



**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR
SEDE REGIONAL MANABÍ
CAMPUS BAHÍA DE CARÁQUEZ**

CARRERA DE BIOLOGIA MARINA

TESIS DE GRADO

**PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE:
BIÓLOGO MARINO**

**“Determinación del comportamiento hemocitario en los tejidos
de *Litopenaeus vannamei*, inmunoestimulados desde la fase
larvaria,
y posteriormente desafiados con WSSV.”**

**PRESENTADA POR:
MARIA GABRIELA CARDENAS MENDOZA**

**DIRECTOR:
JENNY ANTONIA RODRIGUEZ LEON, Ph.D.**

BAHÍA DE CARÁQUEZ – MANABÍ - ECUADOR

2004

DECLARACIÓN EXPRESA

“La responsabilidad por los hechos, ideas y doctrinas expuestas en esta tesis, me corresponden exclusivamente; y, el patrimonio intelectual de la misma, a la **PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATOLICA DEL ECUADOR**”

María Gabriela Cárdenas Mendoza

*Al ser omnipotente que me
dio la oportunidad de vivir
“Dios”.*

*A mis Padres seres maravillosos
que me brindaron amor,
apoyo y valores.*

AGRADECIMIENTO

A **“DIOS”** *centro y motor de mi vida.*

A **mis Padres**, *fueron uds. los que con esfuerzo y dedicación me sacaron adelante, gracias por todo ese apoyo que me brindaron, y gracias también por ese amor que me profesan día a día.*

A **mis hermanos** *Jaime y Jazmín con quienes he compartido todas mis alegrías y tristezas, y con los que he crecido en cuerpo y alma.*

A mi **abuela Josefa**, *ser que con esfuerzo y cariño me dio lo mejor de sí. Dedicaste todo el tiempo del mundo para cuidarme, me protegiste incansablemente, no te importó que los años pasaran y que todo ese esfuerzo te hiciera envejecer apresuradamente. Gracias abuela por brindarme siempre lo mejor de ti, todo esto te ha sido retribuido, te llevaré por siempre grabada en mi piel.*

A mi **Tía Fanny**, *mi apoyo incondicional, mi amiga y guía, gracias por todos sus consejos, ahora sé, todo lo valioso que fueron y sé también que todo lo que decías era por mí bien.*

A *toda mi familia, por el amor y los cuidados que me brindaron desde la niñez.*

A mi tía **Mariana** *que aunque la distancia nos separe siempre esta en mi corazón.*

A **Carlos Pico**, *ser maravilloso que Dios puso en mi camino y lo convirtió en ese ángel que iluminó mi vida en todo momento, ¡gracias por toda tu entrega!*

A **Daniel Chalén**, *¡mi amigo incondicional!, gracias por todo el apoyo que me brindaste, no sabes la satisfacción enorme que me dio saber que en todo momento estabas a mi lado.*

Al Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas “Edgar Arellano” y a su director Dr. Jorge Calderón por permitirme desarrollar esta tesis.

Al programa IFS por permitirme desarrollar el presente trabajo y por brindarme soporte financiero.

A mi Directora de Tesis Jenny Rodríguez, porque sin Ud. todo hubiese sido más difícil, gracias por toda esa paciencia y por todo ese apoyo.

A Maria Lourdes Cobo, ¡gracias amiga!, en todo momento tendré presente: el cariño, la ayuda y mas que nada esa amistad sincera que me brindó.

A Miguel Ángel, Julio, Wilo, Yamil, Mariuxi Z., Paola, Roxana, Jorge A., Vanesa, Yordan, sin Uds. mis días en CENAIM no hubieran sido tan alegres.

