nos da visión de la importancia que tiene el SE y por ende enzimas como la glutatión peroxidasa, no solo para un óptimo funcionamiento de los sistemas del camarón, si no el importante rol que tiene durante el SMB por medio de la reducción de estrés oxidativo de las células al ser infectadas (Qiuran et., al, 2023), que puede dar lugar a investigaciones futuras a esta vía como punto de enfoque y poder reducir aún más los impactos que tiene el virus en la industria camaronera.

Conclusión

Podemos concluir con la realización y el análisis de la red genética que existen vías de procesos biológicos que participan activamente en defensa de los camarones al virus del síndrome de mancha blanca, como es el caso de los procesos relacionados a la síntesis de cutícula y también aquellos relacionados a la membrana celular, de igual manera procesos que están enfocados en el sistema inmune del camarón, como es el caso de síntesis del crustin y presumiblemente de la biosíntesis de globósidos, estos procesos llegan a relacionarse entre sí de forma directa o en una relación sistemática ante la infección viral pero aún falta la confirmación mediante estudios más específicos o retos especializados. Por lo que el análisis de la red genéticas permite plantear investigaciones futuras de rutas de las cuales no hay información suficiente pero que en este trabajo se demuestra que tienen participación en el proceso de resistencia ante el SMB como es el caso de la función de la matriz extracelular y la función de los lípidos (globósidos) durante la infección y para aquellos procesos más estudiados se traduce en retos especializados, como es el caso de la degradación de la condroitina y la utilización de selenio elemental con el fin de comprobar y ampliar lo analizado en esta investigación.

Referencias.

- Anónimo. (2018). Acuicultura, historia y actualidad en México. INAES. México.
- Anónimo. (2021). Acuicultura Camarón azul. INAPESCA. México.
- Amparyup, P., Sutthangkul, J., Charoensapsri, W., 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.
- Bedini, E., Corsaro, M.M., Fernández-Mayoralas, A., Iadonisi, A. (2019). Chondroitin, Dermatan, Heparan, and Keratan Sulfate: Structure and Functions. In: Cohen, E., Merzendorfer, H. (eds) Extracellular Sugar-Based Biopolymers Matrices. Biologically Inspired Systems, vol 12. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-12919-4_5. (T-3)
- Bieri, J., Suter, C., Caliaro, O., Bartetzko, S., Bircher, C., & Ros, C. (2024). Globoside Is an Essential Intracellular Factor Required for Parvovirus B19 Endosomal Escape. *CELLS*, 13(15), 1254. <https://doi.org/10.3390/cells13151254>
- Cárcamo-Aréchiga, N., Grijalva-Chon, J. M., Hernández-López, J., Varela-Romero, A., López-Torres, M. A., & Medina-Juárez, L. Á. (2016). Mecanismos de defensa de los camarones peneidos durante un proceso infectivo: una revisión/defense mechanisms of penaeid shrimp during the infective process: a review. *Biotechnia*, 18(1), 32-42.
- Comité de Sanidad Acuícola del Estado de Sonora (COSAES). (2013). Informe de sanidad de camarón 2013. Comité de Sanidad Acuícola del Estado de Sonora, Sonora, 98 pp.
- Chen, I.-T., Huang, Y.-T., Wang, H.-C., Chen, T.-C., Huang, J.-Y., Lo, C.-F., Aoki, T., Hirono, I., & Chang, G.-D. (2011). White spot syndrome virus induces metabolic changes resembling the warburg effect in shrimp hemocytes in the

