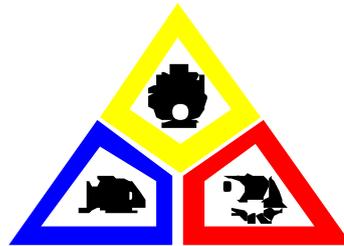




**Universidad Nacional
de Trujillo**



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA ACADÉMICA PROFESIONAL DE PESQUERÍA



CENAIM-ESPOL

CENTRO NACIONAL DE ACUICULTURA E
INVESTIGACIONES MARINAS "EDGAR ARELLANO"
FUNDACION CENAIM-ESPOL

"ESTUDIO DE LA RESISTENCIA CONTRA EL VIRUS DE LA
MANCHA BLANCA (WSSV) EN *Penaeus vannamei*
INMUNOESTIMULADO Y SU POSIBLE RELACION CON
INMUNIDAD ADAPTATIVA"

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE BIÓLOGO PESQUERO

FITIS CORNEJO OLAYA
BACHILLER EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

DIRECTOR : Ph.D. JENNY ANTONIA RODRIGUEZ LEON (ECUADOR)

CO-DIRECTOR: M.Sc. LUIS SHIMOKAWUA SHIGUIYAMA (PERU)

PERU-ECUADOR
2001

INDICE

Dedicatoria	I
Agradecimiento	II
Del asesor	III
Presentación	IV
Jurado dictaminador	V
Resumen	1
I. Introducción	2
1. Antecedentes	4
1.1. Síndrome de la Mancha Blanca	4
1.1.1. Taxonomía	5
1.1.2. Signos Clínicos	5
1.1.3. Métodos para la detección del WSSV	5
1.1.4. Vías de Infección	6
1.1.5. Pruebas de desafío	6
1.2. Inmunomodulación	7
1.2.1. Vitaminas	7
1.2.2. Inmunostimulantes	8
<i>Los s-Glucanos</i>	9
1.3. El Sistema Inmune	11
1.4. El Sistema Inmune del Camarón	12
1.4.1. Hemolinfa	12
1.4.1.1. Hemocitos o Células Circulantes	12
1.4.1.1.1. Tipos Hemocitarios	12
1.4.1.1.1.1. Hemocitos Hialinos (H)	13
1.4.1.1.1.2. Hemocitos Semigranulosos (HSG)	13
<i>Efectores Celulares</i>	14
<i>Efectores Químicos</i>	14
1.4.1.1.1.3. Hemocitos Granulosos (HG)	14
14	
1.5. Mecanismos de defensa a la medición celular	15
1.5.1. Fagocitosis	15
1.5.2. Nodulación	16
1.5.3. Encapsulación	17
1.6. Sistemas Multimericos	17

1.6.1. Sistema Profenoloxidasa (Propo)	
17	
1.6.2. Coagulación	18
1.7. Factores Humorales	19
1.7.1. Proteínas de Reconocimiento	19
1.7.1.1. Las Aglutininas o Lectinas	19
1.7.1.2. Lipopolisacárido-Binding Protein (Lps-Bp)	19
1.7.1.3. β -1,3-Glucanos Binding Protein (β Gbp)	20
1.8. El ciclo de muda en los crustáceos	21
2. Materiales y Métodos	25
2.1. Material Biológico	25
2.1.1. Camarones	25
2.2. Larvicultura	25
2.3. Técnicas de Inmunoevaluación	25
2.3.1. Tratamiento de las muestra para los diferentes ensayos	25
2.3.1.1. Hemogramas	26
2.3.2.2. Detección de la Actividad Fenolóxidasa (Po)	26
2.3.2.3. Cuantificación del Anión Superoxido	26
2.3.2.4. Cuantificación de Proteínas Totales	26
2.3.2.5. Cuantificación de la Actividad Antibacteriana	
26	
2.4. Métodos para diagnostico de WSSV	26
2.4.1. Reacción de Polimerización en Cadena (PCR)	27
2.4.2. Histopatología	27
2.4.3. Microbiología	27
2.5. Preparación de la dieta	27
2.6. Preparación del inoculo de WSSV	27
2.7. Análisis de los datos	27
2.7.1. Fórmulas para el análisis de supervivencia	27
2.7.2. Análisis estadístico de la prueba desafío	
27	
2.8. Primer bioensayo	28
2.8.1. <i>Diseño experimental</i>	28
2.8.2. Ensayo de desafío	29
2.8.3. <i>Muestreo</i>	29
2.9. Segundo bioensayo	29

2.9.1. <i>Diseño experimental</i>	29
2.9.2. Análisis de los estadios de muda	30
2.9.3. <i>Muestreo</i>	30
2.10. Tercer bioensayo	30
2.10.1. <i>Diseño experimental</i>	30
2.10.2. <i>Muestreo</i>	30
2.10.3. Análisis Inmunitarios	31
2.10.3.1. Preparación de alimento	32
3. Resultados	32
3.1. Efecto de protección de β -glucanos contra el wssv a largo plazo	32
3.2. Inmunoestimulación con β -glucanos siguiendo el ciclo de muda	33
3.2.1. Resultados de pruebas inmunitarias sin considerar la muda	40
3.2.2. Pruebas inmunitarias en animales muestreados en intermuda y en temprana premuda	41
3.2.3. Respuesta inmunitaria a largo plazo en animales inmunoestimulados	45
4. Discusiones	48
5. Conclusiones	52
6. Recomendaciones	53
7. Referencias bibliográficas	54
8. Anexos	62

DEDICATORIA

A la Ph.D. Jenny Antonia Rodríguez León y a la Fundación CENAIM-ESPOL le dedico este trabajo y le doy gracias por brindarme su enseñanza, destreza y su esfuerzo dentro de la investigación, para poderme desenvolver en la vida en una época crítica.

AGRADECIMIENTO

El presente trabajo de investigación fue realizado con la ayuda financiera-técnica y científica de la fundación CENAIM-ESPOL. Dejo constancia de mi agradecimiento al **Dr. Jorge Calderón**, Director de la fundación, por permitirme realizar este importante estudio dentro de la investigación de la acuicultura continental.

De manera especial mi reconocimiento y agradecimiento a la **Dra. Jenny Antonia Rodríguez León**, mis amigos de Ecuador, Fabricio, Mariuxi, Rosa, Claudia, Fanny, Betty, Mercedes, Cristian y a mis amigos de Perú, Milthon, Sara, a la Familia Medina, Bertha Rosa, Nilda y a todos mis amigos tesistas, maestría y al personal de CENAIM-ESPOL.

A mis profesores de Perú, a mi co-director de tesis M.Sc. Luis Shimokawa Shiguiyama, M.Sc. Moisés Días Barbosa y M.Sc. Carlos Bocanegra García así mismo a mis familiares en especial a mi Madre **Juana Olaya Castillo** y en el profundo recuerdo a mí Padre **Rogelio Cornejo Peña** que de manera espiritual me brindaron el inmenso apoyo para lograr con éxito mi educación.

A TODOS USTEDES AMIGOS GRACIAS DE TODO CORAZON.

DEL ASESOR

El que suscribe, asesor de la presente Tesis.

CERTIFICA

Que ésta ha sido desarrollada de conformidad con su respectivo proyecto y con las orientaciones necesarias brindadas al tesista.

En cuanto al informe, éste ha sido revisado acogiendo las observaciones y sugerencias alcanzadas, por lo que autorizo al **Br. Fitis Cornejo Olaya** continuar con los tramites correspondientes.

Ph.D. Jenny Antonia Rodríguez León
Asesora

P R E S E N T A C I O N

Señores miembros de jurado:

En cumplimiento con las disposiciones reglamentarias vigentes del Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas “Edgar Arellano” Fundación CENAIM-ESPOL, pongo a disposición la presente Tesis titulada **“ESTUDIO DE LA RESISTENCIA CONTRA EL VIRUS DE LA MANCHA BLANCA (WSSV) EN *Penaeus vannamei* INMUNOESTIMULADO Y SU POSIBLE RELACIÓN CON INMUNIDAD ADAPTATIVA”**, con el cual cumplo con uno de los requisitos para obtener el título de Biólogo Pesquero y esperando de que se de vuestra aprobación.

Guayaquil, noviembre del 2001

Br. Fitis Cornejo Olaya

JURADO DICTAMINADOR

RESUMEN

El primer objetivo de esta tesis fue comprobar si en el camarón, los inmunoestimulantes tienen un efecto protector a largo plazo, para lo cual se inmunoestimuló a postlarvas realizándose un desafío con WSSV en juveniles. La supervivencia de los animales inmunoestimulados fue del 34 % contra el 11 % del control (sin diferencias significativas). Los animales que recibieron una segunda dosis de inmunoestimulante durante la corrida tuvieron una supervivencia del 48 %, siendo esta significativamente mayor al control, pero sin ser diferente a la de los estimulados una sola vez en postlarva. Estos resultados no prueban la existencia de inmunidad adaptativa en el camarón, siendo probable que la estimulación en estadíos muy tempranos estimule una acelerada maduración de la respuesta inmune. Sin embargo indicarían un efecto protector del inmunoestimulante a largo plazo, pudiendo hablarse de una cierta forma de memoria inmunitaria. Otro objetivo de la tesis fue comprobar si la respuesta inmune incrementada en juveniles bajo efecto de la estimulación, se mantiene superior a la del control no estimulado mucho tiempo después. Con las herramientas de evaluación inmunitaria empleadas no se pudo verificar si esto realmente ocurre.

Un objetivo adicional fue comprobar si la eficacia de la inmunoestimulación podría ser mejorada si se tomaba en cuenta el ciclo de muda. Los resultados obtenidos indicarían que es preferible inmunoestimular a los camarones de postmuda a intermuda.

Información adicional obtenida del ensayo de desafío sugiere que el WSSV acelera el ciclo de muda en los animales infectados.

PALABRAS CLAVES

Penaeus vannamei, Virus de la Mancha Blanca, Inmunidad Adaptativa, Inmunidad no Adaptativa, Inmunoestimulación, Ciclo de Muda.

