



ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DEL LITORAL

Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar

**“Contribución al estudio de los mecanismos celulares
empleados por el camarón *Litopenaeus vannamei* para
eliminar el virus del síndrome de la mancha blanca
(wssv)”**

Tesis de Grado

Previa a la obtención del título de:

MAGISTER EN CIENCIAS

Presentada por:

Sara Cristina Blake Grey

Guayaquil – Ecuador

2004

TESIS ELABORADA CON EL SOPORTE DE:



FUNDACIÓN CENAIM-ESPOL



COOPERACIÓN TÉCNICA BELGA



**UNIVERSIDAD DE GANTE
BÉLGICA**



**UNIVERSIDAD CATÓLICA
DE LOVAINA – BÉLGICA**

VITA

Sara Cristina Blake Grey nació el 13 de septiembre de 1964 en Camagüey, Cuba. Se graduó como bachiller en el Instituto Pre-Universitario Julio Sangüily de Sierra de Cubitas. Cursó el técnico medio en la especialidad de Biología Marina en el Instituto de la Pesca Andrés González Lines de la Habana durante los años 1982-1984. A partir de septiembre de esta fecha comenzó a trabajar como técnico en el departamento de Artemia en los laboratorios de la Empresa CULTISUR de Santa Cruz del Sur, Camagüey. Desde septiembre de 1989 hasta julio de 1994 estudió en la facultad de Biología de la Universidad de la Habana donde se graduó como bióloga. Se incorporó nuevamente a la Empresa CULTISUR como jefe del departamento de larvas hasta el año 1999. Realizó la función de Jefe técnico de este laboratorio durante el año 2000 y posteriormente se incorporó al departamento de cultivo de algas hasta julio del 2002. Ingresó al programa de Maestría en Ciencias con la especialidad en Acuicultura Marina en septiembre del año 2002 donde culminó sus estudios en el año 2004.

DECLARACIÓN EXPRESA

“La responsabilidad por los hechos, ideas y doctrinas expuestos en esta tesis, me corresponden exclusivamente; y el patrimonio intelectual de la misma, a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL.”

(Reglamento de Exámenes y Títulos profesionales de la ESPOL).

Sara Cristina Blake Grey

TRIBUNAL DE TESIS

Jorge Calderón, Ph. D

Presidente del Tribunal

Jenny Rodríguez, Ph.D.

Directora de Tesis

Stanislaus Sonnenholzner, Ph.D.

Miembro del Tribunal

Julie Nieto, Ph.D.

Miembro del Tribunal

Marcelo Muñoz, Ph D.

Miembro del Tribunal

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al personal académico y científico del Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas (CENAIM) por contribuir a mi formación dentro del campo de las ciencias.

A la Cooperación Técnica Belga en manos de la Dra. Laurance Massaut por seleccionarme para su programa de maestría.

A la Dra. Jenny Rodríguez quien me ofreció su experiencia y talento en el desarrollo de esta tesis. Digno ejemplo como investigadora.

Al Dr. Stanislaus Sonnenholzner y a la Msc. Bonny Bayot por la asesoría en el proyecto.

A Fany Panchana a quien agradezco mi preparación en la histopatología.

A Fabricio Echeverría y José Melena por sus contribuciones profesionales.

A Edgar por su ayuda incansable y Mervin por su apoyo incondicional.

A Juan, Ricardo, María Elena, José Luis, Alberto y Jackelín, mis hermanos M4.

A las familias Maldonado, Pin-Panta y Zurita por acogerme estos dos años.

A Milviana, Merlita y Rosita, quienes ocupan un lugar especial en mi corazón.

A todo el personal de microbiología, genética y operaciones.

A la Vane, Gabi, Yela, los M5 y Anita por el cariño recibido.

A los compañeros del Ministerio de Pesca en Cuba, una vez más.

A Micaela, gracias por tu entrega.

A Usted

A DIOS.

Humildemente me esforzaré

en amar,

decir la verdad,

ser honrada,

ser útil a los demás.

A DANY

por su espera,

por inspirarme para seguir adelante,

por su porvenir

INDICE

RESUMEN	XV
1. INTRODUCCION.....	1
2. REVISION BIBLIOGRAFICA	4
2.1 ASPECTOS EPIDEMIOLOGICOS DE LAS PATOLOGIAS VIRALES EN LOS PENEIDOS.....	4
2.1.1 Los virus en los sistemas acuícolas.....	4
2.1.2 Propagación del WSSV	5
2.1.3 Diagnóstico histológico de las infecciones virales	7
2.2 RESPUESTA INMUNE ASOCIADA A LAS ENFERMEDADES VIRALES	9
2.2.1 Células y tejidos involucrados en la limpieza del material extraño en los crustáceos.....	9
2.2.2 Reacciones de defensa	11
2.2.3 Acomodación viral.....	12
2.2.4 Apoptosis.....	13
2.3 EFECTO DE LA TEMPERATURA EN EL CONTROL DEL WSSV	17
2.3.1 Temperatura y supervivencia	17
2.3.2 Relación de la temperatura con los mecanismos de defensa celular	19
3. MATERIALES Y METODOS	20
3.1 MATERIAL BIOLOGICO.....	20
3.2 MATERIAL VIRAL	20
3.3 HIPOTESIS DE TRABAJO	21
3.4 SISTEMA EXPERIMENTAL	22

3.4.1	Diseño experimental	22
3.4.2	Protocolo de manejo del experimento.....	22
3.5	CARGA VIRAL DEL MATERIAL INFECCIOSO.....	23
3.6	ANALISIS DE LA POBLACION DE ESTUDIO	23
3.7	SIGNOS EXTERNOS EN LA POBLACION.....	24
3.8	DIAGNOSTICO DE WSSV	24
3.9	ANALISIS ESTADISTICO.....	26
3.9.1	Modelo de regresión logística.....	26
3.9.2	Análisis de varianza	27
3.9.3	Tablas de contingencias	28
4.	RESULTADOS.....	29
4.1	CONDICIONES INICIALES EN LA POBLACION DE ESTUDIO	29
4.2	RESULTADOS DE LA INFECCION EXPERIMENTAL.....	31
4.2.1	Signos externos en la población infectada por WSSV.....	32
4.2.2	Análisis histopatológico en la población infectada por WSSV.....	35
4.2.3	Naturaleza de las poblaciones hemocitarias infiltrantes	48
5.	DISCUSION	50
6.	CONCLUSIONES.....	61
7.	RECOMENDACIONES.....	64
8.	BIBLIOGRAFIA.....	65
9.	ANEXOS	76

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Microfotografías de cortes histológicos de esferoides en juveniles de <i>L. vannamei</i> antes de la infección por WSSV.....	30
Figura 2: Curva de supervivencia en juveniles de <i>L. vannamei</i> infectados subletalmente con WSSV a 28 °C.....	32
Figura 3: Signos externos en juveniles de <i>L. vannamei</i> desafiados con el virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV).....	33
Figura 4: Porcentajes de camarones con diferentes signos clínicos externos de WSD en la población sobreviviente que desarrolló una infección crónica.....	34
Figura 5: Glándulas tegumentales del labio (región oral) marcadas positivamente con el anticuerpo anti-WSSV.....	36
Figura 6: Microfotografías de cortes histológicos de juveniles de <i>L. vannamei</i> con lesiones de WSSV.....	38
Figura 7: Índice histológico de WSD en los diferentes grupos de muestras.....	40
Figura 8: Microfotografías que muestran la necrosis focal en tejidos de juveniles de <i>L. vannamei</i> con infección aguda por WSSV.....	41
Figura 9: Índice histológico de necrosis en la población infectada por WSSV	42
Figura 10: Tejidos positivos a la reacción de apoptosis en los camarones que murieron con infección aguda por WSSV	44
Figura 11: Índices inmunitarios de Infiltración de hemocitos en la población infectada por WSSV	47
Figura 12: Hemocitos infiltrantes reconocidos mediante anticuerpos.....	49

LISTA DE TABLAS

Tabla 1:	Porcentajes de tejidos y camarones positivos en la población de estudio antes de la infección con WSSV.....	31
Tabla 2:	Modelo de regresión logística que explica la influencia del tiempo en la probabilidad de aparición de los signos externos en la población que desarrolló una infección crónica por WSSV	35
Tabla 3:	Porcentajes de tejidos y animales positivos en la población infectada por WSSV	36
Tabla 4:	Porcentajes de tejidos y animales con necrosis en la población infectada por WSSV	42
Tabla 5:	Porcentaje de animales y tejidos con células apoptóticas en la población infectada por WSSV	43
Tabla 6:	Porcentajes de tejidos y camarones con infiltración de hemocitos en la población .infectada por WSSV.....	46
Tabla 7:	Porcentajes de esferoides en el órgano linfoide en camarones infectados por WSSV	48

LISTA DE ANEXOS

ANEXO I. Ejemplo de elaboración de índices histológicos y de respuesta inmunitaria..	76
ANEXO II. Pruebas de normalidad (Kolmogorov-Smirnov) y homogeneidad de varianzas (Levene) para los índices histológicos. Estadísticos de Kruskal Wallis y ANOVA.....	77
ANEXO III. Tablas de contingencias para la relación entre los signos externos y la variable índice de WSSV.....	79
ANEXO IV. Tablas de contingencias para la relación entre los signos externos y las variables índices de necrosis e infiltración.....	81
ANEXO V. Tejidos positivos con los anticuerpos de WSSV, hemocitos hialinos pequeños (40E10) y hemocitos hialinos grandes (41B12).	83
ANEXO VI. Modelo de respuesta celular en los animales con infección leve y aguda..	84.

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análisis de Varianza
AP	Fosfatasa Alcalina
BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate
CSA	Centro de Servicios para la Acuicultura
d	Días
h	Horas
IHHNV	Virus de la Necrosis Hipodérmica y Hematopoyética Infecciosa
l	Litros
LOS	Esferoides del órgano linfoide
ml	mililitros
NBT	Nitro Blue Tetrazolium
OL	Organo linfoide
p	Probabilidad
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
p.i	Post-infección
P-K	Picknosis - Kariorrhesis
PL	Post larva
ppm	Partes por millón
proPO	Pro-fenol oxidasa
rTdT	Enzima Terminal Deoxynucleotidyl Transferasa, Recombinante
SPF	Shrimp Pathogen Free (camarón libre de patógenos)
TSV	Virus del Síndrome de Taura

µg	Microgramos
µl	Microlitros
µm	Micras
UV	Ultravioleta
WSD	Enfermedad de la mancha blanca
WSSV	Virus del síndrome de la mancha blanca
YHV	Virus de la cabeza amarilla

RESUMEN

Este trabajo se enfocó en buscar la relación de los signos clínicos externos con el nivel de infección con WSSV (por sus siglas en inglés) observado por histología y en estudiar los mecanismos de defensa celular empleados por los camarones sometidos a bajos niveles de infección en condiciones térmicas adecuadas. Para esto, se realizó una infección experimental sub-letal a una temperatura de 28 °C.

Los signos clínicos externos de WSD (por sus siglas en inglés) fueron diagnosticados mediante observaciones individuales considerando la apariencia y la mortalidad. Para el análisis histopatológico se tomaron muestras en animales con diferentes niveles de infección. 1) Aspecto saludable con infección temprana a las 24 h p.i; 2) Agudos, aquellos que no sobrevivieron a la infección; 3) Sobrevivientes (crónicos) a los 7 y 14 días p.i. En los tejidos se evaluó el grado de lesiones de WSD, necrosis, P-K, así como la respuesta celular del hospedero (hemocitos infiltrantes, esferoides), mediante histología e inmunohistoquímica; Además se analizó apoptosis.

A las 24 h p.i se detectaron las lesiones de WSD en branquias y epitelios; También en el OL y nódulos hematopoyéticos sugiriendo que el virus manifiesta tropismo temprano por estos tejidos. La inmunohistoquímica mostró la presencia viral en las glándulas tegumentales de los apéndices bucales y en menor medida en otras regiones del cuerpo, sugiriendo que estas glándulas constituyen una puerta de entrada del WSSV en infecciones por baño. Esferoides de Tipo A fueron detectados los cuales han sido asociados a una infección temprana por TSV. Apoptosis muy marcada se observó en tejidos expuestos al medio como glándula antenal y epitelios. Este grupo de animales no

presentó lesiones de WSD en los tejidos. Todos los camarones que desarrollaron una infección aguda y murieron presentaron coloración rojiza del cuerpo, manchas blancas en el interior del caparazón pero no visibles a simple vista, el índice más alto de WSD y necrosis focal en la mayoría de sus tejidos comprometiendo sus funciones vitales. La apoptosis se presentó en glándula antenal y epitelios de los camarones con infección aguda, pero no fue suficiente para frenar la entrada del virus. La pobre presencia de hemocitos infiltrantes podría ser la causa por lo que estos animales no resistieron la infección viral. Además mostraron el mayor porcentaje de esferoides de Tipo C. Los animales crónicos manifestaron manchas blancas que siguieron un patrón simétrico y regular, aspecto lechoso, cola roja y lesiones melanizadas en el exoesqueleto. También mostraron túbulos normales en el órgano linfoide sugiriendo la regeneración celular. Los crónicos de 7 d presentaron lesiones leves por WSD y en ellos no se observó apoptosis, pero mostraron altos índices de infiltración de hemocitos. En los crónicos a los 14 d no se observaron lesiones de WSD, ni apoptosis. La coloración rojiza y las manchas blancas estuvieron asociadas con el índice de WSD y necrosis. El aspecto lechoso, segmentado, las lesiones melanizadas y la cola roja no estuvieron asociadas al índice de WSD. La coloración rojiza no estuvo asociada a la infiltración. La inmunohistoquímica permitió detectar a los grandes hemocitos hialinos en los esferoides y en el tejido conectivo del estómago. Los fagocitos fijos del corazón fueron reconocidos como hemocitos pequeños y grandes hialinos. El estroma de los túbulos del órgano linfoide y los podocitos de la glándula antenal, (tejidos con capacidad de filtración), fueron marcados por los anticuerpos que reconocen a los hemocitos pequeños hialinos. La apoptosis puede ser considerada una de las primeras respuestas de los camarones a la infección viral. Apoptosis, infiltración de hemocitos y esferoides fueron los mecanismos celulares que emplearon los camarones infectados con WSSV a una temperatura de 28 °C.

1. INTRODUCCION

Las infecciones virales son comunes entre los invertebrados, sin embargo se conoce poco acerca de la habilidad de estos organismos para controlarlas, lo cual tiene su mayor dificultad en el hecho de que carecen de defensas antivirales basadas en una inmunidad específica (Kurosky *et al.*, 2000).

Actualmente se realizan investigaciones para evaluar y mejorar el estado inmune de los camarones, así como para establecer estrategias que permitan el control de los virus en la acuicultura (Bachère, 2000). El uso de técnicas de diagnóstico simples y muy sensibles, altas temperaturas en los cultivos y la inmunoestimulación son algunas de las estrategias que pueden ser utilizadas en las granjas para prevenir las infecciones virales.

Para ampliar nuestros conocimientos sobre el sistema inmune del camarón ha sido necesario complementar investigaciones en áreas como la patología, fisiología y genética de los crustáceos. Estos estudios señalan que los camarones emplean mecanismos celulares en la resistencia a las patologías como el virus del síndrome de la mancha blanca (Momoyama *et al.*, 1994; Granja *et al.*, 2003), llevados a cabo mediante los hemocitos los cuales son los efectores de la respuesta innata.

En los peneidos las investigaciones actuales están encaminadas a la caracterización de efectores humorales como las peneidinas, las cuales son péptidos antimicrobianos que podrían ser utilizados como importantes agentes terapéuticos (Destoumieux *et al.*, 1997; Bachère *et al.*, 2000). Siendo los mecanismos celulares y humorales los responsables de la defensa y limpieza de los patógenos presentes en la hemolinfa de los camarones

(Bachère, 2000), es de gran interés encontrar métodos que permitan potenciarlos e identificar que procesos carecen de efectividad en situaciones de estrés lo cual explicaría que se desencadenen las mortalidades masivas observadas en infecciones como la mancha blanca.

Por otra parte los signos clínicos externos que caracterizan la enfermedad de la mancha blanca han sido descritos (Lihgtner, 1996), pero no se conoce su relación con el grado de infección detectado mediante histología y los mecanismos de defensa celular que emplea el hospedero en infecciones sub-letales. El conocimiento de esta relación podría servir para el productor como diagnóstico presuntivo.

Los organismos acuáticos están confinados a cuerpos de agua donde los parámetros ambientales son muy variables (Vidal *et al.*, 2001). Existe evidencia de que *Litopenaeus vannamei* sobrevive a desafíos con WSSV a altas temperaturas (Vidal *et al.*, 2001; Sonnenholzner *et al.*, 2002), en tanto que las bajas temperaturas favorecen la incidencia del virus (Bayot, 2003). Los mecanismos celulares relacionados con el efecto beneficioso de incrementar la temperatura son actualmente objeto de estudios. Al respecto Granja *et al.* (2003), señalan que la hipertermia facilita la apoptosis en camarones de esta especie lo cual podría incidir negativamente sobre la replicación viral.

Los invernaderos, utilizados con el objetivo de aumentar la temperatura en el agua de los cultivos son hasta la fecha la alternativa más eficaz para disminuir el daño causado por WSSV (Sonnenholzner *et al.*, 2002); con el objetivo de determinar la temperatura mínima de eficiencia inmunitaria en el control del WSSV se realizaron estudios en los cuales se señala que temperaturas por debajo de 31 °C no son favorables para obtener buena

supervivencia en los cultivos de *L. vannamei* (Sonnenholzner *et al.*, 2002; Jiang *et al.*, 2004). Experimentos realizados en la estación experimental de CENAIM, sugieren que a temperaturas iguales o inferiores a 27 °C, se incrementa el riesgo de brotes de mancha blanca (Rodríguez , 2003a; Rodríguez, 2003b), sugiriendo que las temperaturas iguales o superiores a 28 °C podrían ser adecuadas para el buen funcionamiento de los mecanismos de defensa de los camarones.

Las infecciones inducidas constituyen una importante herramienta para estudiar las patologías virales del camarón. Este trabajo pretende determinar la relación entre los signos clínicos externos y el nivel de infección observado por histología, así como estudiar los mecanismos de defensa celular empleados por los camarones infectados experimentalmente con WSSV en una dosis sub-letal y a una temperatura de 28 °C, para ello se tomaron muestras histológicas de los animales infectados en las cuales se evaluaron las lesiones, la respuesta celular y apoptosis.

2. REVISION BIBLIOGRAFICA

2.1 ASPECTOS EPIDEMIOLOGICOS DE LAS PATOLOGIAS VIRALES EN LOS PENEIDOS.

2.1.1 Los virus en los sistemas acuícolas

Entre los principales factores que provocan las mortalidades de camarones en los cultivos están citadas las enfermedades virales; a ello se une un deficiente manejo de los factores ambientales en las piscinas tales como el suelo y la calidad de agua. Alta incidencia de virus ha sido detectado en áreas donde los desechos químicos y biológicos son recirculados desde una granja a otra con lo cual se incrementa el grado de contaminación (Kautsky *et al.*, 2000).

El desarrollo de la acuicultura ha estado basado en la obtención de animales procedentes del medio natural, los cuales sufren estrés al ser transferidos a las condiciones de cría artificial (CNA, 1987). Este procedimiento incrementa la sensibilidad de los camarones a las enfermedades y ha constituido una vía de entrada de patógenos a los sistemas de cultivos (Cedeño, 1998).

La transmisión horizontal a través del agua, el canibalismo de animales más débiles, moribundos o de la mudas, la cohabitación de animales sanos con los enfermos, así como por el uso de equipos comunes como las redes y otros útiles de trabajo ha sido confirmada en infecciones por WSSV (Lightner y Chen, 2000a), la Necrosis Hipodérmica y Hematopoyética Infecciosa (IHHNV) (Lightner y Chen, 2000b), el

Síndrome de Taura (TSV) (Lightner y Chen, 2000c) y el Síndrome de la cabeza amarilla (YHV) (Lightner y Chen, 2000d).

2.1.2 Propagación del WSSV

La infección por WSSV se caracteriza por un brote rápido de la enfermedad y altas mortalidades en corto tiempo (Chou *et al.*, 1998). Hasta la fecha ha sido reportada en varias especies de decápodos aunque es más frecuente en los camarones peneidos (Flegel, 1998; Wang *et al.*, 1998; Chang *et al.*, 1998; Rajendran *et al.*, 1999).

Varios factores contribuyen a la propagación del WSSV. Un suministro insuficiente de agua limpia ó inadecuada remoción de los desperdicios, excesiva fluctuación en los factores abióticos tales como oxígeno, temperatura, pH y salinidad, incrementan el estrés y la susceptibilidad de los animales a la enfermedad; además, los monocultivos y el transporte de semillas de una región a otra facilitarían la dispersión del patógeno (Kautsky *et al.*, 2000).