- early stage of infection. *Journal of Virology*, 85(24), 12919–12928. <https://doi.org/10.1128/JVI.05385-11>. (T-5)
- Chen, K.-Y., Hsu, T.-C., Huang, P.-Y., Kang, S.-T., Lo, C.-F., Huang, W.-P., & Chen, L.-L. (2009). Penaeus monodon chitin-binding protein (PmCBP) is involved in white spot syndrome virus (WSSV) infection. *Fish and Shellfish Immunology*, 27(3), 460–465. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2009.06.018>.
- Chen K., Li E., Gan L., Wang X., Xu C., Lin H., et al. (2014). Growth and lipid metabolism of the pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* at different salinities. *J. Shellfish Res.* 33 825–833. 10.2983/035.033.0317.
- Chen, L.-L., Lu, L.-C., Wu, W.-J., Lo, C.-F., & Huang, W.-P. (2007). White spot syndrome virus envelope protein VP53A interacts with Penaeus monodon chitin-binding protein (PmCBP). *Diseases of Aquatic Organisms*, 74(3), 171–178. <https://doi.org/10.3354/dao074171>
- Enciso, J., Pelayo, R., & Villarreal, C. (2019). From Discrete to Continuous Modeling of Lymphocyte Development and Plasticity in Chronic Diseases. *Frontiers in Immunology*, 10, 1927. <https://doi.uam.elogim.com/10.3389/fimmu.2019.01927>
- FAO. (2020). El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2020. La sostenibilidad en acción. Roma. <https://doi.org/10.4060/ca9229es>.
- Fan, J., Li, B., Hong, Q., Yan, Z., Yang, X., Lu, K., Chen, G., Wang, L., & Chen, Y. (2022). A Glutathione Peroxidase Gene from *Litopenaeus vannamei* Is Involved in Oxidative Stress Responses and Pathogen Infection Resistance. *INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES*, 23(1), 567. <https://doi.org/10.3390/ijms23010567>. (T-9)
- Feng, S., Wang, C., Hu, S., Wu, Q., & Li, A. (2017). Recent progress in the development of white spot syndrome virus vaccines for protecting shrimp against viral infection. *Archives of Virology*, 162(10), 2923–2936. <https://doi.org/10.1007/s00705-017-3450-x>

- Feng, S.-Y., Liang, G.-F., Xu, Z.-S., Li, A.-F., Du, J.-X., Song, G.-N., Ren, S.-Y., Yang, Y.-L., & Jiang, G. (2018). Meta-analysis of antiviral protection of white spot syndrome virus vaccine to the shrimp. *Fish and Shellfish Immunology*, 81, 260–265. <https://doi.uam.elogim.com/10.1016/j.fsi.2018.07.023>
- Campos-Montes, G. R., Caballero-Zamora, A., Montaldo, H. H., Montoya-Rodríguez, L., Rodríguez-Sala, B. G. G., Rodríguez, S. A. S., Martínez-Ortega A., Quintana-Casares J.C. & Castillo-Juárez, H. (2020). Genetic (co) variation in resistance of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* to acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) and white spot syndrome virus (WSSV) in challenge tests. *Aquaculture*, 520, 734994.
- Gallaga-Maldonado, E. P., Montaldo, H. H., Castillo-Juárez, H., Campos-Montes, G. R., Martínez-Ortega, A., Quintana-Casares, J. C., Montoya-Rodríguez, L., Betancourt-Lozano, M., Lozano-Olvera, R., & Vázquez-Peláez, C. (2020). Crossbreeding effects for White Spot Disease resistance in challenge tests and field pond performance in Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* involving susceptible and resistance lines. *Aquaculture*, 516. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734527>
- Georges, M., Charlier, C., & Hayes, B. (2019). Harnessing genomic information for livestock improvement. *Nature Reviews Genetics*, 20(3), 135–156. <https://doi.org/10.1038/s41576-018-0082-2>
- Godínez-Siordia, D. E., Chávez-Sánchez, M. C., & Gómez-Jiménez, S. (2011). Epicontinental aquaculture of the pacific white shrimp, *litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 14(1), 55–62.
- González Prieto, C. A. (2018). Construcción de redes de regulación génica usando datos de secuenciación de ARN. Departamento de Estadística.
- Gong, X., Hu, F., Hu, J., Bao, Z., & Wang, M. (2024). The interactions between CpG oligodeoxynucleotides and Toll-like receptors in Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Developmental and Comparative Immunology*, 155. <https://doi.uam.elogim.com/10.1016/j.dci.2024.105157>.