I. INTRODUCCIÓN

Las actividades humanas en medios marinos, concernientes a los crustáceos se han limitado por mucho tiempo a la pesca, por este motivo los medios destinados a los estudios fundamentales han sido escasos. El desarrollo de la acuicultura marina se ha acompañado de un creciente interés por los crustáceos, particularmente por los camarones *Peneidos* realizándose numerosos programas de investigación. Sin embargo estos han sido escasos en campos especializados tales como; la inmunología, la genética y la biología molecular. Con el impulso de la industria camaronera se abren nuevas líneas de investigación, las cuales deben conducir a mediano y largo plazo al incremento de una producción sustentable (Lightner, 1983; Owens *et al.*, 1992).

De la misma manera que la intensificación de los cultivos en la agricultura vio nacer y desarrollar patologías infecciosas, se han podido identificar en los crustáceos *Peneidos* varios tipos de patógenos, particularmente de virus tales como: Baculovirus, Picornavirus, Parvovirus, Densovirus (Lightner, 1983; Lu *et al.*, 1991; Owens *et al.*, 1992), destacando en América Latina el Virus de la Necrosis Hipodérmica y Hematopoyética Infecciosa (IHHNV), el Virus del Síndrome de Taura (TSV) y White Spot Syndrome viral que por sus siglas en inglés es llamado el WSSV agente causante de la enfermedad de la mancha blanca (Lu *et al.*, 1991; Huang *et al.*, 1994).

La enfermedad de etiología viral conocida como mancha blanca, es causada por un virus no ocluido en forma de bacilo que ha sido reportado en una gran variedad de crustáceos incluyendo langostinos *Peneidos* silvestres, cultivados y cangrejos (Darryl and Dixon, 1999). El WSSV ensombrece desde el año 1992 a todas las demás entidades patogénicas dando como resultado grandes pérdidas en la industria camaronera, en muchos países como China, Japón, Tailandia, India, Indonesia, Sri Lanka, Bangladesh, la Península de Malasia, Ecuador, Honduras y Colombia. Por ejemplo en China con el 80 % en pérdidas en 1993, por el valor de un millón de dólares americanos y en Tailandia con pérdidas de 500 millones de dólares americanos en 1996 (Wang *et al.*, 1998).

La inmunomodulación se vislumbra con una alternativa de prevención de esta patología. Existen evidencias publicadas que señalan el efecto protector de los β -glucanos y Peptidoglucanos contra el WSSV. Los glucanos, entre otros estimulantes, han sido utilizados en diferentes estudios sobre la respuesta inmune en peces y crustáceos (Dehasque *et al.*, 1995). Numerosas sustancias como los peptidoglucanos (PG) y los lipopolisacaridos (LPS) también estimulan la respuesta inmune de los artrópodos (Smith & Sörderhäll, 1983; Boonyaratpalin *et al.*, 1995). Típicamente desencadenan la actividad fagocítica, incrementando la resistencia a infecciones bacterianas (Smith and Sörderhäll, 1983; Itami *et al.*, 1989). Paterson *et al.*, (1976), observaron que la aplicación de endotoxinas en la langosta (Lobster) *Homarus americanus* incrementó la resistencia antibacterial. Itami *et al.*, (1998a) reportaron que la administración oral de PG derivados de *Bifidobacterium thermophilum*, fue efectiva contra la prevención de la mancha blanca durante 7 días del tratamiento. En otros trabajos Itami *et al.*, (1998b) señalaron que la administración por vía oral de 0,2 mg de PG / kg de alimento dio como resultado una tasa de supervivencia del 60 %, contra el 11,7 % que correspondió al control. Por otra parte Cheng-Fang *et al.*, (1999), demostraron la efectividad de incorporación en la dieta el β -1,3 glucanos en el aumento de la resistencia al virus de la mancha blanca en PL 15 y juveniles (5,5 \pm 0,5 g), de *Penaeus monodon*. La supervivencia total fue de 5,5 % para postlarvas y 13,3 % para juveniles.

El sistema celular de los camarones sería el responsable de las defensas contra virus y parásitos, sin embargo sería también el que más tarda en madurar (Vargas *et al.*, 1999).

El presente estudio evaluó la resistencia al WSSV en juveniles que fueron inmunoestimulados en la fase de postlarvas de langostinos *Penaeus vannamei*. Se analizaron los efectos de los β -glucanos en el sistema inmune del langostino y la protección a largo plazo contra infecciones a WSSV. Adicionalmente se estudió si la aplicación de los β -glucanos siguiendo el ciclo de muda de los animales influye sobre la eficacia de la inmunoestimulación.

1. ANTECEDENTES

1.1. SINDROME DE LA MANCHA BLANCA

La enfermedad de etiología viral conocida como “síndrome de la mancha blanca” (WSSV), es causada por un virus no ocluido en forma de bacilo (Fig. 1) que ha sido reportado en una gran variedad de crustáceos, incluyendo camarones *Peneidos* silvestres, cultivados y cangrejos (Darryl & Dixon, 1999).

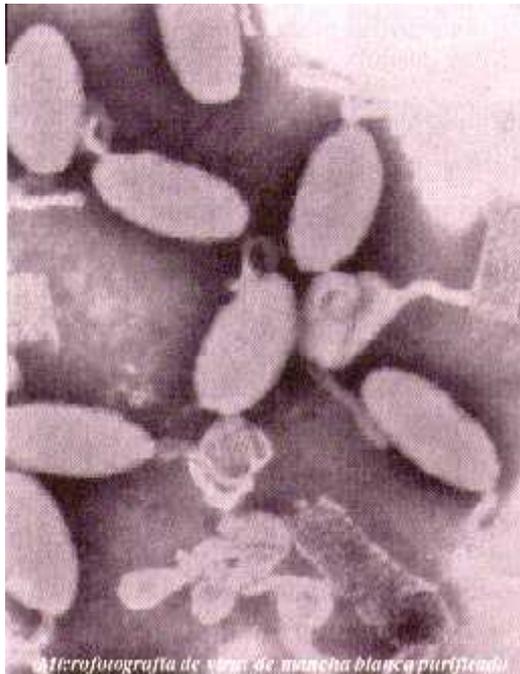


Fig. 1. microfotografía del virus de la mancha blanca *fide* (Alday, 1999).

La enfermedad de la mancha blanca se describió a principios de esta década en Asia, de forma simultánea en diversos países con tradición en el cultivo de crustáceos marinos, y que denominaron a esta enfermedad de diferentes nombres. En Japón se describe el Virus Bacilar de los Peneidos (PRDV). En China se atribuyó la enfermedad al Baculovirus de la Necrosis Hipodermal y Hematopoyético (HHNBV). En Tailandia se denominó Baculovirus Ecto y Mesodermal (SEMBV), como el agente causal de esta enfermedad (Huang *et al.*, 1994).

1.1.1. Taxonomía

Para la nueva enfermedad, hay una lista de 4 virus reportados con diferentes nombres en la literatura: Baculoviral Hypodermal y Necrosis Hematopoyetica Viral (HHNBV) (Huang *et al.*, 1994) el Virus en forma de Vara de *P. japonicus* (RV-PJ) (Inouye *et al.*, 1994; Takahashi *et al.*, 1994), Baculovirus del Sistema Hectodermal y Mesodermal (SEMBV) (Wongteerasupaya *et al.*, 1995) y Baculovirus de la Mancha Blanca (WSVB) (Wang *et al.*, 1995). Estos agentes vírales son muy parecidos entre sí, en el tamaño (80 X 120 X 125 A 360 nm), en la localización geográfica, el grado de infección y los signos producidos en histología. Por estas razones la enfermedad, fue agrupada bajo el nombre de Síndrome de la Mancha Blanca (WSS) (Lightner, 1996).

1.1.2. Signos Clínicos

Los signos clínicos más notorios de la mancha blanca son fácilmente observados en juveniles y preadultos. Al principio aparecen manchas y pintas blanquecinas incrustadas en la cutícula del caparazón y en los segmentos abdominales quinto y sexto, para luego expandirse por todo el cuerpo. Estas manchas van desde puntos minúsculos a discos de varios milímetros de diámetro. Se observan más fácilmente removiendo la cutícula de la cabeza, raspándola con el pulgar y observándola en contra luz (Alday, 1999). La infección típicamente se manifiesta por un comportamiento letárgico en los animales afectados, cese de la alimentación, seguido en pocos días por la aparición de camarones moribundos nadando cerca de los bordes y la superficie de los estanques. Estos animales muestran una coloración rosada, rojiza o café debido a la expansión de los cromatóforos cuticulares y a la coloración de la hemolinfa.

1.1.3. Métodos para la detección del WSSV

Se ha reportado que el diagnóstico basado en la biotecnología es común en la salud de humanos y en la medicina veterinaria, y es aplicado actualmente para algunas enfermedades en camarones del género *Peneidos* (Mari *et al.*, 1993). Así Durand, *et al.*, (1993) *fide* (Mari *et al.*, 1993)., han utilizado hibridación *in situ* sobre camarones infectados con WSSV, dándose un fuerte marcado en los límites de los núcleos infectados y una fuerte hipertrofia. El virus se detectó en los tejidos conectivos; hemolinfa, branquias, epidermis y en el estómago.

La Reacción de Polimerización en Cadena (Polymerase Chain Reaction o PCR), es la técnica más sensible, para detectar rápidamente en larvas y postlarvas a los animales positivos para WSSV (Darryl & Dixon, 1999). También hay técnicas rápidas para la detección del WSSV; la técnica de tinción de branquias y el frotis de hemolinfa. Además de la histopatología para el diagnóstico.

1.1.4. Vías de infección

Las postlarvas recolectadas ó procedente de laboratorios, pueden ser infectadas a través de transmisión horizontal, contaminación por partículas vírales presentes en el agua, alimento ó por infección transmitida desde un tanque de laboratorio hacia otro. No se ha comprobado la transmisión vertical (Yuan, 1999). Las postlarvas son asintomáticas, existiendo por tal motivo el riesgo de que sean uno de los principales vectores. En laboratorios las medidas de bioseguridad tomadas incluyen entre otros análisis, la selección de reproductores, el lavado de huevos / nauplios y el análisis de larvas, por PCR.