Una dificultad en el control de la enfermedad de la mancha blanca es que el virus puede ser portado por camarones infectados que no muestran signos clínicos; por tanto camaronas que comparten la misma agua están en riesgo de contraer la infección antes que se manifieste alguna evidencia de su presencia (Chou *et al.*, 1998).

El riesgo a la enfermedad aumenta en los cultivos intensivos en los cuales la densidad en la población de camarones es mayor (Chou *et al.*, 1998; Kautsky *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 2001); bajo estas condiciones el canibalismo resulta en otra vía de infección con la consecuente mortalidad; sin embargo, las partículas virales liberadas al agua por los

camarones moribundos también pueden infectar al resto de la población (Wu *et al.*, 2001).

Las altas densidades en los cultivos ejercen influencias sobre las mortalidades. Diferencias significativas fueron encontradas cuando los animales muertos fueron retirados inmediatamente del estanque, respecto a los retirados solo dos veces al día, sugiriendo que las mortalidades son mayores donde ambas vías de propagación viral (canibalismo y agua) son favorecidas por las altas densidades (Wu *et al.*, 2001).

La transmisión vertical de padres a la progenie no ha sido confirmada pero la presencia de ADN de WSSV en las gónadas de camarones y cangrejos sugiere que puede transmitirse verticalmente (Lo *et al.*, 1997; Chang *et al.*, 1998; Tsai *et al.*, 1999). Los reproductores no pueden transmitir el virus a través de los huevos pero liberarían las partículas virales presentes en el tejido conectivo del ovario y estas serían ingeridas por las larvas cuando abren la boca (Lo *et al.*, 1997; Alday, 1999).

Debido a su rápida dispersión en el mundo, el WSSV puede infectar a un mayor número de especies de camarón y causar serios daños a esta industria (Chou *et al.*, 1998). La industria camaronera de Tailandia ha dado muestras de importantes logros en el control de las patologías virales. Withyachumnarnkul *et al.* (2003), señalan que a pesar de la manifestación en este país de los primeros brotes de la enfermedad de la mancha blanca a partir del año 1995 y su actual persistencia, ha sido posible controlarla y mantener los niveles mundiales de producción mediante la práctica de varios principios:

- Aplicación rápida de las nuevas tecnologías recomendadas por los investigadores.
- Utilización de sistemas cerrados para prevenir la entrada de portadores.
- Evitar el almacenamiento de camarones en épocas invernales donde la ocurrencia del virus es mayor.

2.1.3 Diagnóstico histológico de las infecciones virales

Los métodos histológicos son muy útiles para el estudio de algunas enfermedades virales como YHV (Nash *et al.*, 1995), TSV (Hasson *et al.*, 1995; Lightner y Chen, 2000d), IHNV (Lightner y Chen, 2000b) y la mancha blanca (WSD) (Momoyama *et al.*, 1994; Durand *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1999), de las cuales se han caracterizado las lesiones que ocasionan en los tejidos.

La más típica lesión causada por YHV es una severa necrosis en el órgano linfoide (OL), la fase aguda de ésta infección se caracteriza por abundante picknosis y kariorrhexis (P-K), acompañada de la degeneración del OL (Pantoja y Lightner, 2003). Otros tejidos infectados son el epitelio sub-cuticular del estómago, cefalotórax y branquias, en los cuales se puede observar un número alto o moderado de células con inclusiones citoplasmáticas basófilas (Lightner y Chen, 2000d). La kariorrhexis en los hemocitos y en el OL se utilizó durante mucho tiempo como signo patognómico del YHV (Alday, 2000).

En estudios sobre WSSV se ha encontrado que en determinadas circunstancias los camarones con severa infección muestran una marcada necrosis en el OL muy similar a la observada en infecciones por YHV (Pantoja y Lightner, 2003), y se considera que es muy probable la ocurrencia simultánea de ambas infecciones (Durand *et al.*, 2000). La

similitud de las lesiones provocadas por ambos virus observadas mediante histología en tejidos como el OL han causado errores de diagnóstico; hemocitos con P-K han sido relacionados con ambos virus (Pantoja y Lightner, 2003).

La lesión causada por WSSV se caracteriza por la hipertrofia de los núcleos en células infectadas, similar a los cuerpos de inclusión eosinófilos denominados Cowdry A observados en la etapa temprana de la infección (Momoyama *et al.*, 1994; Lightner y Chen, 2000a), los cuales son muy frecuentes en el tejido conectivo del estómago (Pantoja y Lightner, 2003). Cuando la infección es avanzada estos cuerpos de inclusión son basófilos (Lightner y Chen, 2000a).

La enfermedad provocada por TSV puede ser diagnosticada durante la fase aguda por una necrosis multifocal en el epitelio cuticular en los apéndices, branquias, estómago e intestino; los camarones infectados presentan necrosis y picknosis nuclear de células epiteliales, durante esta fase el OL no presenta ninguna lesión (Lightner y Chen, 2000c). La etapa de transición se caracteriza por la presencia de lesiones melanizadas en la cutícula mientras que la fase crónica puede ser identificada por la formación de esferoides del órgano linfoide (LOS) (Lightner y Chen, 2000c), también reportados en infecciones por YHV (Hasson *et al.*, 1995) y WSSV (Walker *et al.*, 1998).

Otro virus que afecta a los peneidos es el IHHNV, el cual ha sido caracterizado histológicamente por la presencia de cuerpos de inclusión Cowdry A rodeados de un anillo de cromatina dentro de núcleos hipertrofiados en células de origen ectodérmico y mesodérmico.

Estas patologías virales presentan algunos tejidos blancos (Jiménez, 1992; Hasson *et al.*, 1999b; Lightner, 1996), y algunos síntomas clínicos externos en común como el nado hacia la superficie, rotación dorsal y ventral, hundimiento hacia el fondo, letargia, intestino vacío, cutícula blanda y coloración rojiza (Hasson *et al.*, 1995; Lightner y Chen, 2000 a;b;c;d). Además, modificaciones en el color azul verdoso de la hemolinfa de los crustáceos a rojiza-café puede ser observada en animales infectados con WSSV (Rodríguez *et al.*, 2003) y TSV (Song *et al.*, 2003).

2.2 RESPUESTA INMUNE ASOCIADA A LAS ENFERMEDADES VIRALES

2.2.1 Células y tejidos involucrados en la limpieza del material extraño en los crustáceos

En la limpieza de las partículas extrañas que llegan al hemocele de los crustáceos están involucrados varios tipos de células (Johnson, 1987): a) Los podocitos o nefrocitos, los cuales están localizados en branquias y en el celosoma de la glándula antenal, ellos están especializados en la pinocitosis de proteínas y posiblemente virus. b) Los hemocitos, células circulantes en la hemolinfa, son las células fagocíticas más abundantes, consideradas como los elementos principales en el reconocimiento y eliminación del material extraño. c) Las células fagocíticas de reserva, estas se presentan en el corazón de los peneidos; Son derivadas del tejido hematopoyético y están involucradas en filtrar otras sustancias, sin embargo no existe evidencia de que estén relacionadas con la fagocitosis de bacterias o virus. d) Los fagocitos fijos, también derivados del tejido hematopoyético, ubicados en los espacios hemales del hepatopáncreas donde secuestran gran cantidad de partículas. e) El órgano linfoide, considerado una parte integral del sistema circulatorio de los camarones peneidos, se asume que funciona como filtro de la

hemolinfa por lo que tendría gran importancia en la limpieza y captura de partículas virales (Van de Braak *et al.*, 2002).

En el órgano linfoide de los camarones se forman los esferoides, estos son observados como una masa multicelular que origina una desorganización de los túbulos normales, carecen de un lumen central y presentan vacuolas citoplasmáticas o algún tipo de inclusiones (Anggraeni y Owens, 2000); Se ha sugerido que estos esferoides son originados por los hemocitos y también constituyen un mecanismo para secuestrar virus (Anggraeni y Owens, 2000 Van de Braak *et al.*, 2002).

Existen evidencias de esferoides ectópicos en algunas especies de peneidos. Los esferoides del órgano linfoide y los esferoides ectópicos están compuestos del mismo tipo de célula fagocítica las cuales pueden proliferar *in situ* o migrar a los sitios en respuesta a una infección viral (Hasson *et al.* (1999a). Esferoides ectópicos fueron reportados en algunos apéndices que normalmente contienen glándulas tegumentales (Hasson *et al.* (1999a).

Las glándulas tegumentales han sido encontradas en asociación con la superficie cuticular, la distribución y número varía de una especie a otra, además estarían implicadas en muchas funciones que incluyen el endurecimiento de la cutícula, formación de epicutículas, apareamiento, osmorregulación, defensa contra predadores y ayudan en la alimentación mediante la formación del mucus (Talbot y Demers, 1993).

2.2.2 Reacciones de defensa

En los camarones como en otros invertebrados los mecanismos celulares y humores contribuyen a la defensa del organismo, limitando invasiones microbianas y virales que son eliminadas de la hemolinfa y tejidos (Söderhall y Cerenius, 1992; Vázquez *et al.*, 1998; Bachère, 2000).

Según Bachère (2002), la respuesta inmune de los crustáceos puede ser dividida en varias fases:

- Etapa inmediata e inducible correspondiente al reconocimiento de lo *no propio*. Los crustáceos no poseen un sistema inmunitario adaptativo pero se ha demostrado que algunos factores presentes en la hemolinfa poseen una alta especificidad de reconocimiento (Destoumieux *et al.*, 1997; Vázquez *et al.*, 1998).

- Etapa de defensa celular y síntesis de efectores. Los hemocitos llevan a cabo la respuesta inmunitaria de manera inespecífica. También están involucrados en la coagulación de la hemolinfa (Söderhall y Cerenius, 1992; Vázquez *et al.*, 1998), así como en sintetizar y almacenar moléculas con acción antimicrobiana (Destoumieux *et al.*, 1997). Respecto a las infecciones virales de peneidos se han reportado las siguientes respuestas celulares:

- ❖ Endocitosis de virus (Söderhall *et al.*, 1996), la cual es considerada la primera línea de defensa en invertebrados (Bayne, 1990). Ocurre frecuentemente en el OL en infecciones por WSSV (Montesdeoca, 2002).
- ❖ Encapsulación (Momoyama *et al.*, 1994).
- ❖ Melanización (Hasson *et al.*, 1999a; Wang *et al.*, 1999).

- ❖ Nodulación (Söderhall y Cerenius, 1992; Durand *et al.*, 1997).
 - ❖ Formación de esferoides del órgano linfóide (LOS) (Anggraeni y Owens, 2000).
- Etapa humoral y de recuperación celular: Se ha reportado que los hemocitos liberan su contenido por exocitosis incluyendo factores para la coagulación de la hemolinfa, sistema proPO (Söderhall y Cerenius, 1998) o péptidos antimicrobianos como las peneidinas (Destoumieux *et al.*, 1997), caracterizadas en *L. vannamei*, las cuales son activas contra hongos y bacterias Gram (+) (Wang *et al.*, 1999) y además actúan como opsoninas contra bacterias Gram (-) según Muñoz *et al.* (2002).

Los hemocitos circulan en el hemocel y también son capaces de migrar a los tejidos (Hasson *et al.*, 1999a; Montesdeoca *et al.*, 2002; Muñoz *et al.*, 2002). Ante la agresión por WSSV los camarones proliferarían hemocitos los cuales se infiltrarían en los tejidos infectados. Si la proliferación celular se detiene, lo cual es una ventaja para el virus, en la hemolinfa se acumularían hemocitos desgastados. Estos resultados indican que las infecciones virales pueden ser controladas en tanto que los camarones sean capaces de proliferar hemocitos en buen estado y movilizarlos a los tejidos infectados (Montesdeoca, 2002).

2.2.3 Acomodación viral

Las infecciones virales en crustáceos se caracterizan por la ausencia de una respuesta inflamatoria, en contraste con las infecciones bacterianas en las cuales se forman agregados masivos de hemocitos que conducen a la encapsulación y formación de granulomas; esto ha llevado al planteamiento del concepto de *acomodación viral* lo cual sugiere la manifestación de una respuesta de los crustáceos a patógenos virales,

caracterizada por una acomodación activa más que una resistencia al virus (Flegel y Pasharawipas, 1998).

El concepto predice que cualquier epizootia viral de los camarones podría conducir a una *tolerancia* de los crustáceos a los virus dentro de aproximadamente dos años del brote, los camarones mueren sin una defensa activa contra la infección. Muchas de las especies portadoras presentan una infección viral activa con muchas células infectadas y gran número de viriones pero no muestran mortalidades, lo cual sugiere que la tolerancia se desarrolla en una primera etapa de la infección viral que suprimiría la apoptosis, explicando porque no se producen focos inflamatorios. Este proceso retarda el desarrollo de la enfermedad y promueve la existencia mutua virus-hospedero, pero la protección ofrecida por la *tolerancia* es limitada por lo que los camarones estarían en riesgo de muerte (Flegel y Pasharawipas, 1998).

2.2.4 Apoptosis

Existen evidencias que en organismos multicelulares la muerte celular puede ser accidental (necrosis) ó programada (apoptosis). La necrosis implica que la célula muere como consecuencia de daños severos, lo cual conlleva a la total destrucción de los procesos metabólicos, desbalance iónico e hinchamiento de la mitocondria, activación de enzimas degradativas que culminan con la ruptura de la membrana plasmática y pérdida del contenido intracelular (lisis) lo que conduce a un proceso inflamatorio (Cohen, 1993; Lemasters, 1999).

La apoptosis involucra cambios morfológicos diferentes porque está asociada a procesos de regulación genética mejor descritos en vertebrados que invertebrados (Savill *et al.*,

1993; Cohen, 1993; Häcker, 2000); Es un mecanismo dependiente de energía de una célula suicida en respuesta a una variedad de estímulos, uno de ellos es la presencia de virus en el medio (O'Brien, 1998), también es determinante para la protección del organismo, al eliminar células potencialmente dañinas (O'Brien, 1998; Häcker, 2000).

El reconocimiento de células en apoptosis bajo el microscopio óptico y electrónico está basado en los cambios en la forma de la célula lo cual está relacionado con la reorganización del citoesqueleto. Otras variaciones morfológicas involucran la condensación de la cromatina, ruptura de las organelas, formación de cuerpos apoptóticos y la ausencia de focos inflamatorios en áreas adyacentes (Häcker, 2000).

El término *muerte programada* es utilizado para señalar que la muerte de la célula sigue un programa intracelular. En vertebrados existen evidencias de que el programa suicida puede activarse cuando la muerte de la célula es deseada para mantener el buen estado del organismo (Cohen, 1993). Independientemente de cual sea la situación ó cual sea el organismo que induce la apoptosis, la apariencia de la muerte celular tiene características similares y requiere de la presencia de enzimas proteasas denominadas Caspasas que tienen como sustrato algunas proteínas del sistema reparador del DNA y el citoesqueleto (Häcker, 2000; Granja *et al.*, 2003).

Células infectadas se rompen en cuerpos apoptóticos, pero no hay derrame de su contenido intracelular ya que la membrana celular se mantiene intacta por lo que no se produce inflamación, además las células apoptóticas son reconocidas por fagocitos mediante receptores de membrana quienes las ingieren evitando consecuencias potencialmente dañinas si el contenido de células que están muriendo es expuesto lo cual

conduciría a la agudización de la enfermedad (Häcker, 2000; Taylor *et al.*, 2001). Una deficiente eliminación de las células apoptóticas podría ser la vía por la cual tejidos dañados perpetúan la infección (Savill *et al.*, 1993).

Es posible que muchas especies portadoras de virus, presenten células infectadas con alto número de viriones pero tengan genes que inhiben la apoptosis lo cual previene la muerte del animal (Khanobdee *et al.*, 2002). Infecciones virales pueden causar apoptosis a menos que este proceso sea bloqueado por inhibición de los genes que lo regulan. Es muy discutido si el virus bloquea la apoptosis para prevenir la muerte prematura de la célula hospedera o evitar que desarrolle algún mecanismo de protección que evitaría su replicación lo cual facilitaría que la enfermedad sea persistente al ser diseminada a células vecinas (O'Brien, 1998).

De acuerdo a la teoría de acomodación viral, la apoptosis en los camarones ocurre cuando falla el mecanismo de acomodación al patógeno y es parte del proceso de *tolerancia* de los crustáceos a los virus (Flegel y Pasharawipas, 1998). Esta hipótesis sostiene que la causa fundamental de la muerte del camarón sería el desencadenamiento de la apoptosis al comprometer importantes funciones celulares (Sahtout *et al.*, 2001; Khanobdee *et al.*, 2002).

Una correlación positiva ha sido encontrada entre el número de células apoptóticas y la severidad de la infección por YHV en *P. monodon* (Khanobdee *et al.*, 2002), quienes encontraron alto grado de deterioro de los tejidos vitales de esta especie tales como branquias, corazón y órgano linfóide así como en la hemolinfa, lo cual explicaría los signos de letargia y debilidad que conducirían a la muerte del camarón. Resultados

similares han sido reportados en infecciones por WSSV donde el grado de mortalidad de los camarones ha sido correlacionado con un alto número de células en apoptosis (Sahtout *et al.*, 2001).

Además Montesdeoca *et al.* (2002), muestran una relación directa entre la carga viral y la presencia de hemocitos en apoptosis (hemocitos anómalos), en animales infectados por WSSV, pero no reportan la replicación viral dentro de los hemocitos sugiriendo por este motivo que las anomalías son producto de la activación o el desgaste celular en el proceso de defensa. También Sahtout *et al.* (2001) muestran evidencias de apoptosis en hemocitos de camarones infectados con YHV.

Anggraeni y Owens (2000), reportan núcleos positivos a apoptosis en el OL, los cuales podrían representar células que utilizan este mecanismo como respuesta a la infección viral. Algunos autores proponen la apoptosis como el principal mecanismo antiviral en invertebrados (Granja *et al.*, 2003), quienes han observado mayor índice de apoptosis en juveniles de *L. vannamei* mantenidos a 33 °C respecto a los que permanecen a temperatura ambiente (25 °C) lo cual apoya la hipótesis de que la apoptosis controla la propagación del virus en condiciones de hipertermia, sin embargo la apoptosis no es suficiente para eliminar el virus ya que cuando disminuye la temperatura del agua resulta en mortalidades elevadas.

Wu *et al.* (2002), encontraron que camarones de la especie *Marsupenaeus japonicus* sobrevivientes a desafíos experimentales con WSSV son resistentes a un segundo desafío después de la tercera y cuarta semana hasta alcanzar los 2 meses, la resistencia encontrada fue paralela a la actividad neutralizante del plasma de los camarones y es

atribuida a moléculas tales como lectinas. Sin embargo Wu y Muroga (2004), sugieren que la apoptosis no es un importante mecanismo en la resistencia de camarones inmunes de la especie *M. japonicus* contra WSSV.

Según Freire y Barracco (2000), las lectinas son glicoproteínas sin actividad catalítica, que aglutinan virus, bacterias, levaduras, protozoos, etc. y están potencialmente involucradas en el reconocimiento y fagocitosis a través de la opsonización por lo que podrían jugar un importante papel en la resistencia de los peneidos a los virus.

2.3 EFFECTO DE LA TEMPERATURA EN EL CONTROL DEL WSSV

2.3.1 Temperatura y supervivencia

Chavarría (2003), reporta una relación muy significativa entre temperatura superficial del mar y producción camaronera en Ecuador en el periodo posterior a la aparición de la enfermedad de la mancha blanca indicando que la producción en Ecuador está afectada por la alta variabilidad climática y la ocurrencia de las enfermedades virales durante los episodios fríos como La Niña.

Según Vidal *et al.* (2001), temperaturas bajas en los cultivos permiten al WSSV propagarse y causar severas epidemias a partir del segundo día posterior a la disminución de este parámetro, en tanto que la mortalidad es inhibida en los camarones de la especie *L. vananamei* cuando las temperaturas son superiores a los 32 °C.

Hewitt y Duncan (2001), reportan mortalidades a temperaturas inferiores a 28 °C en *M. japonicus* pero no encontraron diferencias significativas entre 28, 30 y 32 °C.

Posteriormente Sonnenholzner *et al.* (2002), observaron mejores supervivencias en *L. vannamei* infectados con WSSV y mantenidos a 33 °C durante 8 días y elevadas mortalidades en aquellos animales mantenidos a 27 °C. Por otra parte Jiang *et al.* (2004), encuentran una elevada tasa de supervivencia a 31 °C en camarones de la misma especie pero al mismo tiempo su estudio revela una contradicción ya que observan una rápida mortalidad en la medida que la temperatura aumenta de 27 a 30 °C.