- Gupta, S. (1999). SPHs and proPO in activation of prophenoloxidase. Molecular interactions among PAP-1, Tesis de Maestría en Ciencias en Acuicultura. Oklahoma State University.
- Huang H-T, Leu J-H, Huang P-Y, Chen L-L (2012) A Putative Cell Surface Receptor for White Spot Syndrome Virus Is a Member of a Transporter Superfamily. *PLoS ONE* 7(3): e33216. doi:10.1371/journal.pone.0033216. (T-1)
- Jehle, J. A., Blissard, G. W., Bonning, B. C., Cory, J. S., Herniou, E. A., Rohrmann, G. F., Theilmann, D. A., Thiem, S. M., & Vlak, J. M. (2006). On the classification and nomenclature of baculoviruses: *A proposal for revision*. *Archives of Virology*, 151(7), 1257–1266. <https://doi.uam.elogim.com/10.1007/s00705-006-0763-6>.
- Kauffman, S. A. (1969). Metabolic stability and epigenesis in randomly constructed genetic nets. *Journal of Theoretical Biology* 22, 437-467.
- Kelly, J., Carroll, C., Luo, S., Moyeed, R., Li, X. (2020). Genetic networks in Parkinson's and Alzheimer's disease. *Aging*, 12(6), 5221-5243–5243. <https://doi.uam.elogim.com/10.18632/aging.102943>.
- Keating, K. I., & Dagbusan, B. C. (1984). Effect of Selenium Deficiency on Cuticle Integrity in the Cladocera (Crustacea). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81(11), 3433–3437.(T-10)
- Kong, Y., Jing, G., Yan, Z., Li, C., Gong, N., Zhu, F., Li, D., Zhang, Y., Zheng, G., Wang, H., Xie, L., & Zhang, R. (2009). Cloning and characterization of Prsilkin-39, a novel matrix protein serving a dual role in the prismatic layer formation from the oyster *Pinctada fucata*. *Journal of Biological Chemistry*, 284(16), 10841–10854. <https://doi.org/10.1074/jbc.M808357200> (T-11)
- Korte, A., & Farlow, A. (2013). The advantages and limitations of trait analysis with GWAS: a review. *Plant Methods*, 9(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-9-29>

- Latorre-Biel, J. I., Jimenez, E., Martínez-Cámara, E., & Pérez de la Parte, M. M. (2022). Redes de Petri aplicadas a la simulación del comportamiento de consumidores en escenarios concurrenciosos. *In XLIII Jornadas de Automática* (pp. 537-543). Universidade da Coruña. Servizo de Publicacións
- Lan, J.F., Zhou, J., Zhang, X.W., Wang, Z.H., Zhao, X.F., Ren, Q., 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.
- Liao, S., Zhu, C., Shi, D., He, P., & Jia, R. (2021). Advances in the study of tegument protein VP26 in white spot syndrome virus. *Aquaculture and Fisheries*, 6(5), 448–454. <https://doi.org/10.1016/j.aaf.2020.06.003>. (T-7)
- Li, C.-Y., Wang, Y.-J., Huang, S.-W., Cheng, C.-S., & Wang, H.-C. (2016). Replication of the Shrimp Virus WSSV Depends on Glutamate-Driven Anaplerosis. *PLoS ONE*, 11(1), 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146902>
- Lightner, D.V. (1996). Epizootiología y diseminación de dos virus de los camarones peneidos en las Américas y su impacto sobre el comercio internacional. *Rev. Sei. Tech. Off. Int. Epiz.* 15: 579-602.
- Lillehammer, M., Bangera, R., Salazar, M., Vela, S., Erazo, E. C., Suarez, A., Cock, J., Rye, M., & Robinson, N. A. (2020). Genomic selection for white spot syndrome virus resistance in whiteleg shrimp boosts survival under an experimental challenge test. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-77580-3>
- Li, F., J. Xiang. (2013). Recent advances in researches on the innate immunity of shrimp in China. *Dev. Comp. Immunol.*, 39: 11-26.
- Li T., Roer R., Vana M., Pate S., Check J. (2006). Gill area, permeability and Na⁺,K⁺-ATPase activity as a function of size and salinity in the blue crab, *Callinectes sapidus*. *J. Exp. Zool. A Comp. Exp. Biol.* 305 233–245. 10.1002/jez.a.248.