La transmisión del WSSV se produce tanto por cohabitación con los crustáceos infectados, por ingestión, canibalismo, predación, o por inclusión de crustáceos infectados en las dietas (Nunan *et al.*, 1998). También podría transmitirse por la vía vertical. El virus se trasmite por células a las oogonias, y a través de células conectivas presentes en el espermatóforo, infectando los huevos antes de la eclosión. Esta vía de transmisión tendría una fuerte repercusión económica, al morir las larvas antes de la eclosión y por tanto reducirse la productividad, sin embargo estos huevos no serian viables y no tendría trascendencia en la transmisión vertical (Lo & Kou, 1998).

1.1.5. Pruebas de desafío

Es una prueba donde el animal es sometido a un estado de estres según el objetivo de la investigación que el investigador determine. Estudios realizados en pruebas de desafío con WSSV han demostrado mortalidades con diferentes métodos aplicados como: inmersión, papilla, administración oral e inyección intramuscular.

Supamattaya *et al.*, (1998) reportaron en tres especies de crustáceos (*Portunus pelagicus*, *Scyrella serrata* y *Acetes sp*), mortalidades de 100 % durante el tercer y quinto día para los métodos de inmersión e inyección intramuscular y de 20 % con el método de administración oral. Estudios realizados por Hameed *et al.*, (2000), con tres métodos de infección, inmersión, administración oral e inyección intramuscular, mostraron que las especies *Macrobachium idella*, *M. lamerrae*, y *M. rosenbergii* son

más susceptibles a WSSV comparados con *Penaeus monodon* y *P. Indicus*. Se encontraron mortalidades de 43.3 % y 53.3 % en las especies *M. idella* y *M. lamerrae* con el método inmersión ante un 53.3 % y 66.7 % de mortalidades con el método de administración oral y un 100 % en *M. idella*, *M. lamerrae*, *P. monodon* y *P. indicus* con el método de inyección intramuscular. En larvas bentónicas de *Scyrella serrata*, Chen-Fang *et al.*, (1999) reportaron mortalidades del 40 % para el grupo experimental infectado por inmersión con WSSV ante un 20 % del grupo control.

1.2. INMUNOMODULACIÓN

Antes de intentar la inmunoestimulación en los camarones es necesario demostrar la existencia de moléculas específicas de reconocimiento y que tales moléculas puedan ser inducidas o activadas por medios biológicos ó medios químicos. En los camarones se han descrito algunos componentes que estarían involucrados en los sistemas de defensa incluyendo: células circulantes o hemocitos, proteínas plasmáticas, enzimas e inhibidores.

1.2.1. Vitaminas

Un aporte nutricional recomendado para camarones *peneidos* implica las vitaminas y los minerales (Devresse, 1998). Se ha reportado que los juveniles de *peneidos* carentes de vitamina C presentaron degeneración vacuolar y extensiva necrosis en el hepatopáncreas (Molina & Montoya, 1999; Molina, 1998). Entre los signos externos de deficiencia de vitamina C, estos autores observaron lesiones melanizadas en epicutícula y coloraciones oscuras en muchas partes del cuerpo; el análisis histopatológico mostró que las lesiones melanizadas coincidían con la formación de agregados de hemocitos y tejidos necróticos.

Diversos artículos reportan el efecto de megadosis de las vitaminas C y E sobre el incremento de la inmunidad en los camarones y los requerimientos de proteínas, ácidos grasos, minerales entre otros. Cedeño *et al.*, (2000) demostraron que la calidad de dieta influye sobre la respuesta inmunitaria. Los efectores inmunitarios que influyeron más sobre el índice inmunitario global de animales alimentados con diferentes porcentajes de proteínas en las dietas fueron; el número de hemocitos, concentración de proteínas plasmáticas, factor de coagulación y aglutinina. Estos efectores serían buenos candidatos para constituirse en marcadores del estado nutricional de los camarones. Verlhae *et al.*, (1995) confirmaron que el suministro de la

vitamina C, en dietas para peces, además de prevenir deficiencias, estimularían la respuesta inmune como la actividad de macrófagos, proliferación, celular y lisozima.

1.2.2. Inmunoestimulantes

Los inmunoestimulantes son sustancias en su mayoría originarias de paredes celulares de levaduras y bacterias. Estos son lipopolisacáridos (LPS), derivados de muramil dipéptidos, glicoproteínas, peptidoglucanos (PG) y β -glucanos (Le Moullac *et al.*, 1998).

La principal función de los inmunoestimulantes es activar el sistema de defensa no específico de los crustáceos frente a partículas, sustancias u organismos ajenos (Vargas *et al.*, 1999) disminuyendo la mortalidad por infecciones secundarias (Wang *et al.*, 1998; Song *et al.*, 1994; Boonyaratpalin *et al.*, 1995). Los inmunoestimulantes hacen funcionar dos variables del sistema inmune no específico; las respuestas humorales y las celulares no específicas incluyendo el sistema profenólidasa (proPO). Aumentan los corpúsculos sanguíneos incrementando la supervivencia de los organismos a las infecciones. Tienen efectos benignos cuando son administrados de manera correcta. En dosis muy altas o muy bajas, se obtienen resultados contra producentes (Engastad, 1994; Söderhäll & Cerenius, 1992).

Por otra parte es posible aumentar la resistencia al estrés y/o infecciones bacterianas en larvas de peces y camarones mediante la administración por vía oral de inmunoestimulantes. El enriquecimiento de alimento vivo o el reemplazo parcial con dietas artificiales conteniendo emulsiones o enriquecidas con inmunoestimulantes, pueden incrementar la supervivencia de larvas de peces y de camarones ante una infección bacteriana (Dehasque *et al.*, 1995). Itami & Takahashi, (1992b), observaron que la bacterina (solución de bacterias inactivas), tendría un efecto terapéutico contra la *Vibriosis* en el cultivo del langostino de kuruma *Penaeus japonicus* en el Japón. La bacterina utilizada se elaboró a partir *Vibrio sp* cepa (NU-1), la cual fue inactivada con formalina y administrada por inyección, inmersión y técnicas de rociado. Diluciones consecutivas de *Vibrio sp* cepa NU-1 inyectadas causaron progresivamente leves mortalidades en el langostino de kuruma, determinándose un LD 50 (Dosis Letal al 50 %) justo por debajo de $3,2 \times 10^2$ células / 2 g de langostino. Posteriormente se aplicó una dosis de "vacuna" de *Vibrio* ($1.9 - 2.6 \times 10^3$ células / langostino), y se confirmó que

brindaba cierta protección contra los patógenos utilizados en la infección (Itami *et al.*, 1989).

1.2.2.1. Los β -glucanos

El β -glucanos es una micropartícula con diámetro alrededor de 2-4 μm , compuesta de más de un 9.5 % de glucosa. Conteniendo alrededor de 83 % de residuos glicosídicos y un 7.5 % de terminales no reductores. Este componente se encuentra en la pared celular de levaduras y hongos los cuales tienen dos componentes: fibrilares y amorfos. Los primeros contienen la quitina y la celulosa conformando las microfibrillas; mientras que los amorfos ó matriciales contienen el glucanos (Duvic & Söderhäll, 1994).

La utilización de β -glucanos como inmunoestimulante en la acuicultura ha levantado muchas expectativas y controversias. Lamentablemente no se han obtenido datos de cuanto invierte la industria camaronera en inmunoestimulantes y si esta inversión cumple las expectativas deseadas. Entre los efectos benéficos de los β -glucanos se pueden citar:

- Protege al camarón ante situaciones de estrés.
- Estimula el sistema inmunológico celular y humoral del camarón.
- Induce a los hemocitos a la captura y exclusión de patógenos.
- Incrementa la supervivencia y el crecimiento.
- Fortalece los estadíos tempranos del camarón.
- Mejora la conversión alimenticia.

Itami & Takahashi (1992a), reportaron que la administración de un porcentaje de β -1,3 glucanos diluidos en una solución de agua de mar es efectiva en el control de vibriosis en el langostino de kuruma. Cheng-Fang *et al.*, (1999), demostraron la efectividad de la incorporación en la dieta del β -1,3 glucanos aumentaron la resistencia

al virus de la mancha blanca en PL. 15 y juveniles (5.5 ± 0.5 g), de *P. monodon*. La supervivencia total fue de 5.5 % para postlarvas y 13.3 % para juveniles.

Su *et al.*, (1995). reportaron que el suministro de β -glucanos derivado de *Schizophyllum commune* al alimento en un 0.2 % incrementa la supervivencia en *P. monodon* contra la infección de vibrios. El β -glucanos estimuló a los hemocitos incrementando significativamente la actividad fagocítica, la adhesión de la célula y la producción del anión superóxido. En la trucha arco iris también se ha obtenido una alta actividad fagocítica después de una semana de estimulación (Siwicki *et al.*, 1994). Estos resultados coinciden con la hipótesis general de la acción estimulante de los β -glucanos sobre el mecanismo inmune no específico (Raa *et al.*, 1992; Ogier de Baulny *et al.*, 1996).

El β -1,3 glucanos incrementa la resistencia contra la infección de vibrio en el camarón kuruma (Itami *et al.*, 1989), el camarón adulto (Lu *et al.*, 1991), en las larvas del camarón (Su *et al.*, 1995), obteniéndose un 60 % de tasa de supervivencia post-prueba de desafío a WSSV. Itami *et al.*, (1989), concluyó que particularmente la resistencia se incrementa por la actividad fagocítica de los hemocitos.