Según Sonnenholzner *et al.* (2002) el grado de infección por WSSV determinado por PCR e histología es menor en los camarones mantenidos a 33 °C, pero con ambas técnicas de diagnóstico este índice se incrementa en los camarones tratados a 27 °C. Un grado de infección por PCR superior a 0.5 debe ser tomado como indicador de peligro para el cultivo ya que por histología, estos animales presentarían signos clínicos de la enfermedad lo cual guarda relación con el inicio de la mortalidad (Sonnenholzner *et al.*, 2002).

Tsai *et al.* (1999), muestran evidencias que *P. monodon* puede ser cultivado con ligera infección por WSSV determinado por PCR por más de 13 meses sin que se manifieste ningún brote de la enfermedad. Resultados similares son observados por Yoganandhan *et al.* (2003), en post-larvas finales y juveniles de la misma especie. Los autores no indican si la supervivencia está relacionada con la temperatura, algún otro factor ambiental o con los animales lo cual amerita ser investigado.

La supervivencia guarda relación con el grado de infección pero no con la prevalencia la cual es del 100% en los animales en todas las temperaturas estudiadas después de las 24 h p.i, sugiriendo que el virus conserva su capacidad de infección a cualquier temperatura

(Sonnenholzner *et al.*, 2002). Los resultados indican que a temperaturas elevadas el virus no es inactivo, pero es mayor la respuesta inmune de los camarones lo cual puede detener las mortalidades (Vidal *et al.*, 2001; Sonnenholzner *et al.*, 2002). Estos autores señalan que los camarones son capaces de responder muy rápido a la infección viral y esta respuesta es proporcional al grado de infección, lo cual explica la caída en la cantidad de hemocitos circulantes. La respuesta del hospedero probablemente sería la causa de que disminuya el proceso infeccioso a partir de los dos días posteriores al ataque viral.

2.3.2 Relación de la temperatura con los mecanismos de defensa celular

Variaciones en el medio ambiente inducen cambios en los mecanismos de defensa de los crustáceos (Le Moullac y Haffner, 2000). El estrés provocado por variaciones de temperatura modifica el número de hemocitos (Sánchez *et al.*, 2001), y altera los mecanismos que regulan al sistema proPO (Söderhall y Cerenius, 1998). Al respecto Vargas-Albores *et al.* (1998), han sugerido que la temperatura determina la efectividad de la respuesta inmune.

El camarón requiere de 4 días para eliminar el virus a temperaturas elevadas por lo que un periodo más largo posiblemente permite una limpieza muy eficaz, pero ante la falta de estímulo la respuesta inmune decae; En estos casos se recomienda el uso de estimulantes con el objetivo de potenciar la alerta inmunitaria antes de que los animales enfrenten un nuevo ataque viral (Sonnenholzner *et al.*, 2002).

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 MATERIAL BIOLOGICO.

En el estudio se utilizaron juveniles de la especie *L. vannamei* procedentes del laboratorio Aqualab, Ayangue; estos fueron trasladados a tanques exteriores de larvicultura de 12 TM en CENAIM-ESPOL donde se desarrollaron hasta alcanzar un peso de $1 \pm 0.5\text{g}$.

3.2 MATERIAL VIRAL.

Para su preparación se utilizó el set 22 de CENAIM (cuarentena). 525 camarones cultivados en los laboratorios para larvas de este centro, con $2.5 \pm 1\text{ g}$ fueron trasladados al set y colocados en gavetas plásticas de 50 L de agua de mar filtrada (25 animales / gaveta), mantenidos sin alimento durante 24 h previas a la infección y a temperatura ambiente. El inóculo WSSV original fue suministrado *per os* y se realizaron dos estrés de temperatura, a las 24 y 48 h p.i provocando descensos bruscos desde 28 a 25 °C y luego hasta 23 °C con el objetivo de aumentar la susceptibilidad de los animales a la infección por WSSV.

A partir de las 48 h se inició la colecta de los animales. Los camarones en descomposición y los sobrevivientes después de 5 días fueron desechados mientras que los que manifestaron signos de letargia, coloración opaca o rosada y moribundos, fueron colectados enteros y conservados a -80 °C . Una muestra (5 camarones) de esta papilla fue analizada por PCR utilizando el Kit IQ 2000 (Farming Intellegene Tech. Corp.), para el

virus de la Mancha Blanca, (CSA). Además la concentración viral de la muestra fue evaluada mediante PCR Tiempo Real (Durand *et al.*, 2002), para lo cual se envió una muestra de 50 g conservada en etanol al 95 % hacia los laboratorios de Arizona.

❖ *Preparación del inóculo viral.*

La solución viral para la infección por baño fue preparada siguiendo el protocolo de la Fundación CENAIM-ESPOL. Se utilizaron los camarones colectados de los cuales se pesaron 5 g a los que se les eliminó el hepatopáncreas para evitar la degradación del producto por sus enzimas, estos fueron macerados y licuados en tampón TN 1X (20 mM Tris-HCl, 0.4 M NaCl) en una relación 1:5 a la cual se le ajustó el pH previamente a 7.4. El homogenizado fue centrifugado a 1 780 g por 10 minutos. El sobrenadante fue filtrado a través de una membrana de celulosa marca ADVANTIC, 0.45 µm. Durante unos minutos la solución fue mantenida en hielo hasta el momento de la inoculación.

3.3 HIPOTESIS DE TRABAJO

Los camarones que mueren infectados por WSSV, manifiestan coloración rojiza en el cuerpo lo cual está relacionado al alto índice de infección en sus tejidos. Aquellos que sobreviven desarrollan los signos clínicos externos de la enfermedad y manifiestan menor grado de lesión en sus tejidos. Los mecanismos de defensa celular están involucrados en la limpieza del patógeno y la sobrevivencia de los camarones.

3.4 SISTEMA EXPERIMENTAL

Para el estudio se utilizó la sala experimental 21 de CENAIM. La desinfección del local se realizó con cloro líquido a 100 ppm antes y después del estudio con los animales. Las unidades experimentales consistieron en frascos de vidrio de 3 l con un sistema de aireación permanente y tapa para evitar contaminación ambiental. Los frascos fueron distribuidos en 10 bandejas con un sistema de recirculación de agua continuo para mantener la temperatura de manera estable. El agua de mar fue esterilizada con filtros de 0.25 μm y UV.

3.4.1 Diseño experimental

El diseño experimental fue completamente aleatorio, el cual contó con un tratamiento (infectados con WSSV), 9 réplicas (bandejas) y un control (una bandeja). Se provocó una infección crónica sub.-letal a la temperatura en la estación cálida- húmeda (28 AC). El estudio duró 15 días.

3.4.2 Protocolo de manejo del experimento

Con la finalidad de provocar una infección sub.-letal, se realizaron pruebas en las que se evaluó la capacidad infecciosa de dos dosis del material infeccioso suministrado *per os* (5 y 1 % de la biomasa) y 2 dosis del mismo por baño (cantidades equivalentes pero aplicadas como un homogenizado al agua (2.5 l). Para realizar el ensayo definitivo se eligió la dosis con la que se obtuvo la mortalidad más baja por baño.

200 animales fueron trasladados hacia la sala experimental, los cuales fueron aclimatados durante 8 días. Se seleccionaron 120 camarones que no manifestaron signos clínicos

externos de WSD; los mismos fueron distribuidos en 12 frascos por bandeja y permanecieron en ayuno 8 h antes de la infección para mantener la calidad del agua en el frasco. Posteriormente 108 camarones (9 bandejas), fueron infectados por baño al 0,2 % de la biomasa al cual fueron expuestos durante 5 h suministrando 100 µl del inóculo viral por frasco. La infección se realizó a temperatura de 28 °C directamente en las unidades experimentales. A las 5 h p.i se realizó un recambio de agua del 50 % y a las 24 h p.i se recambió el volumen total. El grupo control (una bandeja), no fue infectado. El alimento balanceado fue suministrado nuevamente a las 6 h p.i.

3.5 CARGA VIRAL DEL MATERIAL INFECCIOSO

El análisis del material viral mediante PCR IQ 2000 reportó un resultado positivo severo, en tanto la prueba PCR Tiempo Real indicó la presencia de 6.7×10^8 viriones / µg DNA lo que representó una concentración final de $1\,373 \times 10^{10}$ viriones por ml en cada frasco.

3.6 ANALISIS DE LA POBLACION DE ESTUDIO

Previo a la infección a 5 animales seleccionados aleatoriamente se le tomaron muestras de tejidos que fueron preservadas en etanol al 95 %, con el objetivo de determinar la prevalencia de WSSV por PCR IQ 2000, las muestras fueron analizadas de la siguiente manera.

- Muestras A: epitelios sub-cuticulares y región de los palpos bucales.
- Muestras B: branquias.

Los mismos camarones fueron fijados según la metodología de Bell y Lightner, (1998); analizados por inmunohistoquímica con anticuerpos para hemocitos hialinos-grandes (41B12) y para hialinos-pequeños (40E10).

3.7 SIGNOS EXTERNOS EN LA POBLACION

Cada 4 h a partir del momento de la infección se colectaron los camarones muertos y moribundos para el análisis de supervivencia. Además individualmente se realizaron observaciones de otros signos externos considerando: tracto digestivo (lleno-vacío), color (rosado o normal), forma de natación (letárgicos o giratorios) y presencia de manchas blancas. A los 7 días fue provocado un descenso de temperatura hasta 27 °C mantenida hasta el final del experimento.

3.8 DIAGNOSTICO DE WSSV

Para el diagnóstico de WSSV y el estudio de los mecanismos celulares contra el virus se analizaron las muestras tomadas en los siguientes tiempos.

- a. Animales con infección leve- 24 h p.i
- b. Animales con infección aguda -muertos
- c. Sobrevivientes – crónicos a los 7 y 14 d p.i

PCR:

La técnica de PCR ha sido establecida en la acuicultura para la amplificación de ADN de virus, bacterias e invertebrados (Lightner y Redman, 1998). A las 24 h p.i se tomó una muestra aleatoria de 5 animales de los cuales se preservaron fragmentos de branquias y apéndices bucales en Etanol al 95 % para el análisis PCR IQ 2000.

Histología:

Un total de 40 animales fueron fijados y cortados en secciones de 4 μ m para describir y diagnosticar patologías a nivel histológico. Los cortes fueron fijados y teñidos con Hematoxilina y Eosina (H&E) según Bell y Lightner (1998). Para la cuantificación de las lesiones histológicas se utilizaron los índices para WSSV, de P-K y el índice inmunitario de infiltración de hemocitos elaborados por Maldonado (2003), (Anexo I). También se elaboró el índice de necrosis no descrito anteriormente siguiendo el procedimiento utilizado para infiltración y P_K; Los tipos de esferoides en el órgano linfoide (Hasson *et al.* (1999a), fueron evaluados de manera descriptiva.

Apoptosis:

Cortes de tejidos de los camarones muertos, 24 h y 7 d p.i, fueron previamente fijados sobre placas cargadas (Superfrost[®] Plus Glass Slides), 25 * 75 * 1,0 mm para ser analizados mediante el Kit DeadEnd[™] Fluorometric TUNEL System (Promega), el cual detecta los fragmentos de ADN de células apoptóticas por incorporación catalítica de fluoresceína-12-dUTP al extremo 3'-OH DNA usando la enzima (rTdT). Las placas fueron analizadas directamente en el microscopio de epifluorescencia siguiendo el protocolo del Technical Bulletin # 235. Este proceso se analizó de manera descriptiva.

Inmunohistoquímica:

La técnica está basada en el uso de anticuerpos, los cuales se hacen reaccionar sobre los cortes histológicos fijados sobre placas cargadas positivamente. Se utilizaron anticuerpos conjugados a la fosfatasa alcalina (AP) los cuales forman un precipitado azul al reaccionar con su sustrato (NBT y BCIP) que puede ser visualizado en el microscopio óptico normal. Se siguió el protocolo descrito por Destoumiex *et al.* (2000) para el

análisis de las muestras de camarones no infectados, e infectados (24 h, crónicos 7 y 14 d p.i) utilizando anticuerpos anti-WSSV, además se analizaron dos poblaciones de hemocitos que fueron reconocidos por el anticuerpo que reconoce poblaciones de hemocitos hialinos pequeños (40E10) y el anticuerpo que reconoce hemocitos hialinos grandes (41B12).

3.9 ANALISIS ESTADISTICO

3.9.1 Modelo de regresión logística

Para describir el curso de los signos clínicos externos se realizó el análisis de Regresión Logística en la población que desarrolló una infección crónica. El objetivo primordial que resuelve este procedimiento estadístico es el de modelar como influye la presencia o no de diversos factores y el valor o nivel de los mismos en la probabilidad de aparición de un suceso, habitualmente dicotómico ya que la regresión logística permite:

1. Estimar la relación entre dos variables teniendo en cuenta la presencia de otros factores, pero estas deben cumplir como asunción que la relación entre la variable independiente y la probabilidad del suceso no cambie de sentido, ya que en ese caso no nos sirve el modelo logístico.
2. Construir un modelo que permita predecir el valor de la variable dependiente (probabilidad del suceso). Molinero (2001).

El objetivo de este análisis en nuestro estudio fue analizar si existió relación entre el tiempo y el riesgo de aparición de los signos externos (manchas blancas, aspecto lechoso y lesiones melanizadas). En este caso no es aplicable la regresión lineal ya que la variable respuesta tiene solo dos valores (presencia o ausencia). Las variables aspecto

segmentado y cola roja no fueron sometidas a este análisis ya que no cumplieron con las asunciones de la regresión logística mencionadas anteriormente.

❖ *Coefficientes del modelo logístico*

Exp β : Factor asociado al riesgo relativo (*odds*) = cociente entre el riesgo de aparición del evento / riesgo de no aparición del evento.

β : Cuantifica el cambio en el suceso cuando se pasa de un valor del factor a otro permaneciendo constantes el resto de las variables.

X^2 *Wald*: Permite contrastar la hipótesis nula que plantea que $\beta = 0$

p: Significancia del estadístico de Wald.

Intervalo de Confianza (*IC*): Límite superior e inferior del riesgo

ET: Error estándar

La regresión logística se realizó con el programa SPSS (Statistic Package Social Science) versión 11.0.

3.9.2 Análisis de varianza

Los datos del análisis histológico fueron sometidos a pruebas de Kolmogorov-Smirnov (normalidad) y de Levene (para la homogeneidad de varianzas) (Anexo II). El análisis estadístico del índice histológico de necrosis se realizó con un Análisis de Varianza Simple. Los datos histológicos que no cumplieron con las asunciones de normalidad y homogeneidad de varianzas (Índice de WSSV e Infiltración), fueron sometidas a la prueba no paramétrica Kruskal Wallis o ANOVA por rangos, para esto se tomaron 5 camarones aleatoriamente de cada muestra. Las comparaciones múltiples se realizaron utilizando el estadístico Tukey (Zar, 1999).

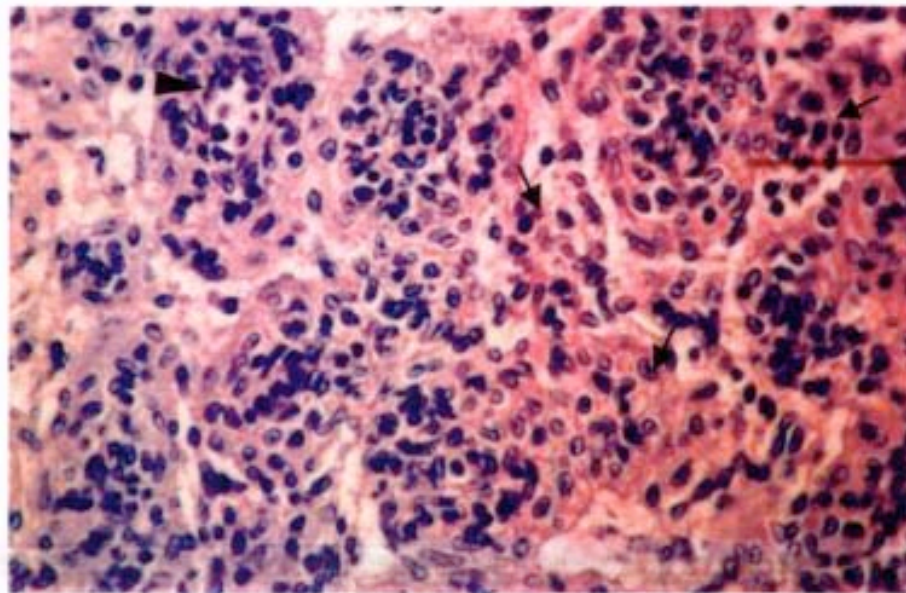
3.9.3 Tablas de contingencias

Los mismos camarones utilizados en el análisis estadístico de los índices histológicos fueron utilizados para relacionar los signos externos con el nivel de infección en los tejidos de los camarones desafiados, lo cual se realizó mediante tablas de contingencias con la hipótesis nula que establece que las frecuencias de las observaciones de los signos externos son independientes (no asociadas), a las frecuencias de las observaciones del índice de WSSV. Para probar la hipótesis se utilizó el Test de significancia χ^2 en el programa Data Desk. A las variables índice de WSD, necrosis e infiltración se les asignaron rangos aleatorios entre el valor más bajo y alto, mientras que los signos externos color rosado, aspecto lechoso, aspecto segmentado y lesiones melanizadas fueron codificados como 0 (ausencia), y 1 (presencia). Las manchas blancas fueron codificadas como 0 (manchas internas no visibles) y 1 (manchas visibles).

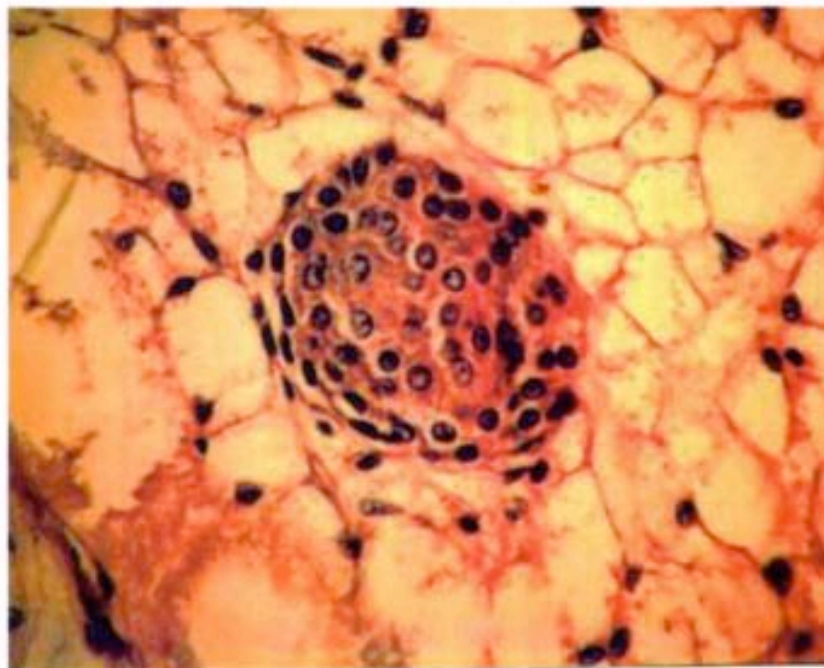
4. RESULTADOS

4.1 CONDICIONES INICIALES EN LA POBLACION DE ESTUDIO

La prueba de PCR en la población utilizada para el estudio mostró que $1/5 = 20\%$ de la muestra presentó WSSV en grado severo. En los mismos animales el análisis histológico mostró bacterias en epitelio del estómago y apéndices bucales, sin embargo no se observaron núcleos hipertrofiados característicos de WSD, ni necrosis (Tabla 1). Se detectó infiltración de hemocitos fundamentalmente en tejido conectivo general y músculo, también en corazón, apéndices bucales y branquias con un índice para la muestra de 0.08. Picknosis y kariorrhesis (P-K) se observó solo en los apéndices bucales. Todos los animales de la muestra presentaron esferoides de tipo A en el órgano linfoide. (Figura 1a). Esferoides ectópicos fueron observados en tejidos conectivos (Figura 1b), también en glándulas tegumentales de la región oral y epitelio de los apéndices bucales, así como en glándula antenal.



a.



b.

Figura 1. Microfotografías de cortes histológicos de esferoides en juveniles de *L. vannamei* antes de la infección por WSSV **a.** Esferoide Tipo A (flecha), túbulo normal (cabeza de flecha). (H & E, 40 X) **b.** Esferoide ectópico en tejido conectivo de estómago (H & E, 100 X).