- Li, Z., Lin, Q., Chen, J., Wu, J. L., Lim, T. K., Loh, S. S., Tang, X., & Hew, C.-L. (2007). Shotgun identification of the structural proteome of shrimp white spot syndrome virus and iTRAQ differentiation of envelope and nucleocapsid subproteomes. *MOLECULAR & CELLULAR PROTEOMICS*, 6(9), 1609–1620. <https://doi.org/10.1074/mcp.M600327-MCP200>
- Martin, G.G., Hose, J.E. (2010). Functional anatomy of Penaeid Shrimp. En Alday Sanz V. The shrimp book. pp. 47-67. Nottingham University Press.
- Medrano-Mendoza, T., García, B. F., Caballero-Zamora, A., Yáñez, J. M., Montoya-Rodríguez, L., Quintana-Casares, J. C., Duran-Aguilar M. & Campos-Montes, G. R. (2023). Genetic diversity, population structure, linkage disequilibrium and GWAS for resistance to WSSV in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) using a 50K SNP chip. *Aquaculture*, 562, 738835.
- Medrano-Mendoza, T. (2019). Relación de la carga viral con indicadores de resistencia al Síndrome de Mancha Blanca en dos líneas genéticas de camarón blanco del Pacífico (*Penaeus* (*Litopenaeus*) *vannamei*) en pruebas de desafío controlado. Doctoral dissertation, Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Xochimilco).
- Mizumoto, S., Yamada, S., & Sugahara, K. (2015). Molecular interactions between chondroitin-dermatan sulfate and growth factors/receptors/matrix proteins. *Current Opinion in Structural Biology*, 34, 35–42. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2015.06.004>
- Mountassif, D., Kabine, M., Bourhim, N., El Kebbaj, M. S., Manar, R., Zaroual, Z., & Latruffe, N. (2007). Physiological, morphological and metabolic changes in *Tetrahymena pyriformis* for the in vivo cytotoxicity assessment of metallic pollution: Impact on d-β-hydroxybutyrate dehydrogenase. *Ecological Indicators*, 7(4), 882–894. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2006.11.010>. (T-6)
- Morales, V., Cuéllar-Anjel, J. (2008). Guía Técnica - Patología e Inmunología de Camarones Penaeidos. Programa CYTED Red II-D Vannamei, Panamá, Rep. de Panamá. 270 pp.

- Mukherjee, S. (2017). El gen (edición en castellano): Una historia personal. Debate
- Raa, J. (1996.) The use of immunostimulatory substances in fish and shellfish farming. *Reviews in Fisheries Science*, 4(3):229-288.
- Nacu, Ş., Critchley-Thorne, R., Lee, P., & Holmes, S. (2007). Gene expression network analysis and applications to immunology. *Bioinformatics*, 23(7), 850–858.
- Ng, Y. S., Cheng, C.-S., Ando, M., Tseng, Y.-T., He, S.-T., Li, C.-Y., Cheng, S.-W., Chen, Y.-M., Kumar, R., Liu, C.-H., Takeyama, H., Hirono, I., & Wang, H.-C. (2023). White spot syndrome virus (WSSV) modulates lipid metabolism in white shrimp. *Communications Biology*, 6(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s42003-023-04924-w>.
- Pérez, R., Millán, A.M., Cruz, Pedro., & Saucedo, C.J. (2018). Genética poblacional de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* en Sinaloa, México. *Revista mexicana de biodiversidad*, 89(1), 290-297. <https://doi.org/10.22201/ib.20078706e.2018.1.2070>.
- Porubsky, S. (2014). Globoside als entscheidende Mediatoren in der Pathophysiologie des Shiga-Toxin-assoziierten akuten Nierenversagens und des Morbus Fabry. *Der Pathologe: Organ Der Deutschen Abteilung Der Internationalen Akademie Für Pathologie, Der Deutschen, Der Österreichischen Und Der Schweizerischen Gesellschaft Für Pathologie Und Des Bundesverbandes Deutscher Pathologen*, 35(2), 271–276. <https://doi.org/10.1007/s00292-014-1992-1>.
- Qiuran Yu, Fenglu Han, Rombenso, A., Qin, J. G., Liqiao Chen., Erchao Li. (2023). Dietary selenium supplementation alleviates low salinity stress in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*: growth, antioxidative capacity and hepatopancreas transcriptomic responses. *British Journal of Nutrition*, 130(6), 933–943. <https://doi.org/10.1017/S0007114522004032>.
- Rendón, L., Balcázar, J. L. (2016). Inmunología de camarones: Conceptos básicos y recientes avances. *Revista AquaTIC*, (19).