1.3. EL SISTEMA INMUNE

Debido al relativamente pobre conocimiento que se tiene sobre el sistema inmune de los invertebrados, la existencia de especificidad de memoria inmunológica han sido discutidas principalmente por la falta de evidencias. Estos dos elementos serían necesarios para establecer una estimulación del sistema inmune y poder utilizarlos en profilaxis. El sistema inmune de los invertebrados, hasta ahora, ha mostrado diferencias con el sistema inmune de los vertebrados, principalmente por la ausencia de moléculas del tipo inmunoglobulina y células linfoides. Sin embargo, cabe esperar que el sistema de defensa en los invertebrados tenga las mismas funciones que el de los vertebrados (Sörderhäll & Cerenius, 1992).

La función del sistema inmune es mantener la individualidad biológica, por ello, su principal actividad es diferenciar y eliminar todo material extraño de sus tejidos. Para lograrlo, el sistema inmune de los invertebrados deberá contener los elementos básicos necesarios: moléculas de reconocimiento, células efectoras, sistemas amplificadores y reguladores. Estos elementos podrán estar englobados en efectores humorales y sistemas multiméricos que involucre ha ambos tipos de efectores (Sörderhäll, 1992).

Uno de los aspectos humorales más importante en la respuesta inmunológica de los vertebrados es la especificidad. Cuando un animal ha sido invadido por un patógeno potencial o cualquier cuerpo extraño, una serie de eventos complejos se inician, con el resultado final de la generación de proteínas, referidas como anticuerpos, las mismas que son diseñadas para reaccionar contra los materiales extraños. Estos anticuerpos pueden actuar de muchas formas y su presencia es esencial para la actividad de otros tipos de glóbulos blancos pues les permite ingerir material extraño (fagocitosis). Este mecanismo complejo, utiliza varias clases de moléculas, que comunican los diferentes tipos de glóbulos blancos. En la respuesta celular de glóbulos blancos tenemos los que ingieren, engullen y destruyen los materiales foráneos. La inmunidad celular está basada en la célula y la inmunidad humoral está basada en la actividad de componentes solubles altamente específicos que operan extracelularmente (Sörderhäll, 1982).

1.4. EL SISTEMA INMUNE DEL CAMARON

El camarón no tiene un sistema inmunológico específico, o sea que no tiene un sistema inmunitario con memoria inmunológica y una estricta especificidad (anticuerpo y antígeno), debido a su incapacidad de producir inmunoglobulinas. Sin embargo, ellos poseen la capacidad de hacer frente a los patógenos por medio de mecanismos celulares y humorales en los cuales están implicados los diferentes constituyentes de la hemolinfa (Sörderhäll & Cerenius, 1992).

1.4.1. Hemolinfa

En los crustáceos la circulación es abierta y la hemolinfa es un análogo de la sangre y la linfa de los vertebrados. Esta baña los tejidos, denominándose hemocele a los sitios donde ella circula. La hemolinfa presenta un color azul verdoso a causa de la hemocianina (proteína respiratoria abundante en la hemolinfa de todos los crustáceos). Contienen tres tipos de hemocitos; Hialinos (H), Semi-Granulosos (SG) y Granulosos (G).

1.4.1.1. Hemocitos ó Células Circulantes

1.4.1.1.1. Tipos hemocitarios

Se han utilizado diferentes criterios para identificar y clasificar los tipos hemocitarios en los crustáceos: criterios morfológicos basados en la presencia de los gránulos, la forma y la talla; criterios citoquímicos; criterios funcionales tales como, la participación en procesos de coagulación, fagocitosis, encapsulación y criterios antigénicos.

En el camarón se han descrito, al menos tres tipos de células circulantes: los hemocitos hialinos (H), los hemocitos semigranulosos (SG) y los hemocitos granulosos (G) (Sörderhäll & Smith, 1983).

1.4.1.1.1.1. Hemocitos Hialinos (H)

Presentan un delgado citoplasma basófilo, un núcleo amplio y céntrico. Son células que se adhieren y se extienden fácilmente, no contienen gránulos densos. Estas células intervienen en la coagulación y en la fagocitosis (Sörderhäll & Smith, 1983; Sörderhäll, 1992). Tienen muy poca refringencia cuando se observan al microscopio de contraste de fases, observándose de un color gris oscuro. Bauchau & Mengeot, (1978) *vide* Sörderhäll, (1992). Reportaron que en el cangrejo de río, los hemocitos hialinos se caracterizan por la ausencia de gránulos, pero contienen inclusiones citoplásmicas. Los hemocitos hialinos fueron denominados Hemocitos Poco Diferenciados (H.P.D) por Tsing *et al.*, 1989. con base a una elevada relación núcleo citoplasma y a la cromatina débilmente concentrada, característica propia de las células poco diferenciadas.

1.4.1.1.1.2. Hemocitos Semigranulosos (HSG)

Son los más abundantes y muestran semejanza a los leucocitos polimorfos nucleares de los vertebrados. Poseen de 1-40 gránulos pequeños de forma redondeada con un diámetro de 0.4 μm , un núcleo esférico en forma de herradura, con dos lóbulos, central y periférico (Rodríguez *et al.*, 1995; Sörderhäll & Smith, 1983; Sörderhäll, 1992). En los camarones, estas células intervienen en dos mecanismos de defensa: celularmente (fagocitosis y encapsulación) Bauchau & Mengeot, (1978) *vide* Rodríguez *et al.*, 1995 y en la liberación del sistema proPO (melanización). Tienen moderada refringencia cuando se observan al microscopio de contraste de fases observándose de un color celeste claro.

Los Hemocitos Semigranulosos son los únicos que reaccionan desgranulándose al contacto con los polisacáridos microbianos. Los Hemocitos con Pequeños Gránulos

Redondeados así denominados por (Tsing *et al.*, 1989). tienen un núcleo reniforme, ergastoplasma, el aparato de Golgi bien desarrollado y numerosos lisosomas secundarios indicadores claros de una importante actividad metabólica Tsing *et al.*, (1989), desempeñando un papel muy importante como efectores celulares y químicos.

Efectores Celulares

Como efectores celulares intervienen en la fagocitosis de partículas extrañas potencialmente patógenas. Por movimientos de membrana que presentan las células semigranulosas son incorporadas las partículas dentro de ellas y por la acción de enzimas hidrolíticas son degradadas (Sörderhäll & Smith, 1983; Sörderhäll, 1992). También intervienen en la encapsulación y en la formación de nódulos.

Efectores Químicos

Como efectores químicos la presencia de partículas extrañas acarrea la liberación del contenido de los gránulos de la célula, por exocitosis y el mismo estímulo desencadena una reacción enzimática bastante compleja (cascada proPO), que tiene como producto final a la melanina. Este mecanismo llamado melanización es un medio de lucha contra las invasiones de partículas potencialmente patógenas, pues limita su propagación en el animal, por el carácter pegajoso de la melanina y debido a sus propiedades antibacterianas. La melanización puede observarse como manchas negras en los crustáceos (Sörderhäll & Smith, 1983; Sörderhäll, 1992).

1.4.1.1.1.3. Hemocitos Granulosos (HG)

Poseen grandes gránulos con un diámetro de 0.8 μm que esconden parcialmente al núcleo, reduciendo el espacio del citoplasma. Constituyen el 20-30 % de las células circulantes, tienen un núcleo pequeño excéntrico. Presentan inclusiones citoplasmáticas, así como retículo endoplasmático liso, tienen ribosomas libres en el citoplasma. Estos hemocitos son depósitos de los enzimas que forman parte del sistema de la profenóloxidasa (proPO) a un nivel más alto que a los semigranulosos. Estos enzimas son liberados por exocitosis cuando estos hemocitos son estimulados por la peroxinectina y la proteína fijadora de β -glucanos (Söderhäll & Smith, 1983). Intervienen además en el mecanismo de encapsulación. Junto a las células granulosas crean una pared alrededor de los cuerpos extraños impidiendo así que invadan al animal. (Sörderhäll & Smith, 1983; Sörderhäll, 1992). En el camarón *P. Japonicus*

Tsing *et al.*, (1989), describieron a los hemocitos granulados como: los Hemocitos con Grandes Gránulos (H.G.G) los cuales se caracterizan por poseer un ergastoplásma, el aparato de Golgi poco desarrollado y pocos lisosomas secundarios, sugiriendo que se trata de células con una actividad metabólica reducida.

Tienen mucha refringencia cuando se observa al microscopio de contraste de fases observándose de un color amarillo brillante.

En *P. japonicus* Rodríguez *et al.*, (1995), han utilizado dos AcMc como marcadores de subpoblaciones hemocitarias, uno de ellos marca a los hemocitos hialinos y semigranulosos, en tanto que el segundo reconoce solamente los hemocitos granulados, sugiriendo un parentesco antigénico entre los hemocitos hialinos y los semigranulosos.

1.5. MECANISMOS DE DEFENSA A LA MEDICION CELULAR

1.5.1. Fagocitosis

La fagocitosis es un proceso realizado por células especializadas, que tienen la propiedad de reconocer e ingerir las partículas extrañas como bacterias, esporas o células envejecidas del propio organismo. La fagocitosis es la más común de las reacciones de defensa celular, siendo la primera línea de defensa cuando un cuerpo extraño ha sobrepasado la primera barrera física que constituye la cutícula. (Rodríguez *et al.*, 1995; Sörderhäll & Smith, 1983; Sörderhäll, 1992).

En los camarones, los fagocitos inmóviles se ubican en la glándula antenal, en la superficie de las arteriolas del sinus hemal del hepatopáncreas, en el órgano linfóide y en las branquias. En este órgano, los fagocitos son conocidos como podocitos branquiales y probablemente tengan funciones de eliminar proteínas y micropartículas, mientras que los otros fagocitos eliminan material de mayor talla (Johnson, 1987).

Las células fagocíticas de reserva, ubicadas en el corazón y a lo largo del hemocele poseen débil capacidad de eliminación de partículas de carbón y carmín inyectados, pero no se ha encontrado que eliminen virus o bacterias. Los camarones del género *Penaeus* carecen de los hemocitos fijos del sinus hemal del hepatopáncreas y en su lugar presentan fagocitos fijos asociados a vasos sanguíneos, formando un órgano ventral, anterior al hepatopáncreas (Cuénot, 1905).