Elaborado por Sara Blake Grey

Tabla 1. Porcentajes de tejidos y camarones positivos en la población de estudio antes de la infección con WSSV

TEJIDOS ANALIZADOS	Porcentajes			
	WSSV	Necrosis	Infiltración	p-k
Glándula antenal	0	0	0	0
Epitelio cuticular general	0	0	0	0
Epitelio de estómago	0	0	0	0
Tejido conectivo	0	0	60	0
Organo linfoide	0	0	0	0
Tejido hematopoyético	0	0	NO	0
Corazón	0	0	40	0
Apéndices bucales	0	0	40	20
Branquias	0	0	20	0
Cordón nervioso	0	0	0	0
Hepatopáncreas	0	0	0	0
Músculo	0	0	60	0
% Tejidos Positivos	0	0	42	8
% de Animales Positivos	0	0	100	20
Total Animales Observados	5	5	5	5

No: Tejido no Analizado. Resultados de la presente investigación. Elaborado por Sara Blake Grey

4.2 RESULTADOS DE LA INFECCION EXPERIMENTAL

Los resultados de PCR (3/5), y de histología (4/5), obtenidos en la muestra de camarones a las 24 h p.i mostraron que la infección experimental se había realizado exitosamente.

Los grupos con diferentes niveles de infección fueron analizados mediante histología. En los tejidos se investigó el grado de lesiones típicas de WSD, necrosis, P-K, así como la respuesta celular del hospedero (hemocitos infiltrantes, esferoides). A fin de completar el estudio se recurrió a la utilización de anticuerpos específicos de dos poblaciones de hemocitos hialinos y de un kit de apoptosis.

4.2.1 Signos externos en la población infectada por WSSV

La mortalidad se inició a las 24 h p.i, la supervivencia observada en este momento fue del 97.5 %, la cual llegó al 92.5 % el día 3 p.i y se mantuvo hasta el final del estudio (Figura 2). La supervivencia de los animales del control fue del 100 %.

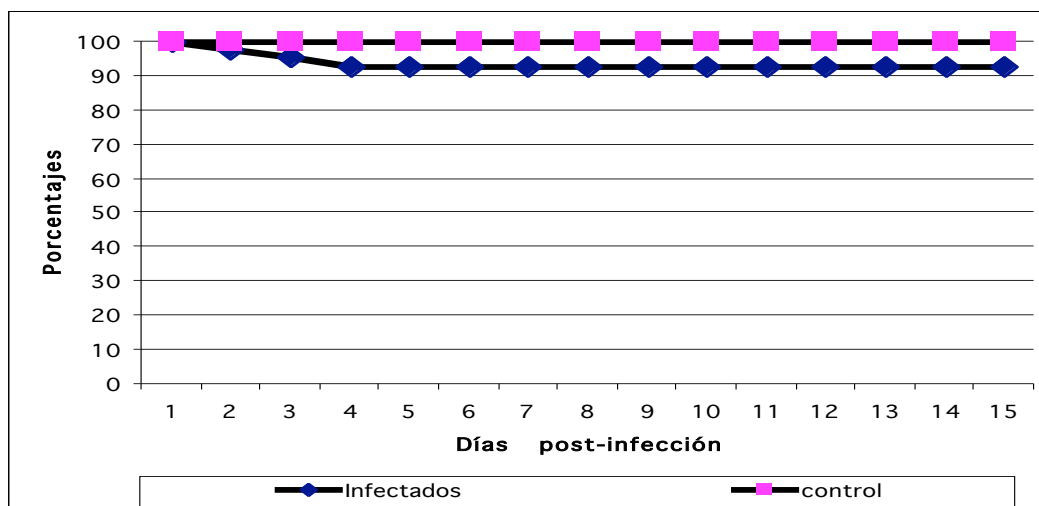


Figura 2. Curva de supervivencia en juveniles de *L. vannamei* infectados sub-letalmente con WSSV a 28 °C. Resultados de la presente investigación. Elaborado por Sara Blake Grey

Todos los camarones que murieron (agudos), manifestaron coloración rojiza del cuerpo y manchas blancas que fueron observadas en el interior del caparazón pero no visibles a simple vista. Solo 2 camarones mostraron aspecto lechoso y en uno se observó el tracto digestivo vacío.

Los signos externos en la población que sobrevivió al desafío (crónicos) fueron: aspecto lechoso, manchas blancas, cola roja, aspecto segmentado a causa de la distribución de las manchas blancas y lesiones melanizadas en el exoesqueleto (Figura 3).



a



b

Figura 3. Signos externos en juveniles de *L. vannamei* desafiados con el virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV). **a.** Manchas blancas y lesiones melanizadas sobre el exoesqueleto a los 8 d p.i.
b. Aspecto lechoso y manchas blancas. Elaborado por Sara Blake

El aspecto lechoso y las manchas blancas aumentaron en el tiempo hasta que se observaron en el 100 % de la población con infección crónica. (Figura 4); Los puntos blancos se hicieron más intensos y de mayor tamaño con el transcurso de los días. Animales con cola roja fueron observados desde el primer día y al igual que el aspecto segmentado en el exoesqueleto alcanzaron porcentajes muy variables durante todo el periodo de observación. A partir del octavo día p.i se observaron lesiones melanizadas que aumentaron en porcentaje hasta el día 14. En estos animales no se observó coloración rojiza del cuerpo. El porcentaje de muda durante el estudio fue del 2 %.

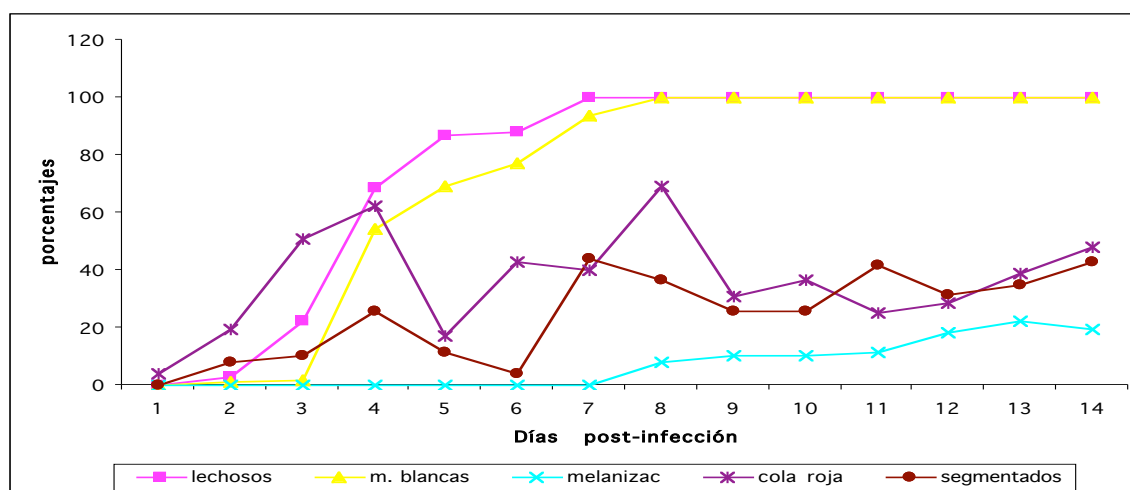


Figura 4. Porcentajes de camarones con diferentes signos clínicos externos de WSD en la población sobreviviente que desarrolló una infección crónica.

Resultados de la presente investigación. Elaborado por Sara Blake Grey

En la tabla 2 se muestran los resultados del análisis de regresión logística para los signos externos en los camarones crónicos. El estadístico X^2 Wald fue significativo para las variables analizadas; El Exp(B), el cual nos indica el ratio entre el riesgo relativo de ocurrencia de un evento / riesgo de que no ocurra, nos indicó que por cada unidad de cambio en el tiempo (días), el riesgo de detectar camarones con aspecto lechoso aumenta

4.54 versus el riesgo de no detectar dicho evento, así para las manchas blancas el riesgo aumenta 3,627, mientras que el riesgo de detectar las lesiones melanizadas en la población aumenta solo 1,462 versus el riesgo de no detectarlos. Para las tres variables analizadas el tiempo se comportó como un factor de riesgo para la aparición de estos signos externos.

Tabla 2. Modelo de Regresión Logística que explica la influencia del tiempo en la probabilidad de aparición de los signos externos en la población que desarrolló una infección crónica por WSSV

SIGNOS	B	E.T.	Wald	gl	Sig.	Exp(B)	I.C. 95.0% EXP(B)	
							Inferior	Superior
Lechosos	1.513	0.121	155.2	1	0	4.54	3.579	5.761
M. blancas	1.288	0.095	183.8	1	0	3.627	3.011	4.37
L. melanizadas	0.38	0.047	63.98	1	0	1.462	1.332	1.604

β : coeficiente de la ecuación; ET: error estándar de β ; gl: grados de libertad;

p: valor asociado a χ^2 Wald; Exp (β): valor del riesgo relativo; I.C. Intervalo de confianza

Resultados de la presente investigación. Elaborado por Sara Blake Grey

4.2.2 Análisis histopatológico en la población infectada por WSSV

- **Indice histológico de WSD**

A las 24 h p.i (animales levemente infectados) se observaron células con núcleos hipertrofiados eosinófilos similares a los Cowdry A en tejidos externos como los apéndices bucales y branquias, este último en la mayoría de los camarones en los cuales la severidad de la infección fue de grado 2. Los tejidos internos donde se observó WSD fueron el órgano linfoide y tejido hematopoyético (Tabla 3). Por otra parte la inmunohistoquímica realizada con el anticuerpo anti-WSSV mostró reacción positiva en las glándulas tegumentales de la región oral en particular en el borde del labio (Figura 5).

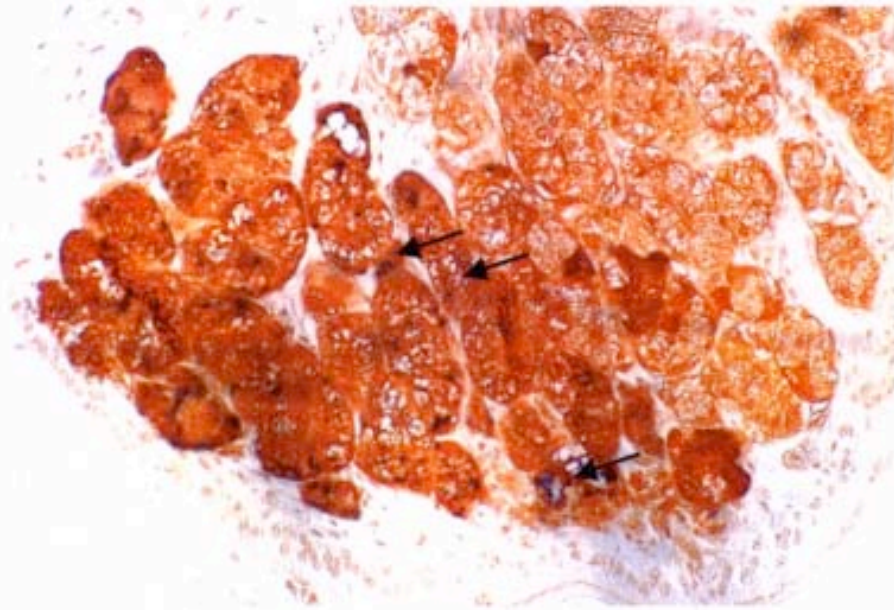


Figura 5. Glándulas tegumentales del labio (región oral) marcadas positivamente (flechas) con el anticuerpo anti WSSV. Elaborado por Sara Blake Grey

Tabla 3. Porcentajes de tejidos y animales positivos en la población infectada por WSSV

TEJIDOS ANALIZADOS	Porcentajes			
	Leves-24h	Agudos	Crónicos-7d	Crónicos-14d
Glándula antenal	0	89	25	0
Epitelio cuticular general	0	56	13	0
Epitelio de estómago	0	67	25	0
Tejido conectivo	0	78	38	0
Organo linfoide	40	56	25	0
Tejido hematopoyético	40	56	0	0
Corazón	0	22	0	0
Apéndices bucales	20	33	25	0
Branquias	80	89	25	11
Cordón nervioso	0	11	0	0
Músculo	0	11	0	0
% Tejidos Positivos	36	100	64	9
% de Animales Positivos	60	100	63	12.5
Total Animales Observados	5	9	8	9

Resultados de la presente investigación. Elaborado por Sara Blake Grey

Los camarones con infección aguda mostraron núcleos hipertrofiados eosinófilos y basófilos en la mayoría de los tejidos del cuerpo; glándula antenal con grado 3 (Figura 6a) y branquias con grado 4, fueron los tejidos infectados en la mayor cantidad de camarones. En un alto porcentaje de animales de la muestra se observaron las lesiones con grado 4 en el tejido conectivo de estómago (Figura 6b). También se observaron células *vacías* y con fragmentación del núcleo (Figura 6c), lo cual ha sido relacionado con las lesiones causadas por el WSSV (Panchana, comunicación personal).

Los camarones crónicos 7 d mostraron núcleos hipertrofiados basófilos, siendo el tejido conectivo del estómago el más infectado en la mayoría de los camarones analizados. Otro

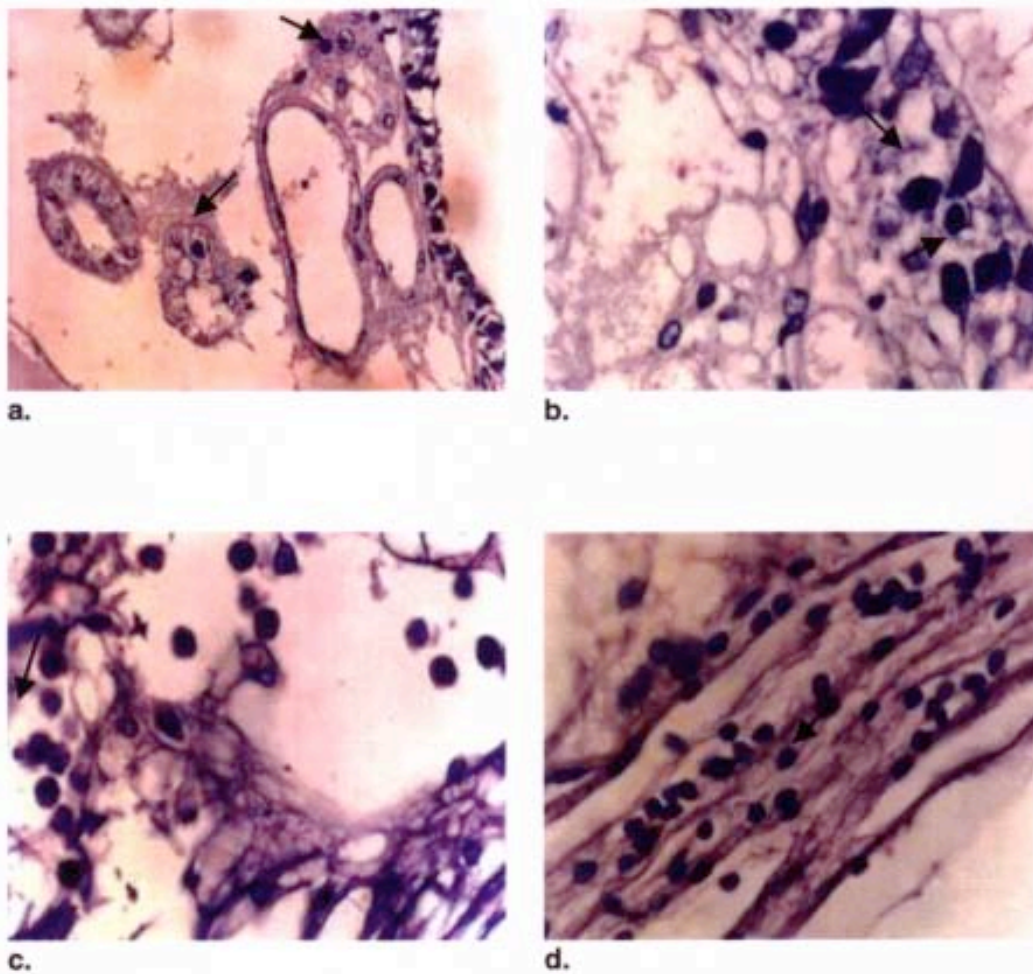


Figura 6. Microfotografías de cortes histológicos de juveniles de *L. vannamei* con lesiones de WSSV. **a.** Presencia de núcleos basófilos en glándula antenal (flechas). **b.** Hipertrofia en tejido conectivo (flechas). **c.** Fragmentación del núcleo en tejido conectivo (Flecha); **d.** Hipertrofia en cordón nervioso. (flechas) (H & E, 40 X).

Elaborado por Sara Blake Grey

tejido infectado no considerado en el índice histológico fue el conectivo de los apéndices bucales. La severidad de la infección para la muestra estuvo entre grado 1 y 2.

Además de tener un menor índice de WSD que los animales con infección aguda, en los crónicos 7 d no se observaron lesiones ni en tejido hematopoyético ni en el corazón. En los animales crónicos 14 d solo se detectó la lesión típica de WSD en branquias de un camarón cuya severidad fue de grado 1. Un ejemplo del cálculo de los índices de WSD es mostrado en el Anexo I.

El análisis estadístico utilizando Kruskal Wallis reportó diferencias significativas entre las muestras ($p=0.017$) (Anexo IIa). En los camarones con infección aguda el índice de WSSV fue significativamente mayor (3.2), respecto a los camarones con infección leve (0.6), a los crónicos 7 (0.38) y los crónicos 14 d (0.01) (Figura 7). También se obtuvo diferencias significativas entre los infectados leves y los crónicos 14 d, pero el índice de WSD no fue diferente entre los infectados leves y los crónicos 7 d. Entre los crónicos de ambos grupos no hubo diferencias.

El estadístico X^2 arrojó que las frecuencias del color rosado ($p=0.0001$), están asociadas significativamente a las frecuencias del índice de WSD, mostrando que el color rosado se presentó en los camarones con el índice más alto de WSD. También las frecuencias de manchas blancas están asociadas al índice de WSD ($p=0.0281$), indicando que los camarones con el índice más alto de WSD no presentaron manchas blancas visibles externamente. Por otra parte, las frecuencias para el aspecto lechoso ($p=0.4477$), aspecto segmentado (0.0995), cola roja ($p=0.1593$) y las lesiones melanizadas ($p=0.4095$), no mostraron asociación con el índice de WSD. (Anexo III)

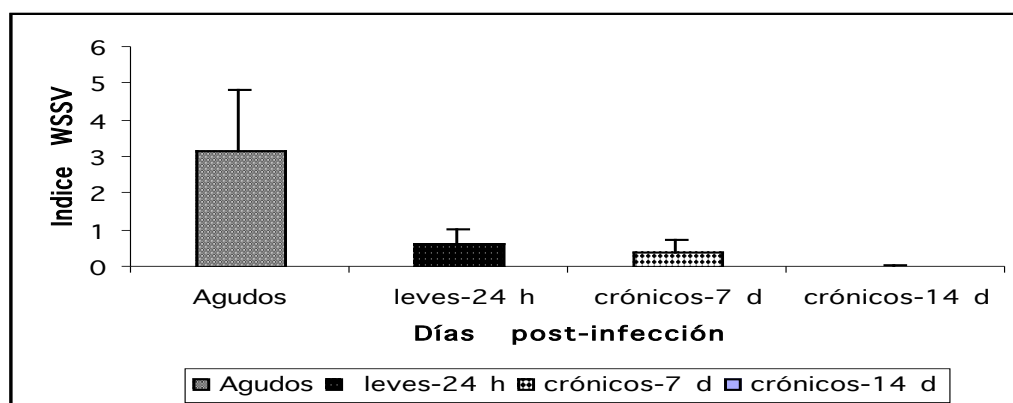


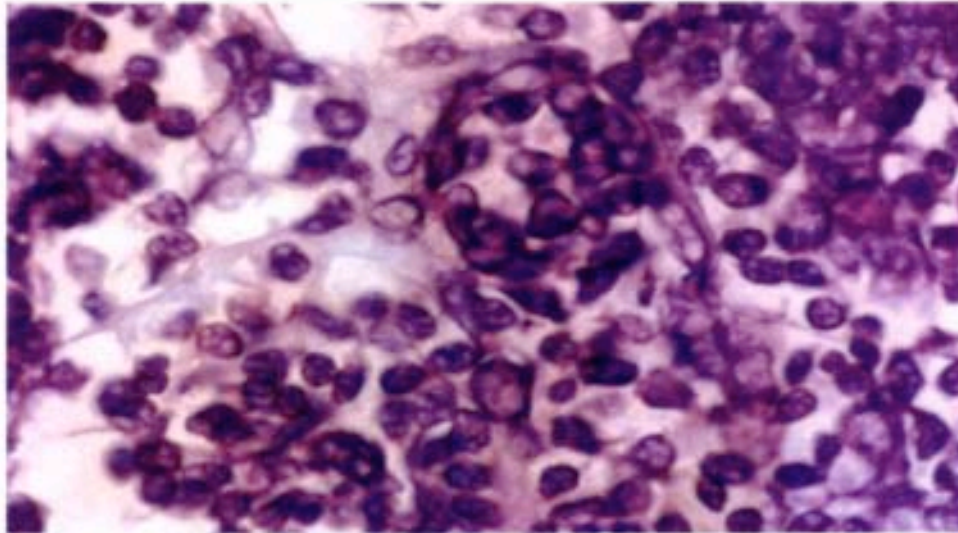
Figura 7. Índice histológico de WSD en los diferentes grupos de muestras.