A Dra. Julie, Dra. Irma, Ma. Elena Q., Mayu, Bertha, Cecilia, Rosa, Yela, María, Mare, Bonny, Fanny, Anita, Nancy, Alexandra, Sandra, Msc. Enrique, Ing. Andrés, Dr. Stanis, Fabrizio, Rubén, Ricardo, Pablito, Jonny, Jaime, Manuelito, Alionte, José Melena, Rafael, M4, M5, M6 y a todos los que forman parte del CENAIM por toda esa ayuda brindada.

Al Prorector de la PUCE- Manabí, Padre Homero Fuentes, por toda esa motivación y todo ese cariño que nos impartió a lo largo de la carrera.

A mi director de carrera, Miguel Ángel Acosta por ayudarme en todo momento.

A todos los que forman parte de la PUCE-Manabí por ayudarme en todo lo que necesite.

A Edith, José Luis, Marcela, Fernanda, Paola, Vero, Clara Luz, Mercedita, fueron parte de mi vida universitaria, gracias por todos esos momentos maravillosos.

A Iván Zambrano A., por todo ese apoyo que me brindó a lo largo de mi carrera, gracias por enseñarme a ser tolerante y por hacerme entender que siempre debo buscar incansablemente lo que quiero para poder ser verdaderamente feliz.

Finalmente quisiera agradecer a todas las personas que de una u otro forma me ayudaron en la realización de esta tesis. ¡Gracias de corazón!

ABREVIATURAS

ADN:	Ácido desoxirribonucleico
AP-PCR:	Arbitrary primed – PCR
BCIP:	5-bromo-4-cloro-3-indolylfosfato en dimethylformamida
CINa:	Cloruro de sodio
Cl₂Mg:	Cloruro de magnesio
E.D.T.A.:	Etilén diamino tetra-acético
HCL:	Ácido clorhídrico
KCl:	Cloruro de potasio
Kg:	Kilogramos
ml:	mililitros
mM:	Milimoles
mg:	Miligramos
NBT:	Nitro Blue Tetrazolium
PCR:	Polymerase chain reaction
PA:	Fosfatasa alcalina
PO:	Fenoloxidasa
P-K:	Picknosis-Kariorexis
proPO:	Sistema profenoloxidasa
TSV:	Taura syndrome virus
TBS:	Tris Base Saline
TWEEN 20:	Polyoxyethylene-sorbitan monolaurate
WSSB:	White spot syndrome baculovirus
WSD:	White spot syndrome diseases
WSSV:	White spot syndrome virus
YHV:	Yellow Head Virus

ÍNDICE GENERAL.

DEDICATORIA.	iii
AGRADECIMIENTO.	iv
ABREVIATURAS.	vii
ÍNDICE DE FIGURAS.	x
ÍNDICE DE TABLAS.	xiv
RESUMEN.	xvi
ABSTRACT.	xvii
1. INTRODUCCIÓN.	1
2. ANTECEDENTES.	5
2.1. DIAGNÓSTICO Y ESTUDIO DE LA ENFERMEDAD.	6
2.1.1. Técnicas Rápidas.	7
2.1.2. Histología.	7
2.1.3. Técnicas moleculares.	8
2.1.3.1. PCR (polymerase chain reaction).	8
2.1.3.2. Hibridación <i>in situ</i> .	9
2.1.4. Técnicas Inmunológicas.	9
2.1.4.1. Anticuerpos.	10
2.1.4.1.1. Anticuerpos Policlonales.	10
2.1.4.1.1. Anticuerpos Monoclonales.	10
2.1.5. Inmunoensayos.	11
2.1.5.1. Colony blot.	11
2.1.5.2. Dot blot.	12
2.1.5.3. Elisa.	12
2.1.5.4. Inmunohistoquímica.	12
2.2. SISTEMA INMUNE.	13
2.2.1. Características Hemocitrias.	14
2.2.1.1. Hemocitos Hialinos.	14
2.2.1.2. Hemocitos Semi- Granulosos.	14
2.2.1.3. Hemocitos Granulosos.	15
2.2.2. Mecanismos de defensa celular.	15
2.2.2.1. Fagocitosis.	15
2.2.2.2. Encapsulación.	16
2.2.2.3. Nodulación.	17
2.2.3. Mecanismos de Defensas asociadas a la liberación de compuestos celulares.	17
2.2.3.1. Sistema pro-fenol oxidasa (proPO).	18
2.2.3.2. Coagulación.	18
2.2.4. Mecanismos Humorales de Defensa.	18