Los hemocitos implicados en la fagocitosis actúan como macrofagos, éstos pueden reconocer directamente a los microorganismos por medio de receptores presentes en la superficie de los mismos, tales como los β -glucanos, o por medio de opsoninas que facilitan la ingestión (Johnson, 1987; Cuénot, 1905). Una vez que la partícula es englobada dentro de la célula, se forma una vacuola digestiva denominada fagosoma, esta se fusiona con la membrana de los lisosomas que contienen una variedad de hidrolasas, tales como la lisosima, fosfolipasa, ribonucleasa, desoxirribonucleasa, y proteasas que colectivamente participan en la destrucción de organismos atrapados (Prescott & Klein, 1993 *fide* Muñoz, 1996). Todos los hemocitos sanguíneos contienen gránulos ricos en enzimas lisosomiales, las cuales se desgranulan durante la fagocitosis. En adición a esta degranulación y liberación de enzimas hidrolíticas estas células son capaces de entrar en el estado metabólico conocido como choque respiratorio inducido, la activación del choque respiratorio puede ser indicado por procesos fisiológicos incluyendo la fagocitosis de partículas como bacterias, zimosan, o por agentes solubles como el formol muristate acetate (Pipe, 1992 *fide* Muñoz, 1996). Durante el choque respiratorio le genera una serie de radicales de oxígeno (O_2^- ; H_2O_2 ; OH^- O_2^1) que intervienen en la destrucción del mismo organismo ingerido.

1.5.2. Nodulación

Cuando el organismo es invadido por muchos microorganismos, se forman pequeñas cápsulas, desde las cuales ciertos hemocitos se desprenden y se infiltran en la masa de bacterias intentando fagocitarlas (Sörderhäll & Smith, 1983; Sörderhäll, 1992). Estos nódulos son generalmente melanizados. La formación de nódulos ha sido mostrada en ciertos crustáceos, en particular los cangrejos (Smith & Ratcliffe; 1980; White & Ratcliffe, 1982).

1.5.3. Encapsulación

La encapsulación es una reacción hemocitaria de aislamiento de un cuerpo extraño, cuando este es demasiado grande para fagocitarlo, este proceso de defensa es clásico en los invertebrados y ha sido puesto en evidencia en varios crustáceos (Ratcliffe *et al.*, 1985). Este proceso se caracteriza por una intensa actividad hemocitaria alrededor del invasor, el mismo que es melanizado, al tiempo que los hemocitos se organizan en capas alrededor (Sörderhäll & Smith, 1983; Sörderhäll, 1992). Tsing, (1987) ha observado la participación en este proceso de tres tipos de hemocitos, pero el rol principal estaría a cargo de los hemocitos de grandes gránulos.

1.6. SISTEMAS MULTIMERICOS

En asociación con las células circulantes se encuentran: el sistema de la coagulación y el sistema profenoloxidasa (proPO) en los cuales hay liberación de moléculas celulares.

1.6.1. Sistema Profenoloxidasa (proPO)

El sistema profenoloxidasa (proPO) es un complejo integrado de varios factores, que involucran moléculas de reconocimiento, células y sus actividades efectoras. Potencializa el estímulo y requiere de reguladores para evitar el daño sobre el tejido del camarón. El sistema proPO del camarón se encuentra en el interior de los gránulos de los hemocitos granulares y puede ser liberado por estimulación de peptidoglucanos (PG), β -glucanos o lipopolisacáridos (LPS). Una vez liberado el contenido granular, la proPO es transformada, por acción de una proteinasa, en Fenoloxidasa activa (PO). Esta última es responsable de la oxidación de fenoles a quinones, los cuales se polimerizan en melanina (Fig. 5) (Vargas *et al.*, 1999. Sörderhäll & Smith, 1983; Sörderhäll, 1992). La melanina como sus precursores tienen propiedades microbicidas.

La proteinasa responsable de transformar la proPO, es la llamada enzima activadora de la profenoloxidasa (EAPP), este tipo de serina proteasa se encuentra en forma inactiva en el interior de los gránulos. Sin embargo, cuando el contenido de los gránulos es liberado en la hemolinfa, la EAPP se activa en presencia del Ca^{++} plasmático (8-10 mM). La PO podría dañar los tejidos del camarón, debido a esto su acción debe ser limitada por inhibidores de proteinasas (antitripsinas y alfa-2-macroglobulinas). Aunque la activación del sistema proPO puede hacerse en forma directa por componentes microbianos, en el camarón se han detectado proteínas plasmáticas que reconocen a β -glucanos o LPS. Estas proteínas son consideradas como componentes humorales (Vargas *et al.*, 1999; Sörderhäll & Smith, 1983; Sörderhäll, 1992).

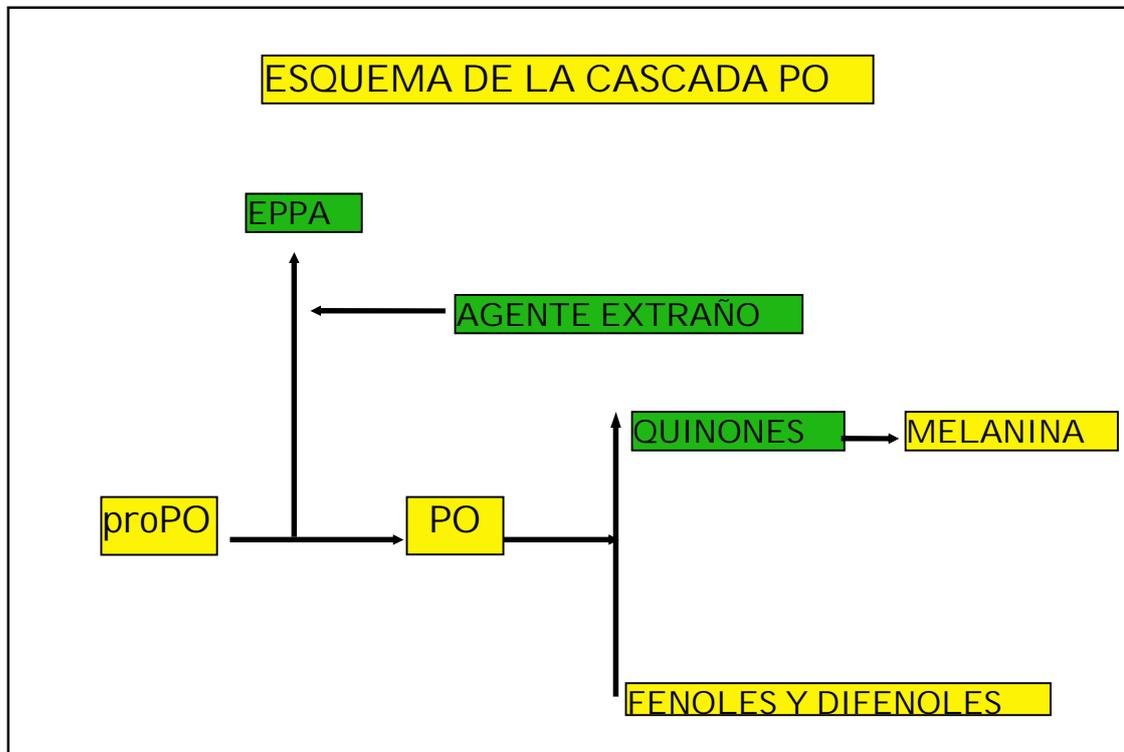


Fig. 2. Diagrama de la activación del sistema de cascada de la actividad profenoloxidasa **proPO** : Profenoloxidasa, **PO** : Fenoloxidasa, **EPPA** : enzima activadora de la Profenoloxidasa *vide* (Rousseau, 1983).

1.6.2. Coagulación

La coagulación es la responsable de establecer una barrera física para evitar la invasión y la pérdida de la hemolinfa. El sistema de coagulación de los camarones es análogo al sistema de coagulación de los vertebrados (Sörderhäll & Smith, 1983; Sörderhäll, 1992).

La proteína análoga al fibrinógeno de los vertebrados, responsable de la formación del coágulo en los camarones es la llamada *Clotting Protein (CP)*. Esta proteína está formada por dos subunidades de 200 KDa, que se encuentran unidas por puentes disulfuros. La CP en el camarón ha sido purificada y su secuencia N-terminal muestra homología con la CP de la langosta y del langostino, lo que sugiere un origen

común. Más aún, el fibrinógeno de los vertebrados aparentemente tiene el mismo origen (Sörderhäll & Smith, 1983; Sörderhäll, 1992).

A diferencia de la CP, el fibrinógeno necesita ser convertido a fibrina por una transglutaminasa (TGasa) sérica que lo polimerize. En el camarón, la CP es sustrato para una "TGasa libre", la cual se encuentra en el interior de los hemocitos hialinos y es la encargada de polimerizar el factor de coagulación (Vargas *et al.*, 1999). La activación de los hemocitos y la liberación de la TGasa se puede llevar a cabo, por cambios homeostáticos, la presencia de lipopolisacáridos (LPS) y glucanos o por factores celulares provenientes de la activación de las células granulares. La TGasa hemocítica parece ser bastante conservada, ya que la reacción de coagulación de la CP del camarón blanco, puede realizarse con TGasa de cobayo o con lisados de hemocitos de otras especies de camarón (Vargas *et al.*, 1999; Sörderhäll & Smith, 1983; Sörderhäll, 1992).

1.7. FACTORES HUMORALES

Además de las proteínas de reconocimiento, también se han descrito proteínas de actividad microbicida y lítica e inhibidores de proteinasas. Según Vargas *et al.*, (1996), las moléculas de reconocimiento serían posiblemente las más importantes, ya que después de reaccionar con el "antígeno" activan funciones celulares.