Resultados de la presente investigación. Elaborado por Sara Blake Grey

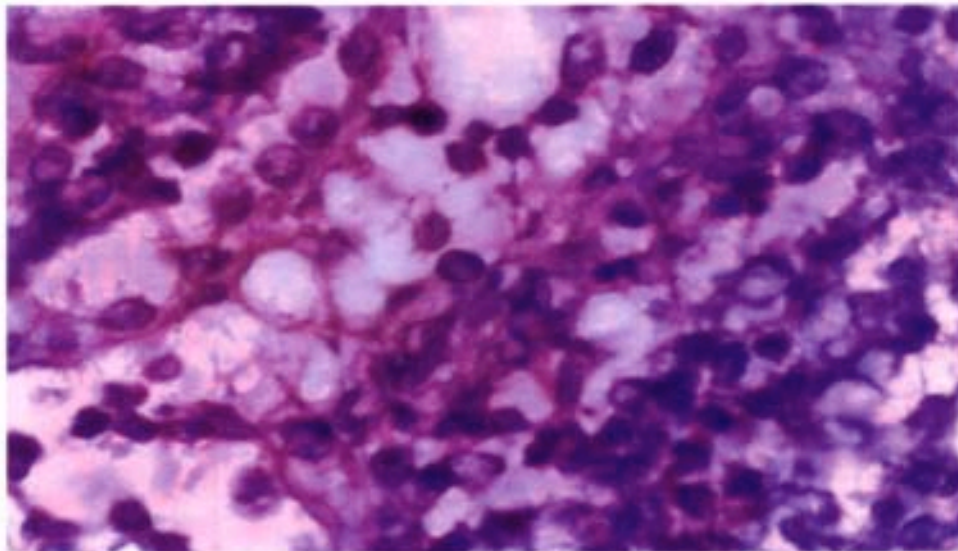
- ***Índice histológico de necrosis.***

En la población con infección leve el mayor porcentaje de necrosis se observó en el hepatopáncreas; también fueron positivos el tejido conectivo de estómago, el tejido hematopoyético, branquias y músculo (Tabla 4). Todos los camarones que murieron presentaron necrosis en el hepatopáncreas, en algunos se observó necrosado el órgano linfóide (Figura 8a), corazón y en un alto porcentaje el tejido hematopoyético (Figura 8b). En el tejido conectivo del estómago y branquias la lesión fue observada en un bajo porcentaje de los camarones analizados. A los 7 y 14 d p.i esta lesión se observó solo en hepatopáncreas (Tabla 4).

El ANOVA mostró diferencias significativas entre los grupos analizados ($p=0.017$) (Anexo IIb). En tanto que el test de Tukey indicó que el índice de necrosis es diferente entre los camarones con infección aguda (0.23) y los crónicos 14 d (0.04), pero no es diferente respecto a los camarones crónicos 7 d (0.07) y los infectados leves (0.08). Entre los crónicos 7 d y los infectados leves tampoco se detectaron diferencias (Figura 9).



a.



b.

Figura. 8. Microfotografías que muestran la necrosis focal en tejidos de juveniles de *L. vannamei* con infección aguda por WSSV **a** Organó linfoide **b**. Tejido hematopoyético (H & E, 100 X).

Elaborado por Sara Blake Grey

Tabla 4. Porcentajes de tejidos y animales con necrosis en la población infectada por WSSV

TEJIDOS ANALIZADOS	Leves-24 h	Agudos	Crónicos-7d	Crónicos-14d
Glándula antenal	0	0	0	0
Epitelio cuticular general	0	0	0	0
Epitelio de estómago	0	0	0	0
Tejido conectivo de estómago	20	22	0	0
Organo linfoide	0	44	0	0
Tejido hematopoyético	20	44	0	0
Corazón	0	11	0	0
Hepatopáncreas	60	100	100	44
Branquias	20	22	0	0
Cordón nervioso	0	0	0	0
Apéndices bucales	0	0	0	0
Músculo	20	0	0	0
% Tejidos Positivos	42	50	8	8
% Animales Positivos	60	100	100	44
Total Animales Observados	5	9	8	9

Resultados de la presente investigación. Elaborado por Sara Blake Grey

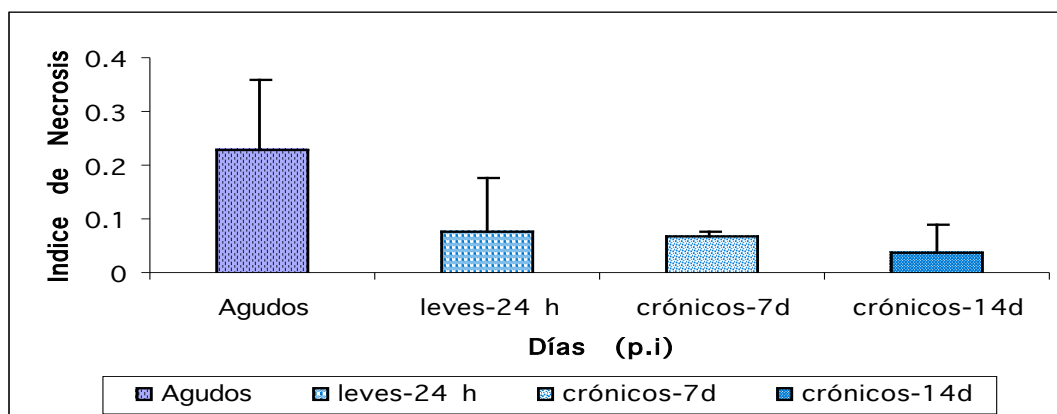


Fig. 9. Índice histológico de necrosis en la población infectada por WSSV.

Resultados de la presente investigación. Elaborado por Sara Blake Grey

Las manchas blancas fueron visibles externamente en los camarones con el índice más bajo de necrosis, e internamente en aquellos con el índice más alto de esta lesión. La prueba χ^2 mostró que las frecuencias de las manchas blancas ($p=0.0357$) y las frecuencias del color rosado ($p=0.032$), están asociadas a la frecuencias del índice de necrosis; Sin

embargo no se obtuvo asociación entre las frecuencias del aspecto lechoso ($p=0.1467$), lesiones melanizadas (0.6905) y cola roja respecto al ($p=0.6211$), respecto a las frecuencias del índice de necrosis. (Anexo IVa).

- ***Indice histológico de picknosis y kariorrhesis***

La población de estudio presentó muy poca Picknosis y Kariorrhesis, la cual se observó solamente en los camarones que murieron con infección aguda para los cuales el índice fue 0.09.

- ***Apoptosis***

La señales más fuertes de apoptosis fueron observadas en los camarones con infección leve (24 h p.i). En ellos se observaron señales positivas a la reacción de apoptós en todos los camarones analizados; el tejido afectado en la mayor cantidad de animales fue la glándula antenal (Tabla 5). Como promedio la muestra presentó reacción positiva en el 75 % de los tejidos considerados en el análisis.

Todos los camarones que murieron con infección aguda presentaron reacción positiva. La glándula antenal fue el tejido positivo para la mayoría de camarones de la muestra, también el tejido conectivo y epitelio de estómago (Figuras 10 a y b), músculo y los apéndices bucales (Figura 10c), fueron positivos en un alto porcentaje de animales. En el órgano linfoide se observó la reacción en un solo camarón (Figura 10d). Por otra parte la reacción de apoptosis fue negativa en los animales crónicos de 7 d (Tabla 5). La muestra de 14 d no fue analizada para apoptosis.

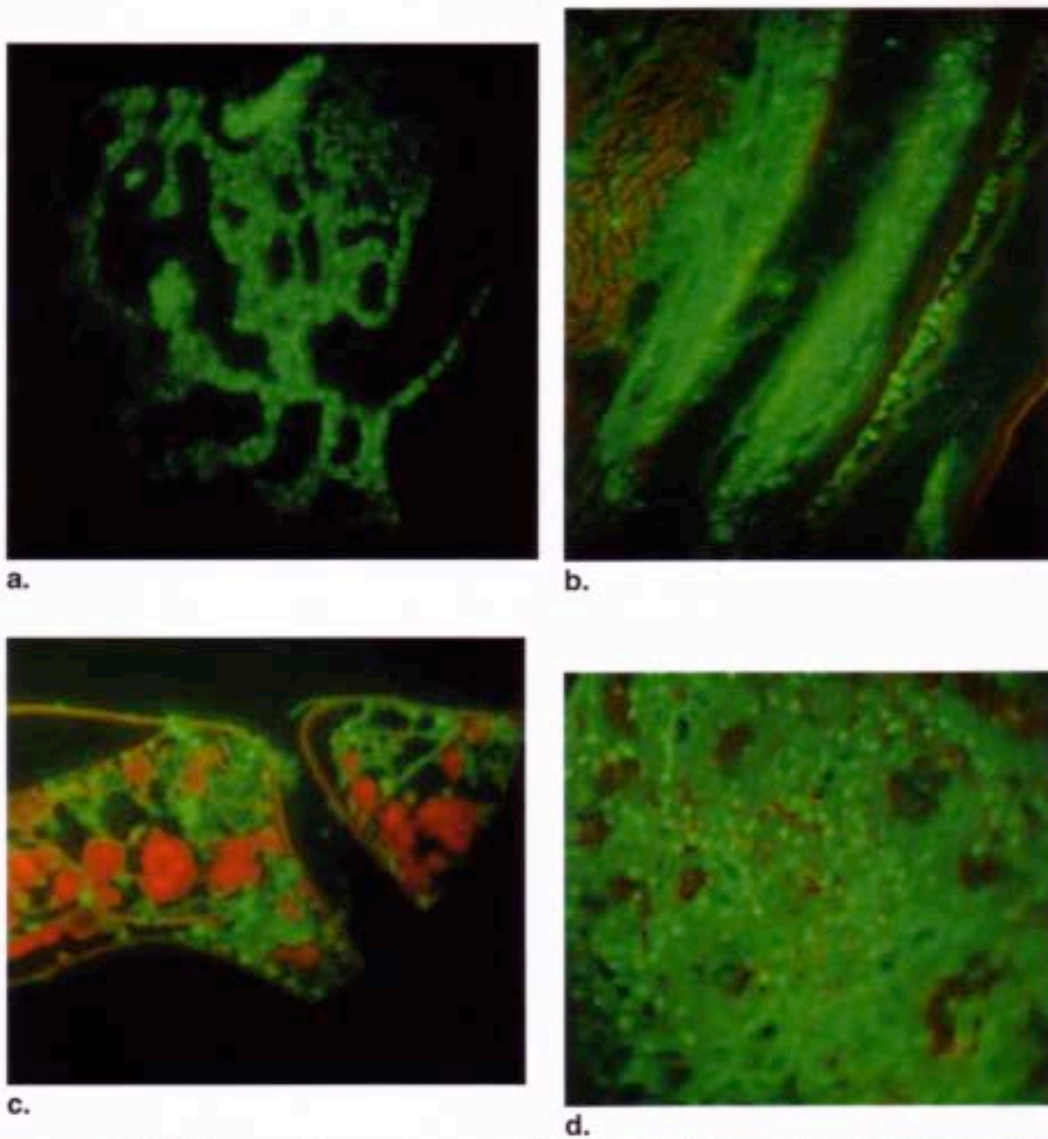


Figura 10. Tejidos positivos a la reacción de apoptosis en los camarones que murieron con infección aguda por WSSV (puntos verdes fluorescentes corresponden a la reacción positiva) **a.** Glándula antenal: **b.** Epitelio de estómago **c.** Apéndices bucales **d.** Organo linfoide.

Elaborado por Sara Blake Grey.

Tabla 5. Porcentaje de animales y tejidos con células apoptóticas en la población infectada con WSSV

TEJIDOS ANALIZADOS	Leves-24 h	Agudos	Crónicos-14d
Glándula antenal	80	56	0
Epitelio cuticular general	60	22	0
Epitelio de estómago	40	44	0
Tejido conectivo	60	44	0
Organo linfoide	0	11	0
Apéndices bucales	60	33	0
Cordón nervioso	60	11	0
Músculo	60	44	0
% Tejidos Positivos	75	100	0
% de Animales Positivos	100	100	0
Total Animales Observados	5	9	8

Resultados de la presente investigación. Elaborado por Sara Blake Grey

- ***Indice inmunitario de infiltración***

A las 24 h p.i se observó el proceso de infiltración en el tejido conectivo de estómago de la mayoría de los camarones de la muestra y en porcentajes más bajos en la glándula antenal, epitelio de estómago, corazón, branquias y músculo (Tabla 6). En los camarones muertos con infección aguda los hemocitos se observaron en tejido conectivo de estómago y branquias. En este grupo los porcentajes de tejidos y animales positivos para la reacción de apoptosis fueron muy bajos. La muestra de los animales crónicos de 7 d p.i presentó hemocitos infiltrantes en la mayoría de los tejidos; El tejido conectivo de estómago y branquias presentaron los más altos porcentajes de infiltración en la muestra. Para los animales crónicos de 14 d p.i, el tejido conectivo de estómago y hepatopáncreas fueron los tejidos con los más altos porcentajes de infiltración. (Tabla 6).

Tabla 6. Porcentajes de tejidos y camarones con infiltración de hemocitos en la población infectada WSSV

TEJIDOS ANALIZADOS	Leves-24h	Agudos	Crónicos-7d	Crónicos-14d
Glándula antenal	20	0	38	0
Epitelio cuticular general	0	0	0	0
Epitelio de estómago	20	0	13	0
Tejido conectivo	80	11	75	33
Organo linfoide	0	0	38	0
Corazón	20	0	38	11
Boca	0	0	25	0
Branquias	20	11	50	11
Hepatopáncreas	0	0	38	33
Músculo	20	0	38	44
% Tejidos Positivos	60	20	90	40
% Animales Positivos	80	22	88	44
Total Animales Observados	5	9	8	9

Resultados de la presente investigación. Elaborado por Sara Blake Grey

El análisis estadístico reportó diferencias significativas entre los grupos ($p=0.032$) (Figura 11; Anexo IIc:). El estadístico Tukey, indicó que el índice de infiltración no fue diferente entre los camarones crónicos de 7 (0.16), crónicos 14 d (0.06), e infectados leves de 24 h (0.07). Pero el índice de infiltración de los crónicos 7 d es significativamente mayor que en los camarones agudos (0.01).

El análisis de X^2 fue utilizado para analizar la asociación entre el índice de infiltración y la variable color Rosado obteniéndose un $p=0,05395$, indicando que las variables no estuvieron asociadas (independientes) (Anexo IVb).

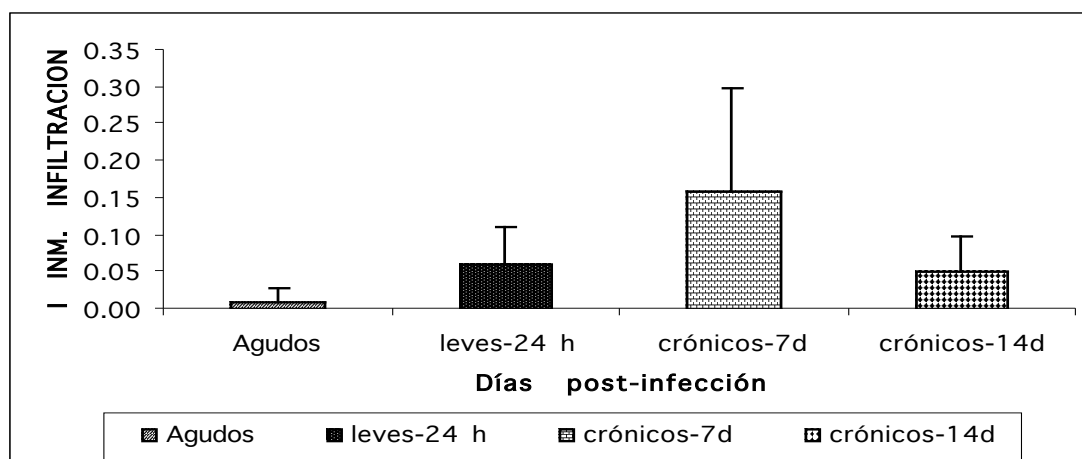


Figura 11. Indices inmunitarios de infiltración de hemocitos en la población infectada por WSSV. Resultados de la presente investigación. Elaborado por Sara Blake Grey

- ***Respuesta inmunitaria de formación de esferoides***

Como se hizo referencia anteriormente, en los camarones con infección leve se observaron solamente los esferoide Tipo A. En los camarones con infección aguda se observaron esferoides de tipo A y C en el órgano linfoide, en bajo porcentaje se observaron algunos de tipo B. Escasos túbulos fueron normales. (Tabla 7). Es necesario aclarar que solo en el 55 % de la muestra fue posible analizar este tejido.

En los animales crónicos de 7 d predominaron los esferoides de tipo A, pero también se observaron los morfotipos B, C y algunos túbulos normales. En los animales crónicos de 14 d se observaron esferoides Tipo A en la mayoría de los camarones analizados, en esta muestra también se observaron túbulos normales. Los camarones crónicos en general presentaron un mayor porcentaje de túbulos normales que aquellos con infección aguda. Los camarones con infección leve y los crónicos presentaron mayor porcentaje de

esferoide Tipo A; Sin embargo los camarones que murieron con infección aguda presentaron mayor porcentaje de esferoides de Tipo C.

Tabla 7. Porcentajes de esferoides en el órgano linfoide en camarones infectados por WSSV

Tipos de Esferoides	Leves-24h	Agudos	Crónicos-7d	Crónicos-14d
A	100	50	54.3	81.4
B	0	8	14.3	2.9
C	0	40	14.3	0
Normal	0	2	17	15.7
% de animales positivos	100	55.6	87.5	77.8
Total animales observados	5	9	8	9

Resultados de la presente investigación. Elaborado por Sara Blake Grey

4.2.3 Naturaleza de las poblaciones hemocitarias infiltrantes

Los tejidos positivos para cada anticuerpo son presentados en el Anexo V. En la muestra de camarones con infección leve, el anticuerpo 40E10, que reconoce poblaciones de hemocitos hialinos pequeños, marcó los podocitos del celosoma de la glándula antenal (Figura 12a). Este anticuerpo marcó también los hemocitos de los espacios hemales en la población crónica de 14 d p.i. En esta muestra se observaron también hemocitos hialinos grandes (reconocidos por el anticuerpo 41B12) en el tejido conectivo de estómago, entre los túbulos del hepatopáncreas, glándulas tegumentales y órgano linfoide. Los fagocitos fijos del corazón fueron marcados por los dos anticuerpos en las muestras de camarones con infección leve y en crónicos de 14 d p.i. Los esferoides en el órgano linfoide fueron marcados por el anticuerpo que reconoce los hemocitos hialinos grandes, mientras que los túbulos normales del órgano linfoide se marcaron por el anticuerpo que reconoce los hemocitos hialinos pequeños (figura 12b).