- Ren, X.-C., & Liu, Q.-H. (2021). LvCPG2 facilitated WSSV infection by interaction with VP26 and VP28. *Fish and Shellfish Immunology*, 118, 313–320. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2021.09.019>. (T-2)
- Rodde, R. H., Einbu, A., & Varum, K. M. (2008). A seasonal study of the chemical composition and chitin quality of shrimp shells obtained from northern shrimp (*Pandalus borealis*). *Carbohydrate Polymers*, 71(3), 388–393. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2007.06.006>
- Rusaini, & Owens, L. (2010). Insight into the lymphoid organ of penaeid prawns: A review. *Fish and Shellfish Immunology*, 29(3), 367–377. <https://doi.uam.elogim.com/10.1016/j.fsi.2010.05.011>
- Shen Yang, Jingyi Dai, Aweya, J. J., Rong Lin, Wuyin Weng, Yuanhong Xie, & Ritian Jin. (2023). The antibacterial activity and Pickering emulsion stabilizing effect of a novel peptide, SA6, isolated from salt-fermented *Penaeus vannamei*. *Food and Bioprocess Technology*, 16(6), 1312–1323. <https://doi.org/10.1007/s11947-023-03000-9>.
- Shinn, A. P., Griffiths, D., Jiravanichpaisal, P., Pratoomyot, J., Trong, T. Q., Vu, N. T., & Briggs, M. (2018). Asian shrimp production and the economic costs of disease. *Asian Fisheries Science*, 31(Special Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND)), 29–58.
- Söderhäll, K., L. Cerenius. (1992). Crustacean immunity. *Ann Rev of Fish Diseases*, 3-23.
- Supungul, P., Pichyangkura, R., Tassanakajon, A., Klinbunga, S., Hirono, I., & Aoki, T. (2004). Antimicrobial peptides discovered in the black tiger shrimp *Penaeus monodon* using the EST approach. *Diseases of Aquatic Organisms*, 61(1–2), 123–135. <https://doi.org/10.3354/dao061123>. (T-8)
- Syed-Musthaq, S., R.,, Sudhakaran, G. Balasubramanian, A.S., Sahul Haamed. (2006). Experimental transmission and tissue tropism of white spot syndrome