1.7.1. Proteínas de Reconocimiento

1.7.1.1. Las Aglutininas ó Lectinas

Las lectinas humorales presentes en la mayoría de los fluidos del cuerpo de los invertebrados son los principales candidatos para cumplir un rol en el reconocimiento de polisacáridos y glicoconjugados. Las lectinas humorales pueden aglutinar y así inmovilizar parásitos o microorganismos favoreciendo la fagocitosis, encapsulación y melanización. Algunas aglutininas tienen la propiedad de aglutinar eritrocitos y son conocidas como hemaglutininas, otras aglutinan microorganismos secuestrándolos de la hemolinfa para facilitar la actividad de fagocitosis de los hemocitos (Liszewski & Atkinson, 1993) *fide* Rodríguez *et al.*, (1995). Esto ha demostrado que las lectinas humorales de los invertebrados puedan funcionar como opsoninas (Vasta, 1990) *fide* Rodríguez *et al.*, (1995).

Las lectinas pueden ser de tipo constitutivo o inducible, siendo constitutivo si están presentes siempre en la hemolifa e inducible si pueden estar presentes aumentando su cantidad frente a un estímulo (Rowley & Ratcliffe, 1980) *fide* Rodríguez *et al.*, (1995).

En el plasma del camarón *P. monodon* se aisló una lectina llamada Monodina, esta es una glicoproteína. El anticuerpo contra Monodina interactúa en el extracto de varios tejidos y el suero de otros camarones (Ratanapo & Chulavatnatol, 1990; Koman *et al.*, 1980) *fide* Rodríguez *et al.*, (1995) Una lectina ha sido purificada de la hemolinfa de larvas de la mosca *Sarcophaga peregrina*, obtenida después de lesiones en la pared de su cuerpo. Esta lectina aglutina marcadamente células rojas sanguíneas.

En el camarón *P. californiensis* se aisló una aglutinina que podría adherirse a los lipopolisacáridos bacteriales (Vargas-Albores *et al.*, 1993). Estudios realizados por Chadwick & Dunphy, (1986), *fide* Vargas-Albores *et al.*, (1993). reportaron que las aglutininas no inducidas presentes en el saltamontes *Locusta migratoria*, contribuían a la eliminación de microorganismos invasores, formándose grandes masas de bacterias, ideales para la fagocitosis y formación de nódulos.

1.7.1.2. Lipopolisacárido-Binding Protein (LPS-BP)

Esta proteína fue descrita como una aglutinina que reconoce LPS y es capaz de aglutinar bacterias. Sin embargo, una vez que reacciona con los LPS o bacterias, es capaz de unirse a los hemocitos y estimular la fagocitosis. Aunque los hemocitos puedan llegar a lisarse cuando la fagocitosis es extrema y esto provoque la activación del sistema PO y coagulación, no hay una activación directa de la LPS-BP sobre el sistema proPO (Vargas-Albores *et al.*, 1999).

1.7.1.3. β -1,3-Glucanos Binding Protein (β GBP)

La β GBP posiblemente representa el mejor caso de una molécula de reconocimiento que activa un sistema celular, ya que tienen efecto directo sobre la actividad del sistema proPO. Esta proteína reconoce y se une a los β -glucanos. El complejo glucanos β GBP se une a los hemocitos granulares y producen la liberación de los gránulos. La β GBP es una glicoproteína de 100 KDa que parece ser altamente conservada. Su peso molecular y contenido de aminoácidos es muy similar en el camarón café, blanco y azul, así como en el langostino y otras especies de agua dulce estudiadas. Además la secuencia N-terminal de la β GBP del camarón café y del

camarón blanco muestra gran homología entre ella y la del langostino (Vargas-Albores *et al.*, 1995; 1996).

1.8. EL CICLO DE MUDA EN LOS CRUSTÁCEOS

La muda influye en los crustáceos en la morfología, en la conducta y en la fisiología, influyendo por lo tanto en el ciclo del cultivo del camarón (Dall *et al.*, 1990; Wheatly & Hart, 1994). Se ha observado, que en algunos estadios del ciclo de muda, el camarón deja de alimentarse. A este fenómeno se le llama “ayuno fisiológico” y entre otras cosas se debe a que en el proceso de despojarse del caparazón, algunas estructuras como la boca, el esófago y parte del estómago dejan de ser funcionales. Estos órganos poseen una capa de quitina que se desprende junto con el caparazón impidiendo que sigan realizando sus funciones normales al quedar demasiado blanda la epidermis. Como este proceso de desprendimiento de la capa quitinosa del sistema digestivo comienza durante la premuda intermedia, el animal no puede comer desde ese momento y comienza a utilizar las grasas y azúcares que tiene de reserva para llevar con éxito las etapas subsiguientes de la muda (Vega- villasante *et al.*, 2000).

La interrelación entre muda y reproducción en los crustáceos ha sido estudiada por décadas (Adiyodi & Adiyodi, 1970), (Vargas-Albores *et al.*, 1993). Ya que la muda y la reproducción son actividades sincronizadas. La determinación del estadio de muda ha sido usado para varios protocolos de trabajo como:

- La predicción del pico reproductivo y hasta del ciclo de producción de larvas.
- Para determinar el momento de la enucleación del pedúnculo ocular. La enucleación durante la próxima postmuda causa mortalidad y durante premuda retarda el desarrollo ovárico.
- Finalmente el estudio de muda de animales en cautiverio es importante para determinar el momento de la cosecha.

La determinación de los estadios se ha realizado usando varios criterios, incluyendo cambios externos en el color, dureza del exoesqueleto, cambios morfológicos internos asociados con el retiro de la epidermis por la cutícula (Apolysis) y el desarrollo de nuevas setas (Setogenesis). Los cambios morfológicos pueden ser observados microscópicamente en los pleópodos (Longmuir, 1983) *fide* Smith & Dall,

(1985)., urópodos (Huner & Colvin 1979) *fide* Smith & Dall, (1985). y en secciones abdominales preparado histologicamente (Smith & Dall, 1985).

El ciclo de muda de los crustáceos está dividido en 6 estadios según (Smith & Dall, 1985), y estos son:

1. Postmuda temprana	Estadio	A
2. Postmuda tardía	Estadio	B
3. Intermuda	Estadio	C
4. Premuda	Estadio	D ₀ -D ₁
5. Premuda	Estadio	D ₂ -D ₃
6. Ecdysis	Estadio	E

En la cuadro 1 (ver anexos) se detallan los criterios para evaluar los estadios de muda.

El ciclo de muda en *P. vannamei* adulto es de 23 a 25 días siendo similar al de *P. semisulcatus* (Chan *et al.*, 1988) *fide* Smith & Dall, (1985). y comparado con *Penaeus setiferus*, *Penaeus stylirostris* 12-14 días (Robertson *et al.*, 1987; Huner & Colvi, 1979), *fide* Smith & Dall, (1985). *Penaeus esculentus* con 20 días (Smith & Dall, 1985) y *P. monodon* entre 17 a 19 días (Ching-Ming & Wen-Wen, 1996). *fide* Smith & Sörderhäll, (1983).

El ciclo de muda también influye sobre la respuesta inmune (Le Moullac *et al.*, 1997). ha reportado en *P. stilirostris* resistencia al vibrio durante la intermuda. En intermuda coinciden el más bajo número de hemocitos y la más alta actividad de la profenoloxidasa (Le Moullac *et al.*, 1997). Durante el periodo ecdisis se observa mayor número de hemocitos y la proliferación de las células (Hore, *et al.*, 1992).

La presente estudio tiene como objetivos

Objetivo general

Determinar si la inmunoestimulación incrementa la resistencia al WSSV en *P. vannamei*, y si esta fase relaciona a la existencia de la inmunidad adaptativa en el camarón ó a una mejor respuesta inmune por efecto de los inmunoestimulantes.

Objetivos específicos

- Determinar si la inmunoestimulación aplicada en prejuveniles de *P. vannamei* incrementa la respuesta inmune de juveniles.
- Estudiar si la aplicación de la inmunoestimulación en animales *P. vannamei* en premuda incrementa la supervivencia durante la muda y si esta forma de aplicación interviene en la defensa contra el WSSV.

Investigar si la inmunoestimulación en *P. vannamei* interviene en el proceso de defensa contra el WSSV y si este proceso de defensa puede mantenerse a largo plazo sin estimulación.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. MATERIAL BIOLÓGICO

2.1.1. Camarones

Las postlarvas de camarones de *P. vannamei* empleadas en los bioensayos fueron obtenidas del laboratorio Mar Bravo Parroquia José Luis Tamayo C.D.L.A. Miramar - Salinas Provincia del Guayas. Las postlarvas fueron mantenidas en las instalaciones de la Fundación del Centro Nacional de Acuicultura é Investigaciones Marinas “Edgar Arellano” CENAIM - ESPOL, ubicado en San Pedro de Manglaralto a 180 Km. de la ciudad de Guayaquil – Ecuador.

2.2. LARVICULTURA

Las postlarvas 15 (PL 15), fueron aclimatadas en tanques exteriores, con recambio de agua y aireación constante a una temperatura de 26 - 28 °C y salinidad 34 - 35 ppt.

2.3. TÉCNICAS DE INMUNOEVALUACIÓN

2.3.1. Tratamiento de las muestra para los diferentes ensayos

La hemolinfa de los camarones fue extraída con la ayuda de una jeringuilla de 1 ml, aguja de 26 G1 CBD 1/2 previamente cargada con Citrato de Sodio al 10 %.

- Se determinó la cantidad de hemolinfa y la cantidad de Citrato de Sodio presente en la jeringuilla de extracción.

- Se separó la cantidad necesaria para la prueba de cuantificación del anión superóxido, 100 µl por muestra, (Como mínimo).
- Se separó 10 µl de la hemolinfa, que se utilizó para la realización de los conteos hemocitarios y hemogramas.
- Se centrifugó la muestra a 3000 r.p.m. durante 10 min. Se separó el sobrenadante (plasma) de los hemocitos. El plasma se guardó en congelación a -80 °C. El plasma sirvió para la determinación de la actividad antibacteriana y cuantificación de proteínas plásmáticas.
- Se preparó un extracto celular a partir del pellet de hemocitos. Este extracto fue utilizado para la detección de la actividad fenoloxidasa (PO).