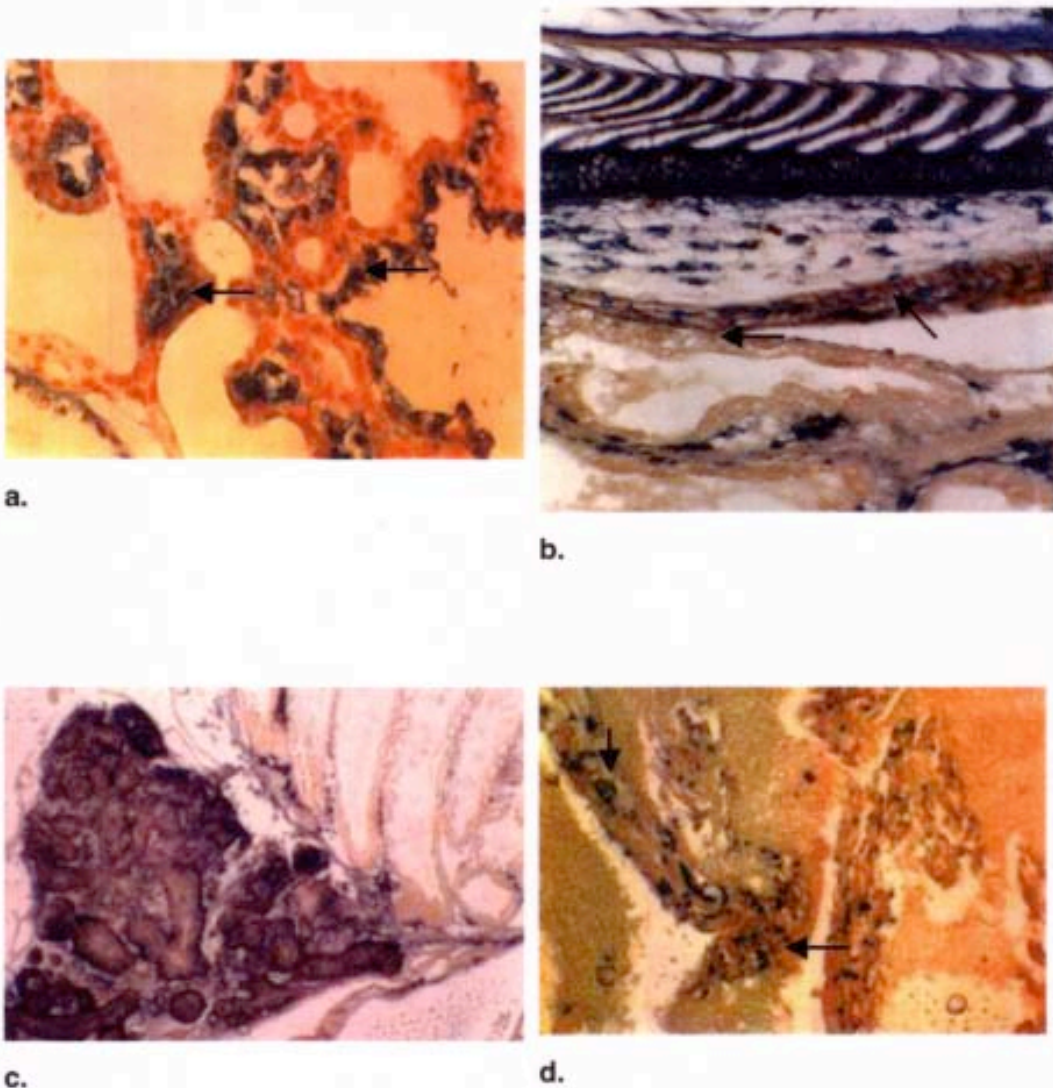


Figura 12. Hemocitos infiltrantes reconocidos mediante anticuerpos.

- a** Anticuerpo para hemocitos hialinos pequeños en glándula antenal, podocitos marcados.(flechas) **b.** Hemocitos hialinos grandes en tejido conectivo del estómago (flechas) **c.** Esferoides marcados en el órgano linfoide (anticuerpo anti-hemocitos grandes hialinos). **d.** Fagocitos fijos marcados en el corazón (flechas).

Elaborado por Sara Blake Grey.

5. DISCUSION

Este trabajo estuvo enfocado por una parte en encontrar una relación entre los signos externos y el grado de lesión en los tejidos. El aspecto externo puede ser un indicador de el grado de infección y por tanto de la capacidad de respuesta inmunitaria que tendrían los animales, lo cual serviría como una herramienta de diagnóstico para el productor. Por otra parte se enfocó también en el estudio de los mecanismos de defensa celular en camarones infectados con WSSV pero capaces de enfrentar la agresión viral. Para realizar la investigación se provocó una infección sub-letal por baño a 28 °C.

Para comprender como se manifiesta la defensa inmunitaria del camarón ante la presencia de procesos infecciosos como las patologías virales, es importante considerar el método de infección. En estudios experimentales, Wu *et al.* (2001), han demostrado que el agua constituye un vehículo de transmisión del WSSV. En este estudio se seleccionó el baño como método de infección en base a los resultados de ensayos previos con el material viral, los mismos que mostraron mayor eficacia en las infecciones con baño que con infecciones *per os*. Chou *et al.*, 1998, ensayaron la transmisión del WSSV vía oral y por el agua en las especies *P. monodon*, *M. japonicus* y *Penaeus penicillatus*. Para el baño sumergieron los animales en un filtrado diluido durante dos horas, en estas especies las mortalidades fueron del 100 % dentro de los 4-6 d p.i indicando la efectividad del método. Sin embargo las concentraciones utilizadas para el baño y en la infección oral fueron diferentes.

A nuestro conocimiento, no existe en la literatura algún estudio que compare la eficacia de un mismo material viral en infecciones *per os* y por baño. Este tipo de estudio no

formaba parte de nuestro trabajo. Sin embargo, considerando el riesgo que implica el agua como vehículo de transmisión sería importante en el futuro realizar investigaciones para determinar la carga viral mínima necesaria para incidir sobre la prevalencia. En lo que respecta a nuestro estudio, la infección sub-letal se desarrolló, indicando que el agua sirvió como vehículo para infectar a los animales.

La técnica de PCR es un método de diagnóstico que permite detectar infecciones en grado muy leve, permitiendo diagnosticar infecciones antes que aparezcan los signos clínicos de la enfermedad. Mediante esta técnica el virus fue detectado en la población antes de la infección experimental. Además la infiltración de hemocitos y los esferoides de tipo A observados mediante histología, nos hacen pensar que la población estaba en alerta inmunitaria, confirmando que la población de estudio no era SPF. Sin embargo la histología realizada en los mismos animales no mostró lesiones por WSD ni por ningún otro virus indicando que incluso los positivos para WSSV por PCR eran portadores sanos.

El diagnóstico realizado por PCR en la población con infección leve (24 h p.i), corroboró los resultados obtenidos por Chang *et al.* (1998), quienes reportaron que las lesiones por WSSV se detectan temprano en branquias e integumento, reconociendo a estos tejidos como blancos iniciales de replicación del virus en infecciones por medio del agua; resultados similares son reportados por Soon *et al.* (2001), en infecciones *per os*. En infecciones previas realizadas en CENAIM (Sonnenholzner *et al.*, 2002; Maldonado, 2003), se ha reportado infección temprana de la glándula antenal. Nuestros resultados mostraron lesiones en este tejido en animales con infección aguda, pero no en aquellos con infección leve.

Por otra parte, en esta muestra se observaron tejidos internos infectados, sugiriendo que una vez dentro del animal el virus manifiesta tropismo por ciertos tejidos como OL y nódulos hematopoyéticos. Según Van de Braak *et al.* (2002), el OL en los peneidos es el responsable de la remoción de material extraño de la hemolinfa, donde son inmovilizados antes de llegar al sistema circulatorio abierto de estos organismos; así cuando las partículas extrañas son detectadas, los hemocitos se establecen en primer lugar en el OL para fagocitarlas. Lo anterior explicaría que desde las 24 h, se detectaran lesiones características de WSD en el OL. Sin embargo la presencia de esferoides en el OL en la población inicial y el resultado positivo para WSSV por PCR sugieren que existió una infección previa, que pudo ser la responsable de la presencia de las lesiones en tejidos internos a las 24 h p.i después del desafío provocado en nuestro estudio. También el virus manifestó preferencia de forma muy temprana por el tejido hematopoyético, situación de potencial peligro para la respuesta inmune del hospedero. Utilizando el método *per os*, en otros trabajos realizados en CENAIM (Sonnenholzner *et al.*, 2002; Cárdenas, 2004 comunicación personal) se reportaron infecciones en tejidos internos a partir de las 72 h p.i.

Adicionalmente a las 24 h p.i se detectó señal con los anticuerpos anti-WSSV en las glándulas tegumentales del borde del labio y en otras tegumentales del cuerpo, pero no en todo el tejido glandular como ya ha sido observado por (Cárdenas 2004, comunicación personal), en infecciones *per os*. Estos resultados sugieren que las glándulas tegumentales de la región oral constituyen una puerta de entrada del WSSV, independientemente del método de infección y que la infección temprana de este tejido estaría más relacionada con el tipo de glándula tegumental que con la ubicación de las mismas en los apéndices bucales.

También a las 24 h se detectó el mayor nivel de células apoptóticas, estas se observaron principalmente en los tejidos más expuestos al medio ambiente (glándula antenal y epitelios) sugiriendo que este proceso celular funcionaría como un mecanismo temprano para frenar la invasión viral en infecciones por baño, considerando estos tejidos como otras rutas de ingreso al virus. Observaciones histológicas tanto rutinarias como de animales desafiados experimentalmente señalan a la glándula antenal como uno de los tejidos iniciales de infección con WSSV, sin embargo este tejido por lo general no llega a niveles severos de WSD (Panchana, comunicación personal) y en el caso que nos concierne a las 24 h p.i no presentaron lesiones pero si se presentaron en los camarones con infección aguda, estos últimos presentaron menos apoptosis en este tejido. En los camarones con infección leve los tejidos con apoptosis no mostraron señal de infección con WSSV. En este sentido nuestros resultados concuerdan con los de Granja *et al.* (2003), quienes encontraron mayor índice de células apoptóticas en camarones mantenidos a 32 °C en los cuales el porcentaje de camarones positivos al virus por H&E fue bajo con respecto a aquellos que permanecieron a 25 °C, los cuales desarrollaron la enfermedad.

Otro signo histológico de WSD encontrado en nuestro estudio fue la necrosis que presentaron las muestras de los camarones con infección leve (24 h), pero en menor grado que la observada en los camarones muertos-agudos. Según Wongteerasupaya *et al.* (1995), los camarones infectados por WSSV exhiben una necrosis variable en la mayoría de los tejidos de origen ectodérmico y mesodérmico.

Mohan y Shankar (1998), clasificaron el brote de WSD en los peneidos en tres tipos según la manifestación de los signos clínicos: Tipo I, fase sub-aguda, cuando la severidad

de la infección en los tejidos es moderada a alta, las mortalidades significativas ocurren entre los días 7 y 10 p.i y los camarones muestran manchas blancas en el exosqueleto. Tipo II, aguda, cuando los camarones afectados presentan coloración rojiza, el nivel de severidad de la infección en los tejidos es muy alta y ocurren mortalidades masivas entre los días 2-3 p.i. Tipo III, (crónica), con baja severidad de lesión en los tejidos, las manchas blancas y la coloración rojiza están ausentes y las mortalidades se extienden durante 15-28 días.

Todos los camarones que desarrollaron una infección aguda, murieron presentando WSD en grado 4 en la mayoría de sus tejidos y coloración rojiza del cuerpo. En los mismos, el epitelio de estómago, seguido de la glándula antenal mostraron grados muy severos de infección. Las células de estos camarones mostraron la apariencia de estar *vacías*; Al respecto Wang *et al.* (1999), observaron bajo el microscopio de luz, que durante la etapa final de la infección, el núcleo de todas las células se desintegra resultando en espacios vacíos. Estos camarones presentaron además un alto grado de necrosis, lo cual está de acuerdo a los resultados de Wang *et al.* (1999), quienes reportaron que la mayoría de los órganos y tejidos de camarones fuertemente infectados por WSSV muestran una necrosis focal que conduce a la pérdida de la estructura tisular. Los resultados sugieren que los camarones mueren con una infección avanzada en los tejidos, por tanto no podríamos afirmar que la muerte de los camarones fue ocasionada por apoptosis, apoyando las conclusiones de Khanobdee *et al.* (2002), en un estudio realizado en animales infectados por YHV, ya que los animales agudos sufren un extensivo y complejo deterioro de sus tejidos y órganos (lesiones avanzadas de WSD, necrosis, apoptosis) comprometiendo las funciones vitales. Rajan *et al.* (2000), señalan que un extenso daño observado en los

tejidos puede ser suficiente para reducir la eficiencia fisiológica y funcional de los hospederos, provocando que aumenten los signos clínicos de la epizootia por WSSV.

Entre el color rojizo de los camarones que mueren y los índices tanto de WSD como de necrosis fue encontrada una asociación significativa. La infiltración de hemocitos no mostró asociación con el color rosado de este grupo.

Por otra parte los camarones que murieron presentaron tres tipos de esferoides en el órgano linfoide de los cuales los de Tipo A y C fueron observados en porcentajes similares. Sin embargo este grupo presentó mayor porcentaje de esferoides Tipo C que los camarones crónicos, en los cuales fue mayor el porcentaje de esferoides de Tipo A. La relación de estos esferoides con la infección con WSSV merece ser investigada en el futuro. Hasson *et al.* (1999a) en su estudio sobre TSV señalan que los esferoides tipo A corresponden a una infección viral indetectable o a la eliminación del virus por un mecanismo desconocido. Sin embargo el porcentaje observado de esferoides tipo B en los crónicos de 7 d p.i sugiere la presencia del virus no confirmado mediante las técnicas necesarias para esto. Además, según Hasson *et al.* (1999a), los esferoide Tipo C corresponden a la última etapa de la infección, mientras que el final de la fase crónica de TSV depende de la competencia entre dos procesos: la replicación y la eliminación viral; Considerando la hipótesis de estos autores, la aparición de túbulos normales en el órgano linfoide de los camarones crónicos sugiere el final de la fase crónica de la infección por WSSV y la regeneración celular.

Esferoides ectópicos han sido reportados por Hasson *et al.* (1999b), en apéndices que contienen glándulas tegumentales, mientras que Maldonado (2003), reporta estos

esferoides entre los túbulos del hepatopáncreas, epitelio del estómago y apéndices de la familia F1 (resistente) y también en corazón de la F12 (susceptible). Nuestros resultados mostraron estos esferoides en el tejido conectivo de los apéndices bucales de manera similar a lo reportado por Hasson *et al.* (1999b), pero con la diferencia que se detectaron mayoritariamente en tejidos conectivos del cuerpo los cuales no pudieron ser asociados a la presencia de glándulas tegumentales.

Al contrario de lo reportado por Mohan y Shankar (1998), en nuestro estudio, los camarones que manifestaron manchas blancas sobre el exoesqueleto (las cuales se hicieron más intensas con el transcurso de los días), desarrollaron una infección crónica; Según Lightner (1996), las manchas pueden desarrollarse en la fase crónica o de recuperación de la infección. Además estos camarones manifestaron el aspecto opaco reportado por otros autores (Lightner, 1996; Rajan *et al.* (2000), y de manera similar a lo observado por (Mohan y Shankar, 1998; Lightner, 1996), no presentaron coloración rojiza en el cuerpo.

Wang *et al.* (1999), observaron que los puntos blancos siguen el mismo patrón de distribución de los poros de las glándulas tegumentales, sugiriendo que durante infecciones virales, estas glándulas son necrosadas y melanizadas; Además ciertas zonas de la cutícula podrían deteriorarse debido al bloqueo del transporte de las sustancias para su mantenimiento desde las células epiteliales, lo cual sería la razón para que la cutícula presente los puntos blancos que estarían compuestos de material estructural melanizado de las glándulas tegumentales, lesiones cuticulares deterioradas embebidas en la cutícula, células muertas y exudados cuticulares que se han quedado bloqueados en la interfase

células epiteliales-cutícula (Wang *et al.*, 1999). En ocasiones la histología de nuestro estudio mostró glándulas tegumentales muy cercanas a la cutícula (datos no mostrados).

Los resultados de estos autores nos harían pensar que las lesiones melanizadas observadas en los camarones crónicos de nuestro estudio estarían relacionadas con un deterioro de la cutícula como consecuencia del daño en las capas subcuticulares al entrar el virus por otras regiones, así la cutícula se tornaría frágil y fácilmente dañada ante los golpes del animal contra las paredes de los recipientes causando estas lesiones. Esto explicaría que no se encontró asociación entre las lesiones melanizadas respecto a los índices de WSD y necrosis.

El aspecto lechoso no mostró asociación con el índice de WSD. Sería adecuado determinar las causas de esta condición en los camarones ya que como se apreció en el estudio, este signo apareció temprano, aumentó rápidamente aún cuando los signos internos no se habían detectado y además se mantuvo en niveles muy altos en la población que ya no presentó lesión interna de WSD. Por otra parte, en nuestro estudio las manchas blancas siguieron un patrón ordenado y simétrico dando a los animales el aspecto segmentado. Referente a la cola roja este signo no presentó relación con los índices de WSD y necrosis.

Los animales crónicos de los 7 d manifestaron lesiones leves por WSD, pero con excepción del hepatopáncreas, ya no presentan necrosis; Tampoco presentaron apoptosis, y mostraron la infiltración más alta de hemocitos. Los animales crónicos de 14 d no mostraron lesiones de ningún tipo mostrando una extensiva infiltración.

Van de Braak *et al.* (2002), señalan que durante una infección por WSSV, los hemocitos dejan la circulación y migran a los tejidos donde están presentes muchas células infectadas. Al respecto, Sonnenholzner *et al.* (2002), observaron infiltración a partir del segundo día p.i, con un máximo a los cuatro días en camarones mantenidos a 33 °C (supervivientes a la infección); Nuestros resultados indican que los camarones pueden ofrecer este tipo de respuesta inmune ante infecciones leves realizadas a 28 °C. Los animales que no respondieron de esta manera pertenecieron a aquella pequeña fracción de la población que desarrolló una infección aguda, sugiriendo una posible relación inversa entre severidad de infección y ausencia de hemocitos en los tejidos.

También en los camarones crónicos de 14 d los anticuerpos mostraron que los fagocitos fijos del corazón serían hemocitos pequeños y grandes hialinos. En tanto que los hemocitos grandes hialinos estarían presentes en el tejido conectivo del estómago, en los espacios hemales del hepatopáncreas y estarían implicados en la formación de esferoides. Los túbulos del órgano linfoide fueron marcados por el anticuerpo anti-hemocitos pequeños hialinos sugiriendo la presencia de estas células en el estroma de este órgano, señalado por la literatura por su capacidad para filtrar partículas virales de la hemolinfa (Van de Braak, 2002). Este anticuerpo también marcó los podocitos de la glándula antenal, otro tejido implicado en la filtración de partículas circulantes en la hemolinfa. Esta localización de hemocitos concuerda con las observaciones de Ruiz y Cárdenas (2004, comunicación personal), en infecciones *per os* con WSSV sugiriendo que la diferencia durante los procesos infecciosos (baño vs *per os*), está dada por la intensidad de la infección y no por la localización de las poblaciones hemocitarias.

En conclusión se logró infectar a los animales, obteniéndose una alta supervivencia sin utilizar hipertermia. Consideramos que esto fue el producto de varios factores: 1) La infección se desarrolló de manera sub-letal, 2) Se utilizó una temperatura adecuada para una buena respuesta de *L. vannamei* a las infecciones virales, 3) Las condiciones experimentales garantizaron que no se produjera reinfección por canibalismo, 4) La población no era SPF y la presencia previa de agentes virales en animales en buenas condiciones fisiológicas (ya que estaban a 28 °C) podría haber desencadenado alguna forma de respuesta inmune adaptativa.

Referente a los mecanismos de defensa celular se evidencia que la apoptosis puede ser considerada una de las primeras respuestas de los camarones ante las infecciones virales, aunque este mecanismo no parece ser muy eficaz para frenar la entrada del virus en aquel porcentaje susceptible dentro de la población. Sin embargo en aquellos camarones que presentan mejores condiciones, el proceso de apoptosis al inicio seguido de infiltración de hemocitos hacia todos los tejidos del animal, regeneración del OL y esferoides Tipo A, serían los mecanismos que utilizarían los camarones para defenderse del WSSV a una temperatura de 28 ° C. Un modelo resumen de las vías de entrada del virus y la respuesta celular de los camarones a la infección por WSSV es presentado en el Anexo VI.

Los resultados sugieren además que la mayor parte de la población puede enfrentar al WSSV y eliminarlo de sus tejidos en menos de 14 días. Sin embargo una pequeña fracción de los animales (en nuestro caso 8 %) es altamente susceptible y mueren en etapas tempranas de la infección. Estos podrían incrementar la carga viral del medio y servir de papilla reinfeciosa; por ende, en las piscinas este pequeño porcentaje de la

población es de potencial peligro; Sería interesante estudiar los mecanismos de detección y eliminación de estos animales de los sistemas de cultivo.

Al extrapolar nuestros resultados a las condiciones naturales de las piscinas podríamos asumir que en infecciones sub-letales y con temperaturas adecuadas para el buen funcionamiento fisiológico del camarón las mortalidades pueden ser muy bajas, como se observa en el invierno ecuatoriano.