2.3. ENFERMEDAD DE LA MANCHA BLANCA.	19
2.4. INMUNOESTIMULANTES.	20
3. MATERIALES Y MÉTODOS.	23
3.1. MATERIAL BIOLÓGICO.	24
3.2. HISTOPATOLOGÍA.	23
3.2.1. Elaboración de grados de WSSV, Picknosis–Kariorexix (P-K), encapsulación, infiltración.	25
3.2.2. Elaboración de índices histológicos-patológicos y de respuesta inmunitaria.	26
3.2.2.1. Índice histológico de infección con WSSV.	26
3.2.2.2. Índice histológico para Picknosis- Kariorexix.	27
3.2.2.3. Índice histológico inmunitario: infiltración, encapsulación.	27
3.3. INMUNOHISTOQUÍMICA.	27
3.3.1. Protocolo.	27
3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.	30
4. RESULTADOS.	31
4.1. HISTOPATOLOGÍA.	32
4.1.1. Índice histológicos e inmunitarios (0, 24, 72 horas).	32
4.1.2. Comportamiento hemocitario en los tejidos.	37
4.1.3. Índice histológicos e inmunitarios (360 horas) post- infección.	40
4.1.4. Identificación antigénica de las poblaciones de hemocitos infiltrantes.	44
4.1.5. Estudio del rol de las Glándulas Tegumentales como ruta de ingreso del WSSV.	48
5. DISCUSIÓN.	52
6. CONCLUSIONES.	58
7. RECOMENDACIONES.	61
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	63
9. ANEXOS.	72
10. GLOSARIO.	81

ÍNDICE DE FIGURAS.

- Fig. #1.** Técnica de producción de anticuerpos policlonales y monoclonales. Tomada de Internet (www.iqb.es/monografia/fichas/ficha002.htm). 11
- Fig. #2.** Tipos de hemocitos encontrados en *Litopenaeus vannamei*, en microscopio de contraste de fases. (Tomada del Laboratorio de inmunología del CENAIM). 14
- Fig. #3.** Células fagocíticas en el tejido conectivo de un organismo de *Litopenaeus vannamei*. (H&E, 20X). Tomada del Laboratorio de Inmunología del CENAIM. 16
- Fig. #4.** Encapsulación: (a y b) Sección histológica del Órgano linfoide de un organismo de *Litopenaeus vannamei* en que se muestra una encapsulación. (Tomada de Maldonado, 2003). 17
- Fig. #5.** Células formando un nódulo en el epitelio general del cuerpo de un organismo de *Litopenaeus vannamei*. (H&E, 20X). Tomada del Laboratorio de Inmunología del CENAIM. 17
- Fig. #6a.** Características externas de un camarón Peneido afectado por WSSV (Wongteerasupaya *et al.*, 1995). 19
- Fig. #6b.** Fotografía de la cutícula de un camarón severamente afectada por el WSSV. 19
- Fig. #6c.** Sección histológica de células estomacales de un juvenil de *P. chinensis* infectado con WSSV, cuerpo de inclusión intranuclear prominente (Lightner, 1996). 19
- Fig. #7.** Esquema de una placa cargada conteniendo el corte histológico. Elaborado por Gabriela Cárdenas. 28
- Fig. #8.** Esquema del proceso de Desparafinado e Hidratación. Elaborado por Gabriela Cárdenas. 28
- Fig. #9.** Esquema del Proceso de Deshidratación del tejido. Elaborado por Gabriela Cárdenas. 30
- Fig. #10.** Esquema de una placa terminada (placa cargada + objeto y permolt). Elaborado por Gabriela Cárdenas 30
- Fig. #11.** Índice histológico de WSSV de los 8 tratamientos, a las 0, 24 y 72 horas de infección. En cada tratamiento se analizó un máximo de 15 camarones (5 organismos por tiempo). Elaborado por Gabriela Cárdenas. 32
- Fig. #12.** Microfotografía de corte histológico de un organismo de *L. vannamei* (Tratamiento). Se observa presencia de células infectadas