2.3.2. Hemogramas

Se utilizó el método descrito por Muñoz (1996), determinándose los tipos celulares, según el grado de refringencia, utilizando el microscopio de contraste de fases.

2.3.3. Detección de la Actividad Fenoloxidasa (PO)

Esta actividad se detectó mediante el protocolo descrito por Echeverría (1998).

2.3.4. Cuantificación del Anión Superóxido

Se siguió el protocolo descrito por Muñoz (1996).

2.3.5. Cuantificación de Proteínas Totales

Se siguió el métodos de Lowry *et al.*, (1951) aplicado a microplacas Nieto (comunicación personal)

2.3.6. Cuantificación de la Actividad Antibacteriana

Se siguió el protocolo descrito por Tapia (1997).

2.4. METODOS PARA DIAGNOSTICO DE WSSV

2.4.1. Reacción de Polimerización en Cadena (PCR)

Se realizó con la aplicación del Kit IQ 2000.

2.4.2. Histopatología

Se siguió el protocolo descrito por Lightner (1983)

2.4.3. Microbiología

Se siguió el protocolo descrito por Lightner (1983)

2.5. PREPARACIÓN DE LA DIETA

Se preparó la dieta CENAIM-50 (50% de proteínas). A una parte de este alimento se le agregó β -glucanos en dosis de 104 y 75 ppm. Los β -glucanos fueron diluidos en el agua que se utilizó en la formulación de la dieta (Tabla. 02), una vez obtenido el alimento, este fue triturado y se tamizó en 300 y 600 μm , siendo almacenado en un lugar fresco y libre de humedad.

2.6. PREPARACION DEL INOCULO DE WSSV

Se tomaron las branquias de camarones infectados con el WSSV, y fueron homogenizadas con el TN baffle (0.02 M Tris-HCl, 0.4 M NaCl, pH 7.2). La mezcla resultante se centrifugó a 2500 r.p.m. (1020 x g) por 10 min. el sobrenadante fue filtrado con filtro de 0.45 μm . Luego fue almacenado en microtubos a un volumen de 1.5 ml. a -08 °C según Chou *et al.*, (1998).

2.7. ANÁLISIS DE LOS DATOS

2.7.1. Fórmulas para el análisis de supervivencia

Se emplearon las siguientes fórmulas de transformación de los datos para analizar los resultados de supervivencia.

Porcentaje relativo de supervivencia

$$\text{RPS} = \left[1 - \left(\frac{\text{MGE}}{\text{MGC}} \right) \right] \times 100$$

RPS: Porcentaje Relativo de Supervivencia

MEG: Mortalidad del Grupo Experimental

MGC: Mortalidad del Grupo Control

Transformación de la supervivencia a arcoseno

Si los valores de los porcentajes se excedieron de los rangos de 30 % a 70% fueron transformados a arcoseno (Zar, 1999).

$$S = \text{ARCOSENO} \sqrt{X}$$

S: supervivencia transformada

X: Número de sobrevivientes

2.7.2. Análisis estadístico de la prueba desafío

Los datos de supervivencia fueron analizados mediante el análisis estadístico ANOVA a un nivel de confianza de 95 %, usando el tests Hoc Post Scheffe.

2.8. PRIMER BIOENSAYO

2.8.1. Diseño Experimental

Un total de 256 animales en PL. 15 fueron mantenidos en un tanque de 5 toneladas y alimentados con CENAIM-50, la mitad recibieron una estimulación con 75 ppm de β -glucanos incluidos en la dieta base (Tabla. 02), durante 18 días, luego de 100 días fueron distribuidos aleatoriamente en 4 gavetas de 16 recipientes de vidrio de 3 L. (frascos carameleros) con un total de 64 recipientes con una densidad de 4

animales / recipiente, una gaveta fue inmunoestimulada por segunda vez con la dosis antes mencionada. Las gavetas restantes sirvieron de control siendo alimentadas con la dieta CENAIM-50 sin inmunoestimulante. El recambio de agua tratada con U.V fue del 75 % por día, la temperatura se mantuvo entre 29 – 30 °C y una salinidad entre 34 - 35 ppt.

2.8.2. Ensayo de desafío

La infección con el WSSV se realizó en 3 gavetas (16 recipientes de vidrio) dos estimulados y la gaveta restante no estimulada sirvió como control no infectado con el WSSV, la aplicación del inóculo se realizó durante dos días a razón de 750 µl del inóculo 1.5 L agua de mar tratada por U.V.

2.8.3. Muestreo

El muestreo se realizó en un periodo de 2 horas, los datos de cada frasco al azar fueron anotados en fichas de muestreos.

2.9. SEGUNDO BIOENSAYO

2.9.1. Diseño experimental

Animales de 4 g, fueron analizados por PCR para determinar la presencia del WSSV, los resultados fueron negativos. Para inducir la infección se procedió a marcar con Elastómeros (Fig. 3) a 40 animales infectados con el WSSV (previo análisis de PCR), y se los mezcló con la población negativa con el propósito de provocar una transmisión horizontal (no letal) del virus. La infección se comprobó por PCR. Obtenida la infección se tomó un lote de estos animales positivos leves, se colocaron en 20 gavetas de 50 L a una densidad de 40 animales / gaveta, 10 gavetas fueron estimuladas con 104 ppm de β-glucanos incorporado en la dieta CENAIM-50, 5 de estas gavetas fueron estimuladas a partir del estadios C - D₀ y las 5 restantes en diferentes estadios de muda durante 3 días. Las 10 restantes fueron alimentados con CENAIM 50 sin β-glucanos durante todo el tratamiento cinco de ellas sirvieron de control y en las otras 5 se realizó el seguimiento del ciclo de muda.

2.9.2. Análisis de los estadios de muda

El análisis del estadio de muda se realizó en los urópodos centrales en el borde interno de la región adyacente a la punta del telson, según el método de Huner & Colvin (1985) *vide* Smith & Dall, (1985)..

La incisión del urópodo se realizó con una tijera limpia y para la observación e identificación de los estadios se aplicó la tabla de criterios de muda para *Penaeus* sp. Según el método de Smith & Dall., (1985). Las fotografías fueron tomadas con aumento de 20 X y 40 X en fresco (Fig. 4, 5, 6, 7, 8).

2.9.3. Muestreo

De cada tratamiento. Se tomó tomaron 5 animales / gaveta, elegidos aleatoriamente dando un total de 75 muestras. Se extrajo hemolinfa para el análisis inmunológico y animales para PCR e histología.

2.10. TERCER BIOENSAYO

2.10.1. Diseño experimental

Un total de 131 animales positivos para el WSSV de 4 ± 0.5 g, sobrevivientes del segundo bioensayo, inmunoestimulados y no estimulados. Fueron mezclados en tres tanques de 500 L después de unos días fueron distribuidos en 12 acuarios de 50 L a una densidad de 11 animales / acuario. Cuatro acuarios sirvieron de control no estimulado, 4 acuarios estimulados en C-D₀ y los 4 restantes estimulados en diferentes estadios de muda

2.10.2. Muestreo

Se realizó, un muestreo a los 4 acuarios de cada tratamiento tomándose 5 animales / acuario, elegidos aleatoriamente con un total de 60 muestras. Se tomaron animales para histología, microbiología y la hemolinfa para el análisis inmunitario y los datos de peso de cada individuo.

Durante el tercer bioensayo se tomó en cuenta la mortalidad y el número de exuvios.

2.10.3. Análisis Inmunitarios

Se realizaron los análisis de: Cuantificación del Anión superóxido (O₂⁻), Actividad Profenoloxidasa (proPO), Hemogramas, Cuantificación de proteínas plasmáticas, Cuantificación de la actividad antibacteriana (A. A). Además se realizó Histopatología y PCR.

PREPARACIÓN DE ALIMENTO CENAIM-50

Cantidad: 45 kg.
Proteínas: 50 %

Tabla. 2. Datos de la formulación de alimento CENAIM-50 con inmunoestimulante Betaglucanos

Materiales	CODIGO	%	Kg	BETAGLUCANOS	
				75 ppm (5 Kg)	104 ppm (Kg)
Harina De Camarón	452	0.31	0.14	0.0156	0.0156
Harina De Pescado	446	40	18	2	2
Harina De Calamar	391	5	2.25	0.25	0.25
Pasta De Soya	447	24.6	11.07	1.23	1.23
Polvillo De Arroz	448	5	2.25	0.25	0.25
Gluten De Trigo	397	5	2.25	0.25	0.25
Aceite De Pescado		8.11	3.65	0.4056	0.4056
Lecitina Liquida		1.5	0.68	0.0756	0.0756
Vitamina Roche		1	0.45	0.05	0.05
Minerales Roche		2	0.9	0.1	0.1
Aglutinante		0.16	0.07	0.0078	0.0078
Antioxidante		0.01	0	0	0
Antihongo		0.1	0.05	0.0056	0.0056
Maicena		7.2	3.24	0.36	0.36
Producción					
Agua		47	21.15	2035	2035
Total		100	45	5	5

Pulverizado: 600 µm.

NOTA: se cambiaron los niveles de Camarón y lecitina

3. RESULTADOS

3.1. EFECTO DE PROTECCIÓN DE β -GLUCANOS CONTRA EL WSSV A LARGO PLAZO.

En este bioensayo se inmunoestimuló a postlarvas, las mismas que fueron sometidas a un desafío con WSSV, luego de un periodo de 100 días. Un lote de estos animales tuvo una segunda estimulación en el transcurso del ensayo, registrándose mortalidades, signos clínicos y comportamiento.

En lo concerniente a signos clínicos los camarones infectados, presentaron macroscópicamente coloración rojiza en la cola, decoloración del cuerpo, melanización. En todos los tratamientos infectados se detectó una mayor presencia de exuvios, presentándose el pico de mudas al segundo día de la infección con WSSV, en ese mismo día se iniciaron las mortalidades, en esos tratamientos (Fig. 9). En el segundo día el análisis estadístico mostró diferencias significativas entre los tratamientos infectados con respecto al tratamiento no infectado (Tabla. 3). El número total de exuvios durante los 13 días del tratamiento fue mayor en el control infectado (Fig. 10).