6. CONCLUSIONES

- 1) Los resultados de histología (4/5) y supervivencia (92%), a las 24 h p.i confirmaron que la infección sub-letal se realizó exitosamente en nuestras condiciones experimentales.
- 2) A las 24 h p.i se detectó WSSV en tejidos expuestos al medio (branquias y epitelios) y en algunos tejidos internos sugiriendo que el virus manifiesta un temprano tropismo por ciertos tejidos (órgano linfoide, tejido hematopoyético), en infecciones por baño.
- 3) A las 24 h se detectó señal con los anticuerpos anti-WSSV en las glándulas tegumentales del borde del labio, sugiriendo que estas constituyen una puerta de entrada del WSSV en infecciones por baño.
- 4) El mayor nivel de células apoptóticas se detectó en los animales con infección leve 24 h p.i en glándula antenal y epitelios. Estos tejidos no presentaron lesiones típicas de WSD.
- 5) Los camarones que murieron presentaron coloración rojiza del cuerpo, apoptosis, WSD en grado 4, necrosis en la mayoría de sus tejidos, bajo índice de infiltración y el mayor porcentaje de esferoide Tipo C. En glándula antenal y epitelios presentaron apoptosis y lesiones de WSD.

- 6) Los camarones que sobrevivieron manifestaron manchas blancas, nunca presentaron coloración rojiza en el cuerpo, mostraron esferoides Tipo A y alto índice de infiltración de hemocitos. Estos limpiaron el WSSV de sus tejidos.
- 7) La apoptosis de tejidos expuestos (epitelios, glándula antenal, región oral) puede ser considerada una respuesta temprana de los camarones ante la agresión por WSSV transportado por el agua.
- 8) Los anticuerpos indicaron que los fagocitos fijos del corazón serían hemocitos pequeños y grandes hialinos. Los hemocitos grandes hialinos estarían presentes en el tejido conectivo del estómago y entre los túbulos del hepatopáncreas; También estarían implicados en la formación de esferoides
- 9) El anticuerpo que reconoce los hemocitos pequeños hialinos marcaron el estroma de los túbulos del órgano linfoide y los podocitos de la glándula antenal. Ambos tejidos están implicados en la filtración de partículas circulantes en la hemolinfa.
- 10) Esferoides ectópicos fueron observados en el tejido conectivo de los apéndices bucales (algunos asociados a las glándulas tegumentales). Los esferoides ectópicos del tejido conectivo de otras zonas del cuerpo no pudieron ser asociados a la presencia de glándulas tegumentales.
- 11) La coloración rojiza y las manchas blancas mostraron asociación con el índice de WSD y necrosis. La infiltración de hemocitos no estuvo asociada a la coloración rojiza. El aspecto lechoso y segmentado, las lesiones melanizadas y

la cola roja no fueron asociadas al índice de WSD. La probabilidad de detectar las manchas blancas blancas, el aspecto lechoso y lesiones melanizadas incrementaron con el transcurso del tiempo de infección.

- 12) Apoptosis al inicio de la infección seguida de infiltración de hemocitos hacia todos los tejidos del animal y esferoides serían los mecanismos que utilizarían los camarones para defenderse del WSSV a una temperatura de 28 ° C.

7. RECOMENDACIONES

1. Considerando el riesgo que implica el agua como vehículo de transmisión en los sistemas de cultivo de camarones sería importante realizar investigaciones para determinar la dosis infectiva teniendo en cuenta la temperatura para el estudio.
2. Investigar la relación entre los esferoides con la infección por WSSV.
3. Establecer mecanismos de detección y eliminación de los animales más susceptibles dentro de los sistemas de cultivo para evitar que sirvan como medio de reinfección en el sistema.

8. BIBLIOGRAFIA

- Alday, V. 1999. Diagnóstico y prevención de la enfermedad del punto blanco. *El Mundo Acuícola* 5 (1): 3-7.
- Alday, V. 2000. El virus de la cabeza amarilla. Información general, técnicas de diagnóstico y prevención. *El Mundo Acuícola* 5(1): 3-4.
- Anggraeni, M. S. y L, Owens. 2000. The haemocytic origin of lymphoid organ spheroids cells in the penaeid prawn *Penaeus monodon*. *Diseases of Aquatic Organisms* 40: 85–92.
- Bachère, E. 2000. Shrimp immunity y disease control. *Aquaculture* 191: 3-11.
- Bachère, E., D. Destoumieux, y P. Bulet. 2000. Penaeidins, antimicrobial peptides of shrimp: A comparison with other effectors of innate immunity. *Aquaculture* 191: 71–88.
- Bayne, Ch. J. 1990. Phagocytosis y Non-Self Recognition in Invertebrates. *BioScience* 40 (10): 722- 731.
- Bayot, B. 2003. Epidemiologic study of shrimp diseases in ponds cultured with *Penaeus vannamei* y relationship with some environmental y management variables (Ecuador). Masters thesis Katholieke Universiteit Leuven. Belgium. 1-75p.
- Bell, T. y D. Lightner. 1998. A Handbook of Normal Penaeid Shrimp Histology. The World Aquaculture Society. State of Hawaii, Arizona. USA. 2-6p.
- Cámara Nacional de Acuicultura (CNA). 1987. Se Realizó la Union Mediante Expedición de la Ley que Crea la Cámara Nacional de Acuicultura. *Acuicultura del Ecuador* 40-42p.
- Cedeño, R. 1998. Evaluación clínica de ensayos inmunitarios en el camarón *Penaeus vanamei*. Tesis de Acuicultura. Escuela Superior Politécnica del Litoral. Ecuador.

- Chang, P. H. C. Chen, y Y. C. Wang. 1998. Detection of white spot syndrome associated baculovirus in experimentally infected wild shrimp, crab y lobsters by in situ hybridization. *Aquaculture* 164: 233-242.
- Chavarría, J. 2003. Desarrollo de un sistema de alerta climática para acuicultura - Parte I: Las evidencias de la relación clima-producción. Boletín informativo No. 81, Fundación CENAIM-ESPOL, Guayaquil, Ecuador.
- Cohen, J. J. 1993. Overview: Mechanisms of apoptosis. *Immunology Today* 14(3): 126-130.
- Chou, H. Y., C. Y. Huang, C. F. Lo, y G. H. Kou. 1998. Studies on transmission of white spot syndrome associated baculovirus (WSBV) in *Penaeus monodon* y *Marsupenaeus japonicus* via water-borne contact y oral ingestion. *Aquaculture* 164: 263-276.
- DeadEndtm Fluorometric TUNEL System. [Http://www.Promega.com](http://www.Promega.com). Technical Bulletin 235: 1-19 p.
- Destoumieux, D., P. Bulet, D. Loew, A. Van Dorsselaer, J. Rodríguez, y E. Bachère. 1997. Penaeidins, a new family of antimicrobial peptides isolated from the shrimp *Penaeus vannamei* (Decapoda). *The Journal of Biological Chemistry* 272 (45): 28398-28406.
- Destomieux, D., Muñoz, M., Cosseau, C., Rodríguez, J., Bulet, P., Comps, M. y Bachère, E. 2000. Penaeidins, antimicrobial peptides with chitin-binding activity, are produced y stored in shrimp granulocytes y released after microbial challenge. *Journal of Cell Science* 113: 461- 469.
- Durand, S., D. V. Lightner, J. R. Bonami, y R. M. Redman. 1997. Ultrastructure y morphogenesis of White Spot Syndrome Baculovirus (WSSV). *Diseases of Aquatic Organisms* 29: 205-211.

- Durand, S., K. F. T. Tang, y D. V. Lightner. 2000. Frozen commodity shrimp: potencial avenue for introduction of white spot síndrome virus and yellow head virus. *Journal of Aquatic Animal Health* 12: 128-135.
- Durand, S V., y D. V. Lightner. 2002. Quantitative Real Time PCR for the measurement of white spot syndrome virus in shrimp. *Journal of Fish Diseases* 25: 381-389.
- Flegel, T. W. y T. Pasharawipas. 1998. Active viral accommodation: A new concep for Crustacean Response to viral Patogen. In: Flegel, T. W. (Eds). *Advances in Shrimp Biotechnology*. Nationatinal Center for Genetic Engeneerig y Biotechnology. Bangkok 245-250p.
- Freire, M. R, y M. A. Barracco. 2000. Lectins, as non-self-recognition factors, in crustaceans. *Aquaculture* 191: 23-44.
- Granja, C., L. F. Aranguren., O. M. Vidal, L. Aragón, y M. Salazar. 2003. Does hypertermia increase apoptosis in white spot syndrome virus (WSSV) i@fected *Litopenaeus vannamei*. *Diseases of Aquatic Organisms* 54: 73-78.
- Häcker, G. 2000. The morfology of Apoptosis. *Cell Tissue Res* 301: 15-17.
- Hasson, K. W., D. V. Lightner, B. T. Poulos, R. M. Redman, B. L. White, J. A. Brock, y J. R. Bonami. 1995. Taura Síndrome in *Penaeus vannamei* : demostración of a viral etiology. *Diseases of Aquatic Organisms* 23: 115--126.
- Hasson, K., D. V. Lightner, L. L Mohny, R. M. Redman, y B. M. White. 1999a. Role of lymphoid organ spheroids in chronic Taura syndrome virus (TSV) infections in *Penaeus vannamei*. *Diseases of Aquatic Organisms* 38: 93-105.
- Hasson, K., D. V. Lightner, L. L Mohny, R. M. Redman, B. T. Poulos, y B. L. White. 1999b. Taura Syndrome Virus (TSV) lesion development y the disease cycle in the Pacific white shrimp *Penaeus vannamei*?. *Diseases of Aquatic Organisms* 36: 81-93.

- Hewitt, D. R., y P. F. Duncan. 2001. Effect of high water temperature on the survival, moulting y food consumption of *Penaeus (Marsupenaeus) japonicus* (Bate, 1888). *Aquaculture Research* 32: 305-313.
- Jiang, D., J. Rocha, D. Ciobanu, A. Mileham, y H. Van der Steen. 2004. Quantitative, Molecular Genetic Selection for Shrimp Disease resistance. *Global Aquaculture Advocate* 55-55p.
- Jiménez, R. 1992. Síndrome de Taura. (Resumen) *Acuicultura del Ecuador* 1: 1-16.
- Johnson, P. T. 1987. A review of fixed phagocytic y pinocytotic cells of decapod crustaceans, with remarks on hemocytes. *Development y comparative immunology* 11: 679-704.
- Kautsky, N., P. Ronnback, M. Tedengren, y M. Troell. 2000. Ecosystem perspectives on management of disease in shrimp pond farming. *Aquaculture* 191: 145-161.
- Khanobdee, K., CH. Soowannayan, T. W. Flegel, S. Ubol, y B. Withyachumnarnkul. 2002. Evidence for apoptosis correlated with mortality in the giant black tiger shrimp *Penaeus monodon* infected with yellow head virus. *Diseases of Aquatic Organisms* 48: 79-90.
- Kou, G. H., S. E. Peng, Y. L. Chiu, y C. F. Lo. 1998. Tissue distribution of white spot syndrome virus (WSSV) in shrimp y crabs. *En Flegel, T. W. Advances in shrimp biotechnology*. National Center for Genetic Engineering y Biotechnology, Bangkok 267-271p.
- Kurosky, P. J., B. Xu, A. K. Chopra, D. H. Coppenhaver, I. P. Singh, S. Baron. 2000. Broad antiviral activity in tissues of crustaceans. *Antiviral Res* 48 (1): 39 -47.
- Lemasters, J. J. 1999. Mechanisms of Hepatic Toxicity V. Necroptosis y the mitochondrial permeability transition: shared pathway to necrosis y apoptosis. *The American Physiological Society*. 276 (Gastrointes. Liver Physiol.) 39: G1-G6.

- Le Moullac, G. y P. Haffner. 2000. Environmental factors affecting immune responses in crustacea. *Aquaculture* 191: 121-131.
- Lightner, D. V., R. M. Redman, K. W. Hasson, y C. R. Pantoja. 1996. Taura síndrome in *Penaeus vannamei*: Histopatología y ultraestructura. *Diseases of Aquatic Organisms* 21: 53 - 59.
- Lightner, D. V. 1996. Handbook of Pathology y Diagnostic Procedures for Diseases of Penaeid Shrimp. World Aquaculture Society, Baton Rouge, L.A., EE.UU.
- Lightner, D. V., y R. M. Redman. 1998. Shrimp diseases y current diagnostic methods. *Aquaculture* 164: 201-220.
- Lightner, D. V., K. W. Hasson, B. L. White, y R. M. Redman. 1998. Experimental infection of Western hemisphere penaeid shrimp with Asian white spot syndrome virus y Asian yellow head virus. *Aquatic Animal Health* 10:271-281.
- Lightner, D.V., y P. Chen. 2000a. Enfermedad de las Manchas Blancas. <http://www.oie.int> 1-3p.
- Lightner, D.V., y P. Chen. 2000b. Necrosis Hipodérmica Hematopoyética Infecciosa. <http://www.oie.int> 1-3p.
- Lightner, D.V., y P. Chen. 2000c. Enfermedad de la Cabeza Amarilla. <http://www.oie.int>. 1-3p.
- Lightner, D. V., y P. Chen. 2000d. Síndrome de Taura. <http://www.oie.int> 1-3p.
- Lo, C. F., C. H. Ho, C. H. Chen, K. F. Liu, Y. L. Chiu, P. Y. Yeh, S. E. Peng, H. C. Hsu, H. C. Liu, C. F. Chang, M. S. Su, C. H. Wang, y G.H. Kou. 1997. Detection y tissue tropism of white spot syndrome baculovirus (WSBV) in captured brooders of *Penaeus monodon* with a special emphasis on reproductive organs. *Diseases of Aquatic Organisms* 30 (1): 53 -72.

- Maldonado, M. 2003. Respuesta inmunitaria en familias de *Litopenaeus vannamei* bajo condiciones de infecciones con WSSV, el efecto de la adición de β -1,3 glucanos. Tesis de Maestría Escuela Superior Politécnica del Litoral. Guayaquil. Ecuador.
- Mohan, C. V. y K. M. Shankar. 1998. Recent finding on White Spot Syndrome (WSSS) of cultured shrimp; Management implications 18p. En: Sangamaheswaran. A. P., y M. J. P. Jeyaseelan. 2001. White Spot Viral Disease in Penaeid Shrimp-A Review. Naga, The ICLARM Quarterly.
- Molinero, L. 2001. La Regresión Logística. Asociación de la Sociedad Española de Hipertensión. <http://www.seh-lelha.org/rlogis2.htm>
- Momoyama K., Hiraoka., H. Nakano, H. Koube, K Inouye, y N. Oseko. 1994. Mass mortalities of cultured kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicus* in Japan in 1993: histopathological study. Fish Pathology 29: 141-148.
- Montesdeoca, M., Y. Amano, F. Echeverría, I. Betancourt, F. Panchana, M. Sotomayor, y Y. Rodríguez. 2002. La respuesta inmunitaria celular del camaron *Litopenaeus vannamei* al WSSV y su utilidad en el control de la enfermedad en los estanques. El Mundo Acuícola 8: 38-42.
- Muñoz, M., F. Vandenbulcke, D. Saulnier, y E. Bachère. 2002. Expression y distribution of penaeidin antimicrobial peptides are regulated by haemocyte reactions in microbial challenge shrimp. European Journal of Biochemistry 269: 2678-2689.
- Nash, G. L., A. Arkarjamorn, y B. Withyachumnarnkul. 1995. Histological y rapid haemocytic diagnosis of Yellow-head disease in *Penaeus monodon*. Diseases in Asian Aquaculture II 89-98p.
- O'Brien, V. 1998. Viruses y apoptosis. Journal of General Virology 79: 1833-1845.

- Pantoja, C. R., y D. V. Lightner. 2003. Similarity between the Histopathology of White Spot Syndrome Virus y Yellow Head Syndrome Virus y its relevance to diagnosis of YHV disease in the Americas. *Aquaculture* 218: 47–54.
- Rajan, P. R., P. Ramasamy, V. Purushothaman, y G. P. Brennan. 2000. White spot baculovirus syndrome in the Indian shrimp *Penaeus monodon* y *Penaeus indicus*. *Aquaculture* 184: 31-44.
- Rajendran, K. V., K. K. Vijayan, T. C. Santiago, y R. M. Krol. 1999. Experimental host range y histopathology of white spot syndrome virus (WSSV) infection in shrimp, prawns, crabs y lobsters from India. *Journal of Fish Diseases* 22: 183 -191.
- Rodríguez, J., B. Bayot, Y. Amano, F. Panchana, I. de Blas, V. Alday, y J. Calderón. 2003. White spot syndrome virus infection in cultured *Penaeus vannamei* (Boone) in Ecuador with emphasis on histopathology y ultrastructure. *Journal of Fish Diseases* 26: 439-450.
- Rodríguez, R. 2003a. La tilapia y su efecto en la prevalencia del virus de la mancha blanca (WSSV) en poblaciones de camarón. Tesis de Maestría. Escuela Superior Politécnica del Litoral, Guayaquil, Ecuador. Pp 86
- Rodríguez, J. 2003b. Efecto combinado de una precría en hiepertermia e inmunoestimulación. Ensayo en época de transición térmica. CENAIM informa, boletín informativo No. 83. <http://www.cenaim.ESPOL.edu.ec>
- Sahtout A. H., M. D. Hassan, y M. Shariff. 2001. DNA fragmentation, an indicator of apoptosis, in cultured black tiger shrimp *Penaeus monodon* infected whitth white spot syndrome virus (WSSV). *Diseases of Aquatic Organisms* 44: 155-159.
- Sánchez, A., C. Pascual, F. Vargas-Albores, G. Lemullac, y C. Rosas. 2001. Haemolymph metabolic variables y immune response in *Litopenaeus setiferus* adult males: the effect of acclimation. *Aquaculture* 198: 13-28.

- Savill, J., V. Fadok, P. Henson, y C. Haslett. 1993. Phagocyte recognition of cell undergoing apoptosis. *Immunology Today* 14 (3): 131-136.
- Söderhäll, K., y L. Cerenius. 1992. Crustacean Immunity. *Annual Review Fish Diseases* 1: 2- 21.
- Söderhäll, K., L. Cerenius, y M. W. Johansson. 1996. The Prophenoloxidase Activating System in Invertebrates. *En: K. Söderhäll, S. Iwanaga, y G. Vasta. (editors) New directions in Invertebrate Immunology. SOS. Publications. Massachussets, EE.UU* 229- 253p.
- Söderhäll, K., y L. Cerenius. 1998. Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Curr. Opin. Immunol* 10: 23-28.
- Song Y. L., Y. ChI, T. W. Lien, C. C. Huang, y M. N. Lin. 2003. Haemolymph parameters of pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) infected with Taura syndrome virus. *Fish Shellfish Immunol* 14: 317 – 331.
- Sonnenholzner, S., J. Rodríguez, F. Pérez, I. Betancourt, F. Echeverría, y J. Calderón. 2002. Supervivencia y respuesta immune de camarones juveniles *Litopenaeus vannamei* desafiados por vía oral a WSSV a diferentes temperatures. *El Mundo Acuícola* 8 (1): 50-56.
- Soon, L. T., K. L. Lee, M. Shariff, M. D. Hassan, y A. R. Omar. 2001. Quantitative analysis of an experimental white spot syndrome virus (WSSV) infection in *Penaeus monodon* Fabricius using competitive polymerase chain reaction. *Journal of Fish Diseases* 24:315-323.
- Talbot, P., y D. Demers. 1993. Tegumental Gland of Crustacea 151-186. *En: M. N. Horst, y J. A. Freeman (editores). The Crustacean Integument. Morphology y Biochemistry. CRC Press, Londres Inglaterra.*

- Taylor, S. L., L. Jaso-Friedmann, A. B. Allison, A. Eldar, y D. L. Evans. 2001. *Streptococcus iniae* inhibition of apoptosis of nonspecific cytotoxic cell: a mechanism of activation of innate immunity in teleosts. *Diseases of Aquatic Organisms* 46: 15-21.
- Tsai, M. F., G. H. Kuo, H. C. Liu, K. F. Liu, C. F. Chang, S. E. Peng, H. C. Hsu, C. H. y Wang, C. F. Lo. 1999. Long-term presence of white spot syndrome virus (WSSV) in a cultivated shrimp population without disease outbreaks. *Diseases of Aquatic Organism* 38: 107-114.
- Van de Braak, C. B., M. H. Botterblom, E. A. Huisman, J. H. Rombout, y W. P. Van der Knaap. 2002. Preliminary study on haemocyte response to white spot syndrome virus infection in black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Diseases of Aquatic Organism* 51:149-155.
- Vargas-Albores, F., P. Hinojosa-Baltazar, G. Portillo-Clark, y F. Magallón-Barajas. 1998. Influence of temperature y salinity on the yellowleg shrimp, *Penaeus californiensis* (holmes), prophenoloxidase system. *Aquaculture Research* 29: 549-553.
- Vázquez. L., C. Sierra, S. Juárez, C. Agundis, A. Zavala, y E. Zenteno. 1998. Mecanismos de inmunidad en crustáceos. *Interciencia* 23 (6): 344-348.
- Vidal, O. M., C. B. Granja, F. Aranguren, J. A. Brock y M. Salazar. 2001. A profound effect of hyperthermia on survival of *Litopenaeus vannamei* juveniles infected with white spot syndrome virus. *Journal of the World Aquaculture Society* 32 (4): 364-372.
- Walker, P. J., J. A. Cowley, K. M. Span, y C. M. Dimmock. 1998. The Emergence of Yellow Head-Related Viruses in Australia. *En: Flegel, T. W. (Eds). Advances in Shrimp Biotechnology. National Center for Genetic Engineering y Biotechnology. Bangkok* 263p.