- (Flechas) con WSSV en el epitelio cuticular antes de la infección (H & E, 1000X). Tomada por Gabriela Cárdenas. 33
- Fig. #13.** Índice histológico P-K de los 8 tratamientos. A las 0, 24, 72 horas post-infección. Elaborado por Gabriela Cárdenas. 35
- Fig. #14.** Microfotografía de un corte histológico de *L. vannamei* (Tratamiento 6) desafiado con el virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV). Núcleos picknóticos en el corazón a las 72 horas post-infección (Flechas) (H & E 1000X). 36
- Fig. #15.** Índice inmunitario de infiltración de los 8 tratamientos a diferentes tiempos de infección con WSSV. 37
- Fig. #16.** Microfotografía de corte histológico de un organismo de *L. vannamei* desafiado con el virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV). Nótese la presencia de hemocitos infiltrantes en la región oral. (H & E, 100X). 38
- Fig. #17.** Índice inmunitario de encapsulación de los 8 tratamientos luego de ser infectados experimentalmente. 39
- Fig. #18.** Microfotografías de cortes histológicos de juveniles de *L. vannamei* desafiados con el virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV). (a) Encapsulaciones en el tejido conectivo del estómago a las 72 horas post-infección (Flecha) (H & E, 1000X). (b) Encapsulación en la región oral a las 24 horas post-infección. Nótese como los hemocitos rodean a la célula infectada (Flecha) (H & E, 1000X). Tomada por Gabriela Cárdenas. 39
- Fig. #19.** Índice histológico de WSSV de los 8 tratamientos, a los 360 horas post- infección. Elaborado por Gabriela Cárdenas. 40
- Fig. #20.** Índice histológico de P-K de camarones *L. vannamei* de los 8 tratamientos, a las 360 horas post- infección con WSSV. 41
- Fig. #21.** Índice inmunitario de infiltración de camarones *L. vannamei* de 8 diferentes tratamientos luego de ser infectadas experimentalmente con WSSV. 42
- Fig. #22.** Índice inmunitario de encapsulación de camarones *L. vannamei* de los 8 tratamientos a las 360 horas post infección con WSSV. 43
- Fig. #23.** Microfotografía del órgano linfoide de un organismo de *L. vannamei*. Reacción antigénica con el anticuerpo 40E10 que marcó hemocitos hialinos pequeños (Flechas) en el estroma. Nótese que las células endoteliales no están marcadas. (a) 40X, (b) 100X. Tomada por Gabriela Cárdenas. 45