- virus (WSSV) in two species of lobsters, *Panulirus homarus* and *Panulirus ornatus*, *Journal of Invertebrate Pathology*. 93:75-80.
- Tovar, H., García-Herrera, R., Espinal-Enríquez, J., Hernández-Lemus, E. (2015). Transcriptional master regulator analysis in breast cancer genetic networks. *Computational Biology and Chemistry*, 59(Part B), 67–77. <https://doi.uam.elogim.com/10.1016/j.compbiolchem.2015.08.007>.
- Van de Braak, C. B., Botterblom, M. H., Liu, W., Taverne, N., van der Knaap, W. P., Rombout, J. H. (2002). The role of the haematopoietic tissue in haemocyte production and maturation in the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Fish & shellfish immunology*, 12(3), 253–272. <https://doi.org/10.1006/fsim.2001.0369>.
- Van Hulten, M. C., Witteveldt, J., Peters, S., Kloosterboer, N., Tarchini, R., Fiers, M., Sandbrink, H., Lankhorst, R. K., Vlak, J. M. (2001). The white spot syndrome virus DNA genome sequence. *Virology*, 286(1), 7–22. <https://doi.uam.elogim.com/10.1006/viro.2001.1002>.
- Velázquez-Lizárraga, A. E., Juárez-Morales, J, Et al. (2019). Transcriptomic analysis of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*, Boone 1931) in response to acute hepatopancreatic necrosis disease caused by *Vibrio parahaemolyticus*. *PLoS ONE*, 14(8), 1–28. <https://doi.uam.elogim.com/10.1371/journal.pone.0220993>.
- Wang, Y., Ma, H.-Y., Fang, W.-H., Li, X.-C., & Zhang, C. (2021). SpCrus2 glycine-rich region contributes largely to the antiviral activity of the whole-protein molecule by interacting with VP26, a WSSV structural protein. *Marine Drugs*, 19(10). <https://doi.org/10.3390/md19100544>. (T-7)
- Wang, L., Sun, X., Zhou, Z., Zhang, T., Yi, Q., Liu, R., Wang, M., & Song, L. (2014). The promotion of cytoskeleton integration and redox in the haemocyte of shrimp *Litopenaeus vannamei* after the successive stimulation of recombinant VP28. *Developmental and Comparative Immunology*, 45(1), 123–132. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2014.02.013>.

- Watson, J. D. (2016). *Biología Molecular del Gen*. Editorial Médica Panamericana.
- Weiss R., Esko JD., Tor Y. (2017). Targeting heparin and heparan sulfate protein interactions. *Org Biomol Chem* 15:5656–5658
- Wang, Y.T., W. Liu, J.N. Seah, C.S. Lam, J.H. Xiang, V. Korzh, J. Kwang. (2002). White Spot Syndrome Virus (WSSV) infects specific hemocytes of the shrimp *Penaeus merguensis*. *Diseases of Aquatic Organisms* 52: 249-259.
- Xie, X., & Yang, F. (2005). Interaction of white spot syndrome virus VP26 protein with actin. *Virology*, 336(1), 93–99. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2005.03.011>
- Yáñez, J. M., Barría, A., López, M. E., Moen, T., García, B. F., Yoshida, G. M., & Xu, P. (2023). Genome-wide association and genomic selection in aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, 15(2), 645–675. <https://doi.org/10.1111/raq.12750>
- Yang, F., Li, X., Li, S., Xiang, J., & Li, F. (2020). A novel cuticle protein involved in WSSV infection to the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Developmental and Comparative Immunology*, 102. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2019.103491>
- Yu D., Zhai Y., He, P., Jia, R. (2022) Comprehensive Transcriptomic and Metabolomic Analysis of the *Litopenaeus vannamei* Hepatopancreas After WSSV Challenge. *Front. Immunol.* 13:826794. doi: 10.3389/fimmu.2022.826794. (T-10)
- Yu, Q., Xia, C., Han, F., Xu, C., Rombenso, A., Qin, J. G., Chen, L., Li, E. (2022). Effect of Different Dietary Selenium Sources on Growth Performance, Antioxidant Capacity, Gut Microbiota, and Molecular Responses in Pacific White Shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Nutrition*, 1–16. <https://doi.org/10.1155/2022/5738008>.
- Zhang, B., Li, C., Luan, Y., Lu, Y., Hu, H., Liu, Y., Lu, K., Zhang, G., Dai, F., & Tong, X. (2022). The Role of Chitooligosaccharidolytic β - N -Acetylglucosaminidase in the Molting and Wing Development of the Silkworm *Bombyx*

mori. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(7), 3850–N.PAG.
<https://doi.org/10.3390/ijms23073850> (T-4)

Zhang, G., He, L., Wong, Y.-H., Xu, Y., Zhang, Y., & Qian, P. (2015). Chemical Component and Proteomic Study of the Amphibalanus (= Balanus) amphitrite Shell. *PLoS ONE*, 10(7), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133866> (T-11)