- Wang, C. Y., C. F. Lo, P. S. Chang, y G. H. Kou. 1998. Experimental infection of white spot baculovirus in some cultured y wild decapods in Taiwán. *Aquaculture* 164: 221- 231.
- Wang, Y. G., M. D. Hassan, M. Shariff, S. M. Zamri, y X. Chen. 1999. Histopathology y cytopathology of white spot syndrome virus (WSSV) in cultured *Penaeus monodon* from peninsular Malaysia with emphasis on pathogenesis and the mechanism of white spot formation. *Diseases of Aquatic Organisms* 39: 1-11.
- Withyachumnarnkul, B., V. Boonsaeng, R. Chomsoong, T. W. Flegel, S. Muangsin, y G. L. Nash. 2003. Seasonal variation in white spot síndrome virus-positive samples in broodstock and post-larvae of *Penaeus monodon* in Thailand. *Diseases of Aquatic Organisms* 53: 167- 171.
- Wongteerasupaya, C., J. E. Vickers, S. Sriurairatana, G. L. Nash, A. Akarajamorn, V. Boonsaeng, S. Paniym, A. Tassanakajon, B. Withyachumnarnkul, y T.W. Flegel. 1995. A non-occluded, systemic baculovirus that occurs in cells of ectodermal y mesodermal origin and causes high mortality in the black tiger prawn *Penaeus monodon*. *Diseases of Aquatic Organisms* 21: 69-77.
- Wu, J. L., A. Namikoshi, T. Nishizawa, K. Mushiake, K. Teruya, y K. Muroga. 2001. Effects of shrimp density on transmtion of penaeid acute viremia in *Marsupenaeus japonicus* by cannibalism and the waterborne route. *Diseases of Aquatic Organisms* 47: 129-135.
- Wu, J. L., T. Nishioka, K. Mori, T. Nishizawa, y K. Muroga. 2002. A time-course study on the resistance of *Marsupenaeus japonicus* induced by artificial infection with white spot syndrome virus. *Fish and Shellfish Immunology* 13: 391-403.

- Wu , J. L., y K. Muroga. 2004. Apotptosis does not play an important role in the resistance of 'immune' *Marsupenaeus japonicus* against white spot síndrome virus. Journal of Fish Deseases 27: 15–21.
- Yoganandhan, K., R. B. Narayanan, y A. S Sahul Hameed. 2003. Larvae and early post.larvae of *Penaeus monodon* (Fabricius) experimentally infected with white spot syndrome virus (WSSV) show no significant mortality. Journal of Fish Diseases 26: 385-391.
- Zar, J. H. 1999. Biostatistical Analysis. Fourth Edition. Department of Biological Sciencie. Prentice hall. New Jersey 220-225p.

9. ANEXOS

ANEXO I. Ejemplo de elaboración de índices histológicos y de respuesta inmunitaria. Elaborado por Maldonado (2003).

- Índice de WSSV

A ciertos órganos de cada uno de los cinco camarones muestreados se les asignó un peso en base a la importancia del tejido en el proceso de infección viral.

Descripción del peso de los tejidos en el índice de infección por WSSV

Tejidos	Peso
Glándula Antenal y Epitelio Cuticular	1
Estómago y Tejido Conectivo	2
Organo Linfoide, Tejido Hematopoyético y Corazón	3

Ejemplo para elaborar el índice histológico para WSSV

Tejido	Grado	Normalización	Peso	Norm * Peso	Total
Glándula antenal	4	$4/4=1$	1	1×1	1
Tejido conectivo	4	$4/4=1$	2	1×2	2
Organo linfoide	4	$4/4=1$	3	1×3	3
Suma					6

- Índice patológico para Piknosis-Karriorexis y el Índice inmunitario infiltración

Se elabora sin dar un peso a los tejidos. Por ejemplo un grado 4 (escala de 0 a 4) encontrado en cualquier tejido sería dividido para 4, de esta manera la escala va de 0 a 1.

ANEXO II. Pruebas de normalidad (Kolmogorov-Smirnov) y homogeneidad de varianzas (Levene) para los índices histológicos. Estadísticos de Kruskal Wallis y ANOVA
Resultados de la presente investigación. Elaborado por Sara Blake Grey.

IIa. Índice WSSV:

Levene's Test for Homogeneity of Variances [IWSSV]				
STATISTICA GENERAL MANOVA	Levene's Test for Homogeneity of Variances (ANOVA on absolute within-cell deviation scores) Degrees of freedom for all F's: 3,16			
variable	MS Effect	MS Error	F	p-level
IWSSV	.1249152	.0373684	3.342804	.0457449

KRUSKAL WALLIS ANOVA BY RANKS [IWSSV]				
STATISTICA NONPARAM STATS	KRUSKAL WALLIS ANOVA BY RANKS Dependent: IWSSV Independent: TIEMPO Kruskal-Wallis test: $H(3, N=20) = 15.20597$ $p = .0017$			
	Code	Valid N	Sum of Ranks	
L	1	5	56.00000	
M	2	5	90.00000	
C7	3	5	44.00000	
C14	4	5	20.00000	

IIb. Índice Necrosis:

Levene's Test for Homogeneity of Variances [necrosis]				
STATISTICA GENERAL MANOVA	Levene's Test for Homogeneity of Variances (ANOVA on absolute within-cell deviation scores) Degrees of freedom for all F's: 3,16			
variable	MS Effect	MS Error	F	p-level
NECROSIS	.0059733	.0022500	2.654816	.0837887

summary of all effects; design: [necrosis]						
STATISTICA GENERAL MANOVA	summary of all effects; design: 1-TIEMPO					
Effect	df Effect	MS Effect	df Error	MS Error	F	p-level
1	3	.0285000	16	.0062500	4.560000	.0171631

Tukey HSD test; variable NECROSIS [necrosis]					
STATISTICA GENERAL MANOVA		Tukey HSD test; variable NECROSIS Probabilities for Post-hoc Tests MAIN EFFECT: TIEMPO			
TIEMPO		{1}	{2}	{3}	{4}
		.1000000	.2200000	.1000000	.0400000
L	{1}		.1173273	1.000000	.6356770
M	{2}	.117327		.117327	.0116529
C7	{3}	1.000000	.1173273		.6356770
C14	{4}	.635677	.0116529	.635677	

IIc. Índice de infiltración:

Levene's Test for Homogeneity of Variances [linfiltra]				
STATISTICA GENERAL MANOVA	Levene's Test for Homogeneity of Variances (ANOVA on absolute within-cell deviation scores) Degrees of freedom for all F's: 3,16			
variable	MS Effect	MS Error	F	p-level
IINFILTR	.0165152	.0010692	15.44634	.0000552

KRUSKAL WALLIS ANOVA BY RANKS [linfiltra]			
STATISTICA NONPARAM STATS		KRUSKAL WALLIS ANOVA BY RANKS Dependent: IINFILTR Independent: TIEMPO Kruskal-Wallis test: $H(3, N=20) = 8.760101$ $p = .0327$	
	Code	Valid N	Sum of Ranks
L	1	5	57.00000
M	2	5	25.00000
T7	3	5	76.00000
T14	4	5	52.00000

ANEXO III. Tablas de contingencias para la relación entre los signos externos y la variable índice de WSSV. Resultados de la presente investigación. Elaborado por Sara Blake Grey

Rows are levels of Columns are levels of No Selector	WSSV ROSADO		
	0	1	total
1	14 70	0 0	14 70
2	1 5	0 0	1 5
4	0 0	5 25	5 25
total	15 75	5 25	20 100
table contents: Count Percent of Table Total			
Chi-square = 20.00 with 2 df p ≤ 0.0001			
Fisher's Exact statistic applies only to 2 by 2 tables			

Rows are levels of Columns are levels of No Selector	WSSV M. BLANCA		
	1	total	
1	14 70	14 70	
2	1 5	1 5	
4	5 25	5 25	
total	20 100	20 100	
table contents: Count Percent of Column Total			
Chi-square = 0.0000 with 0 df p = •			
Fisher's Exact statistic applies only to 2 by 2 tables			

Rows are levels of Columns are levels of No Selector	WSSV LECHOSO		
	0	1	total
1	5 25	9 45	14 70
2	0 0	1 5	1 5
4	3 15.0	2 10	5 25
total	8 40	12 60.0	20 100
table contents: Count Percent of Table Total			
Chi-square = 1.607 with 2 df p = 0.4477			
Fisher's Exact statistic applies only to 2 by 2 tables			

Rows are levels of Columns are levels of No Selector	WSSV segmentado		
	0	1	total
1	7 35	7 35	14 70
2	1 5	0 0	1 5
4	5 25	0 0	5 25
total	13 65	7 35	20 100
table contents: Count Percent of Table Total			
Chi-square = 4.615 with 2 df p = 0.0995			
Fisher's Exact statistic applies only to 2 by 2 tables			

Rows are levels of WSSV Columns are levels of L. MELANIZ No Selector				Rows are levels of WSSV Columns are levels of color No Selector			
	0	1	total		0	1	total
1	12	2	14	1	8	6	14
	60.0	10	70		40	30.0	70
2	1	0	1	2	1	0	1
	5	0	5		5	0	5
4	3	2	5	4	5	0	5
	15.0	10	25		25	0	25
total	16	4	20	total	14	6	20
	80	20	100		70	30.0	100
table contents: Count Percent of Table Total Chi-square = 1.786 with 2 df p = 0.4095 Fisher's Exact statistic applies only to 2 by 2 tables				table contents: Count Percent of Table Total Chi-square = 3.673 with 2 df p = 0.1593 Fisher's Exact statistic applies only to 2 by 2 tables			

ANEXO IV. Tablas de contingencias para la relación entre los signos externos y las variables índices de necrosis e infiltración. Resultados de la presente investigación. Elaborado por Sara Blake Grey.

IVa. necrosis

Rows are levels of Columns are levels of No Selector <table><tr><td></td><td>0</td><td>1</td><td>total</td></tr><tr><td>1</td><td>5 25</td><td>10 50</td><td>15 75</td></tr><tr><td>2</td><td>2 10</td><td>0 0</td><td>2 10</td></tr><tr><td>3</td><td>2 10</td><td>1 5</td><td>3 15.0</td></tr><tr><td>total</td><td>9 45</td><td>11 55.0</td><td>20 100</td></tr></table> table contents: Count Percent of Table Total Chi-square = 3.838 with 2 df p = 0.1467 Fisher's Exact statistic applies only to 2 by 2 tables		0	1	total	1	5 25	10 50	15 75	2	2 10	0 0	2 10	3	2 10	1 5	3 15.0	total	9 45	11 55.0	20 100	Rows are levels of Columns are levels of No Selector <table><tr><td></td><td>1</td><td>total</td></tr><tr><td>1</td><td>15 75</td><td>15 75</td></tr><tr><td>2</td><td>2 10</td><td>2 10</td></tr><tr><td>3</td><td>3 15.0</td><td>3 15.0</td></tr><tr><td>total</td><td>20 100</td><td>20 100</td></tr></table> table contents: Count Percent of Table Total Chi-square = 0.0000 with 0 df p = • Fisher's Exact statistic applies only to 2 by 2 table		1	total	1	15 75	15 75	2	2 10	2 10	3	3 15.0	3 15.0	total	20 100	20 100					
	0	1	total																																						
1	5 25	10 50	15 75																																						
2	2 10	0 0	2 10																																						
3	2 10	1 5	3 15.0																																						
total	9 45	11 55.0	20 100																																						
	1	total																																							
1	15 75	15 75																																							
2	2 10	2 10																																							
3	3 15.0	3 15.0																																							
total	20 100	20 100																																							
Rows are levels of Columns are levels of No Selector <table><tr><td></td><td>0</td><td>1</td><td>total</td></tr><tr><td>1</td><td>14 70</td><td>1 5</td><td>15 75</td></tr><tr><td>2</td><td>0 0</td><td>2 10</td><td>2 10</td></tr><tr><td>3</td><td>1 5</td><td>2 10</td><td>3 15.0</td></tr><tr><td>total</td><td>15 75</td><td>5 25</td><td>20 100</td></tr></table> table contents: Count Percent of Table Total Chi-square = 11.47 with 2 df p = 0.0032 Fisher's Exact statistic applies only to 2 by 2 tables		0	1	total	1	14 70	1 5	15 75	2	0 0	2 10	2 10	3	1 5	2 10	3 15.0	total	15 75	5 25	20 100	Rows are levels of Columns are levels of No Selector <table><tr><td></td><td>0</td><td>1</td><td>total</td></tr><tr><td>1</td><td>13 65</td><td>2 10</td><td>15 75</td></tr><tr><td>2</td><td>2 10</td><td>0 0</td><td>2 10</td></tr><tr><td>3</td><td>3 15.0</td><td>0 0</td><td>3 15.0</td></tr><tr><td>total</td><td>18 90</td><td>2 10</td><td>20 100</td></tr></table> table contents: Count Percent of Table Total Chi-square = 0.7407 with 2 df p = 0.6905 Fisher's Exact statistic applies only to 2 by 2 tables		0	1	total	1	13 65	2 10	15 75	2	2 10	0 0	2 10	3	3 15.0	0 0	3 15.0	total	18 90	2 10	20 100
	0	1	total																																						
1	14 70	1 5	15 75																																						
2	0 0	2 10	2 10																																						
3	1 5	2 10	3 15.0																																						
total	15 75	5 25	20 100																																						
	0	1	total																																						
1	13 65	2 10	15 75																																						
2	2 10	0 0	2 10																																						
3	3 15.0	0 0	3 15.0																																						
total	18 90	2 10	20 100																																						

Rows are levels of		necrosis	
Columns are levels of		cola r	
No Selector			
	0	1	total
1	10	5	15
	50	25	75
2	2	0	2
	10	0	10
3	2	1	3
	10	5	15.0
total	14	6	20
	70	30.0	100

table contents:
Count
Percent of Table Total

Chi-square = 0.9524 with 2 df
p = 0.6211

Fisher's Exact statistic applies only to 2 by 2 tables

IVb.

Rows are levels of		I INFLT.	
Columns are levels of		ROSADO	
No Selector			
	0	1	total
1	12 60.0	5 25	17 85.0
2	3 15.0	0 0	3 15.0
total	15 75	5 25	20 100

table contents:
Count
Percent of Table Total

Chi-square = 1.176 with 1 df
p = 0.2781

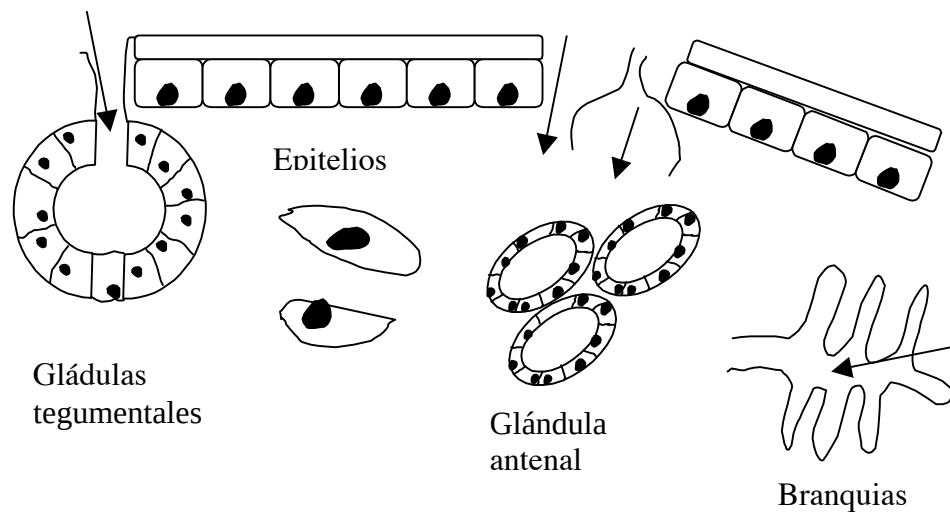
Fisher Exact Test:
= 0.5395

ANEXO V. Tejidos positivos con los anticuerpos de WSSV, hemocitos hialinos pequeños (40E10) y hemocitos hialinos grandes (41B12). Elaborado por Sara Blake Grey.

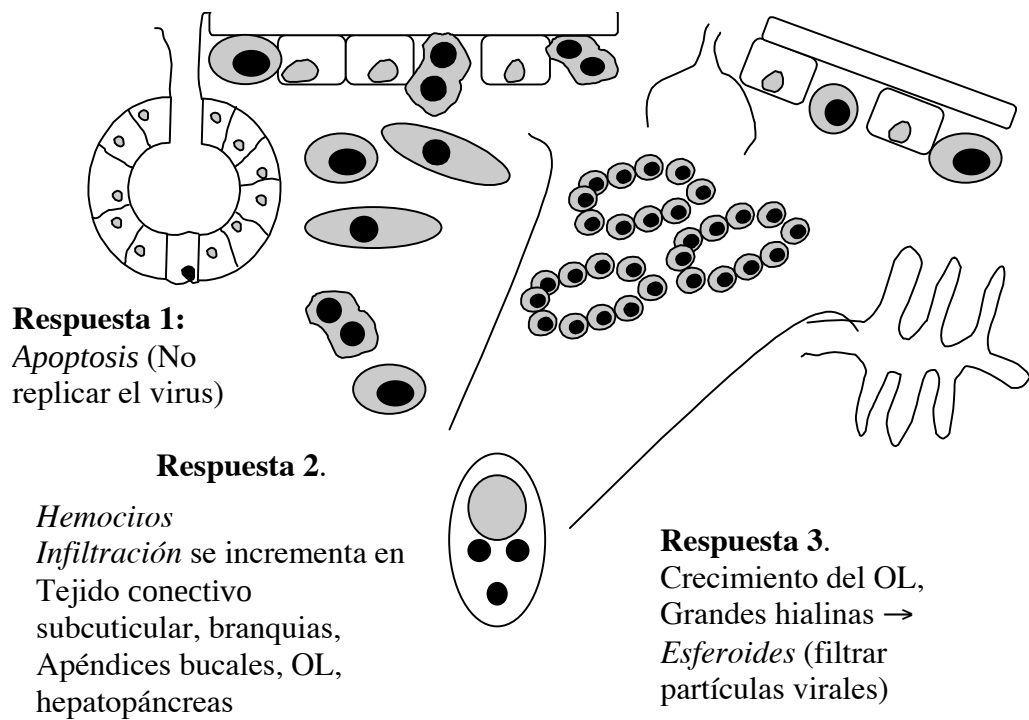
Tejidos positivos con los anticuerpos de WSSV, hemocitos hialinos pequeños (40E10) y hemocitos hialinos grandes (41B12)			
Muestra	WSSV	HALINOS PEQUEÑOS	HALINOS GRANDES
No infectados	No se analizó	Organo linfóide	Hemocitos Espacios hemales Túbulos normales del OL Esferoides del OL Epitelio de estómago T. conectivo estómago
Infectados leves 24 h	Ceca posterior	Apéndices bucales	No se analizó
	T. conectivo de estómago	Anténula	
Crónicos 14 d	Apéndices bucales	Celosoma de g. antenal	Corazón T. conectivo de estómago Epitelio de estómago Esferoides del OL Glándulas tegumentales Espacios Hemales
	Glándulas tegumentales orales	Branquias	
	Corazón	T. hematopoyético	
	Ceca anterior	Mandíbula	
	Cámara de estómago		
	Espacios hemales de hepatop.		
Crónicos 14 d	No se analizó	Corazón	Corazón T. conectivo de estómago Epitelio de estómago Esferoides del OL Glándulas tegumentales Espacios Hemales
		T. conectivo de estómago Túbulos del OL Espacios hemales	

ANEXO VI. Modelo de respuesta celular en los animales con infección leve y aguda.
Resultados de la presente investigación. Elaborado por Sara Blake Grey

Tejidos por los que ingresaría el virus



Respuesta celular en los animales de infección leve



Respuesta celular en los animales con infección aguda