- Fig. #24.** Microfotografía de órganos y tejidos del camarón *L. vannamei* marcados mediante inmunohistoquímica con el anticuerpo 40E10 en el que se nota la presencia de los hemocitos hialinos pequeños (Flechas): **(a)** branquias (espacios hemales), **(b)** glándulas tegumentales del labio, **(c)** tejido hematopoyético, **(d)** Cordón Nervioso, **(e)** glándula antenal (podocitos), y **(f)** región oral (paragnata). Tomada por Gabriela Cárdenas. 46
- Fig. #25.** Microfotografía de la inmunistoquímica con el anticuerpo 40E2. **(a)** epitelio general del cuerpo en que se muestran glándulas tegumentales marcadas (Flecha). **(b)** hemocitos granuloso del órgano linfoide marcados (Flecha). Tomada por Gabriela Cárdenas. 47
- Fig. #26.** Microfotografías de la región oral en la que se detectó señal con los anticuerpos de hemocitos. **(a)** anticuerpo 40E10 (que reconoce hialinos pequeños), **(b)** 40E2 (que reconoce hemocitos granuloso), **(c)** 41B12 (que reconoce hialinos grandes). 47
- Fig. #27.** Microfotografías de la inmunohistoquímica con el anticuerpo anti WSSV en la zona oral de *L. vannamei* en que se muestran la presencia de las glándulas tegumentales marcadas (Flechas). **(a)**. Labio de un camarón *L. vannamei* correspondiente al tratamiento 3. (100X). **(b)**. Labio de un camarón *L. vannamei* correspondiente al tratamiento 4 (200X). Nótese que en ninguno de los tratamientos el tejido conectivo que rodea las glándulas presenta señal de infección. Tomada por Gabriela Cárdenas. 49
- Fig. #28.** Microfotografías de la inmunohistoquímica con el anticuerpo anti WSSV en tejidos de *L. vannamei* correspondiente al tratamiento 8 en las que se observa la presencia de glándulas tegumentales marcadas (Flechas). Nótese las células marcadas en el tejido conectivo que rodea a estas glándulas (Flecha Blanca). (100X). Tomada por Gabriela Cárdenas. 49
- Fig. #29.** Microfotografías de la inmunohistoquímica con el anticuerpo anti WSSV en tejidos de *L. vannamei* en que se muestran células infectadas con WSSV. **(a)**. tejido conectivo del estómago del tratamiento 8 a las 24 horas post infección, se observa la presencia de células infectadas (Flechas) (100X). **(b)**. epitelio del estómago del tratamiento 6 a las 72 horas post infección en el que nota la presencia de células con WSSV (Flechas) (100X). Tomada por Gabriela Cárdenas. 50
- Fig. #30.** Microfotografías de la inmunohistoquímica con el anticuerpo anti WSSV en glándulas tegumentales de *L. vannamei* en las que se observa la señal de infección. **(a)**. glándula Tegumental marcada con anticuerpo anti WSSV, se observa a la glándula hueca y oscura, característica de un morfología anormal (Flecha) (1000X). **(b)**.

Sección del labio en el que se observa necrosis en las glándulas tegumentales (Flecha) (200X). Tomada por Gabriela Cárdenas. 51

Fig. #31. Microfotografías de la histología de un organismo de *L. vannamei* en las que se observa desorganización en los tejidos ocasionado por el WSD (Flechas). (a) epitelio general del cuerpo (1000X) y (b) paragnata (100X). Tomada por Gabriela Cárdenas. 51

ÍNDICE DE TABLAS.

<u>Tabla #1.</u> Tratamientos de inmunoestimulación aplicados desde la larvicultura.	24
<u>Tabla #2.</u> Peso asignado a los tejidos para la elaboración del índice de infección por WSSV.	26
<u>Tabla #3.</u> Ejemplo del método utilizado para elaborar el índice histológico para WSSV (máximo nivel de infección en todos los tejidos).	26
<u>Tabla #4.</u> Anticuerpos utilizados en la técnica de inmunohistoquímica. Elaborado por Gabriela Cárdenas.	29
<u>Tabla #5.</u> Porcentaje de tejidos y animales que contenían células infectadas por WSSV a las 0 horas. Elaborado por Gabriela Cárdenas.	33
<u>Tabla #6.</u> Porcentaje de tejidos y animales que contenían células infectadas por WSSV a las 24 horas post-infección. Elaborado por Gabriela Cárdenas.	34
<u>Tabla #7.</u> Porcentaje de tejidos y animales que contenían células infectadas por WSSV a las 72 horas post infección. Elaborado por Gabriela Cárdenas.	34
<u>Tabla #8.</u> Porcentaje de tejidos y animales que contenían células P-K a las 0, 24 y 72 horas post infección. Elaborado por Gabriela Cárdenas.	36
<u>Tabla #9.</u> Porcentaje de tejidos y animales que contenían hemocitos infiltrados a las 0, 24 y 72 horas post infección. Elaborado por Gabriela Cárdenas.	38
<u>Tabla #10.</u> Porcentaje de tejidos y animales que contenían encapsulaciones a las 0, 24 y 72 horas post infección. Elaborado por Gabriela Cárdenas.	40
<u>Tabla #11.</u> Porcentaje de tejidos y animales que contenían células infectadas a las 360 horas post infección. Elaborado por Gabriela Cárdenas.	41
<u>Tabla #12.</u> Porcentaje de tejidos y animales que contenían células con P-K a las 360 horas post infección. Elaborado por Gabriela Cárdenas.	42
<u>Tabla #13.</u> Porcentaje de tejidos y animales que contenían células infiltradas a las 360 horas post infección. Elaborado por Gabriela Cárdenas.	43
<u>Tabla #14.</u> Porcentaje de tejidos y animales que contenían encapsulaciones a las 360 horas post infección. Elaborado por Gabriela Cárdenas.	44
<u>Tabla #15.</u> Ubicación de los diferentes tipos de hemocitos en los órganos y tejidos de <i>L. vannamei</i> , detectados con tres diferentes anticuerpos.	

Elaborado por Gabriela Cárdenas. 44

Tabla #16. Presencia o ausencia de tejidos y glándulas infectadas con WSSV en *L. vannamei*, a las 0, 24, 72 horas post infección, en 8 diferentes tratamientos. Elaborado por Gabriela Cárdenas. 48

RESUMEN

El virus causante de la mancha blanca WSSV es letal. Sin embargo se ha tratado de encontrar alternativas que ayuden a mitigar el impacto que provocó el WSSV y entre esta búsqueda se ha detectado diferencias significativas con respecto a la supervivencia a nivel de los organismos que reciben algún tipo de inmunoestimulación.

En el presente trabajo se evaluó, mediante inmunohistoquímica y utilización de anticuerpos, el comportamiento en los tejidos de *Litopenaeus vannamei*, que fueron sometidos a 8 diferentes tratamientos de inmunoestimulación desde la fase larvaria y posteriormente fueron desafiados con WSSV en estadio juvenil. Se analizó además si existía una respuesta inmune diferente entre los diferentes tratamientos utilizados.

De un total de 8 tratamientos evaluados, 2 fueron los que presentaron mayor resistencia al desafío con WSSV. Se encontró además que los tratamientos que recibieron doble estimulación no presentaron infección con WSSV desde el inicio del proyecto, mientras que los organismos que solo recibieron un solo inmunoestimulante presentaron el mayor índice de infección. El análisis estadístico mostró diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$). Se observó además la presencia de los diferentes tipos de hemocitos y en que órganos y tejidos se encontraban.

ABSTRACT

The White Spot Syndrome Virus (WSSV) is lethal to some crustaceans among them shrimps. However, researchers have been trying to find some alternatives in order to minimize the high impact of WSSV. Significant differences in survivors have been detected in organisms with some kind of immunostimulation.

In this work the response of *Litopenaeus vannamei* was evaluated under 8 different immunostimulated treatments, starting at larvae stage and finalizing with a WSSV challenge test at juvenile stage. The different immune response between treatments was analyzed in the cases that it existed.

Of the 8 treatments evaluated, only 2 showed the highest resistance to WSSV challenge test. It was also found that treatments with double stimulation didn't present WSSV infection signs since during the whole study. In contrast, organisms with a single stimulation showed a high WSSV infection level. The statistical analysis showed significant differences ($p < 0.05$) between all treatments. The presence of different kinds of hemocytes in its location in the different *L. vannamei* organs and tissues was detected, which demonstrates the activation of defense mechanism during WSSV infections.