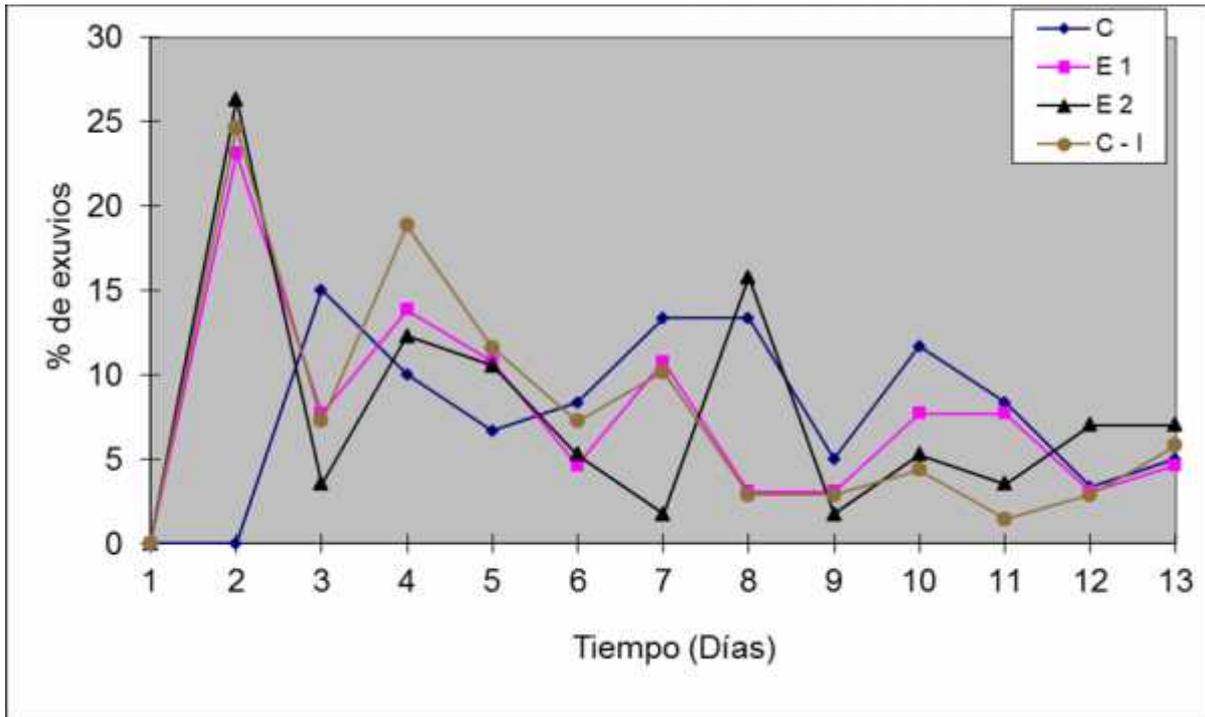


Fig. 9. Datos de porcentaje de exuvios en *P. vannamei* estimulados y sin estimulación durante la prueba de desafío por inmersión frente al WSSV. **C=** Control, **E1=** Estimulados una vez, **E2=** Estimulados dos veces, **C-I=** Control infectado.

Tabla 3. Porcentajes de exuvios en los tratamientos del primer bioensayo al segundo día post-infección.

Tratamientos	% Exuvios
C	0 ^b
E1	26 ^a
E2	23 ^a
C.S.I	28 ^a

C= control, **E1=** Estimulados una vez, **E2=** Estimulados dos veces, **C-I=** Control infectado.

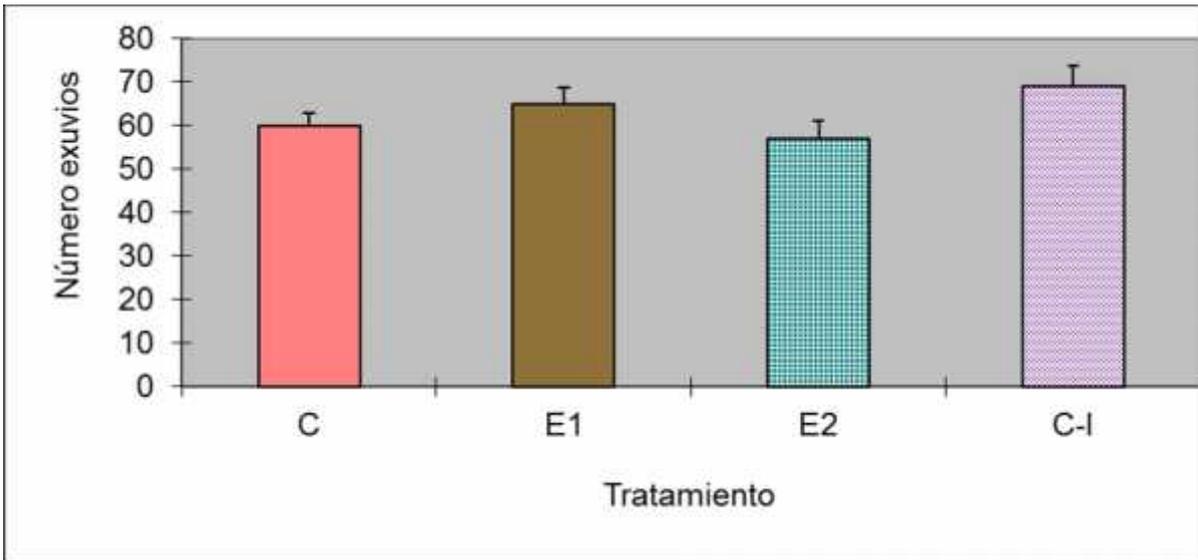


Fig. 10. Número total de exuvios de *P. vannamei* al final de cada tratamiento. **C=** Control, **E1=** Estimulados una vez, **E2=** Estimulados dos veces, **C-I=** Control infectado.

Las tasas relativas de supervivencia de los juveniles al día 13 de postinfección, fueron de un 48 % para los animales estimulados dos veces (E2), un 34 % para los estimuladas una sola vez (E1), y un 11 % para el control sin estimulación infectado (C-I). El control no infectado (C) tuvo una supervivencia del 84 % (Fig. 11). No hubo diferencias significativas entre los grupos E1 y E2. ($P= 0.635$). Por otro lado si se presentaron diferencias significativas ($P < 0.020$) entre E2y C-I.

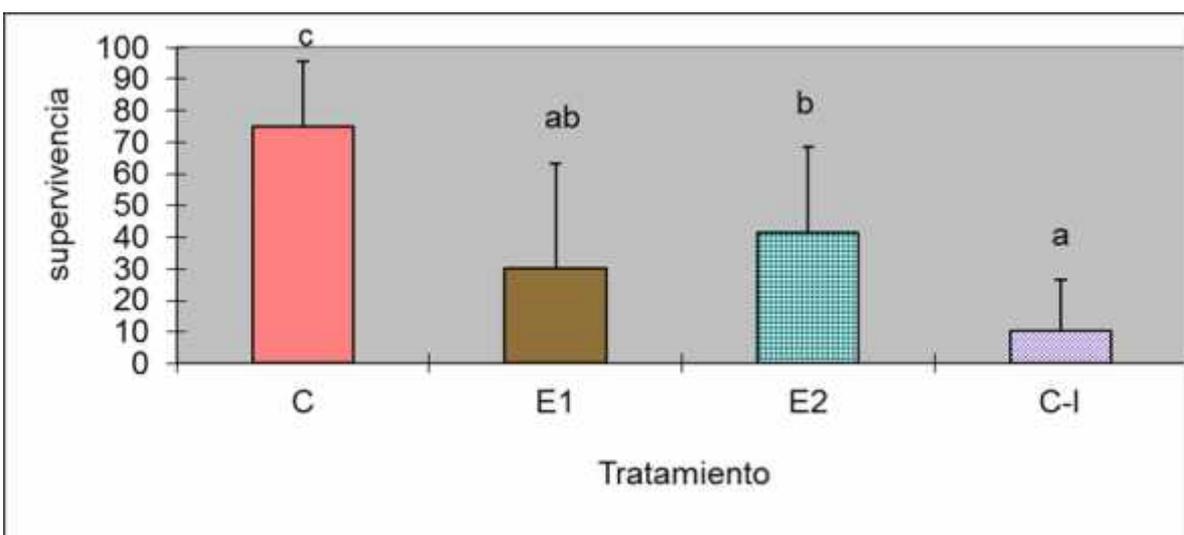


Fig. 11. Supervivencia en *P. vannamei* estimulados con 75 ppm de β -glucano en **E1**= Estimulados una vez, **E2**= Estimulados dos veces después de 90 días **C-I**= Control sin estimulación infectado y **C**= control frente a WSSV. En una prueba de desafío por inmersión durante 13 días. Las letras (minúsculas) representan las diferencias significativas

Los primeros 7 días de infección, tanto los tratamientos como el control no estimulado presentaron mortalidades de forma similar (Fig. 12). Se observaron diferencias en el porcentaje relativo de supervivencia diario, entre los animales estimulados y el control, una estabilización de la mortalidad se dió desde el noveno día en los animales tratados (E1 y E2), y en el C-I. En la Fig 12, se observan dos puntos de declinación, ocurriendo en el cuarto día para los animales del tratamiento E1 y en el décimo día para los animales del tratamiento E2. En estos días se observó mortalidades en el control no infectado. Para ilustrar mejor los resultados antes mencionados, en la figura 13 se compara las mortalidades diarias de todos los tratamientos infectados y no infectados.

Dentro de la fórmula empleada para calcular las mortalidades acumulativas se consideró un margen de error por canibalismo del 8.5 % en las tres gavetas infectadas y de un 16 % en el Control.

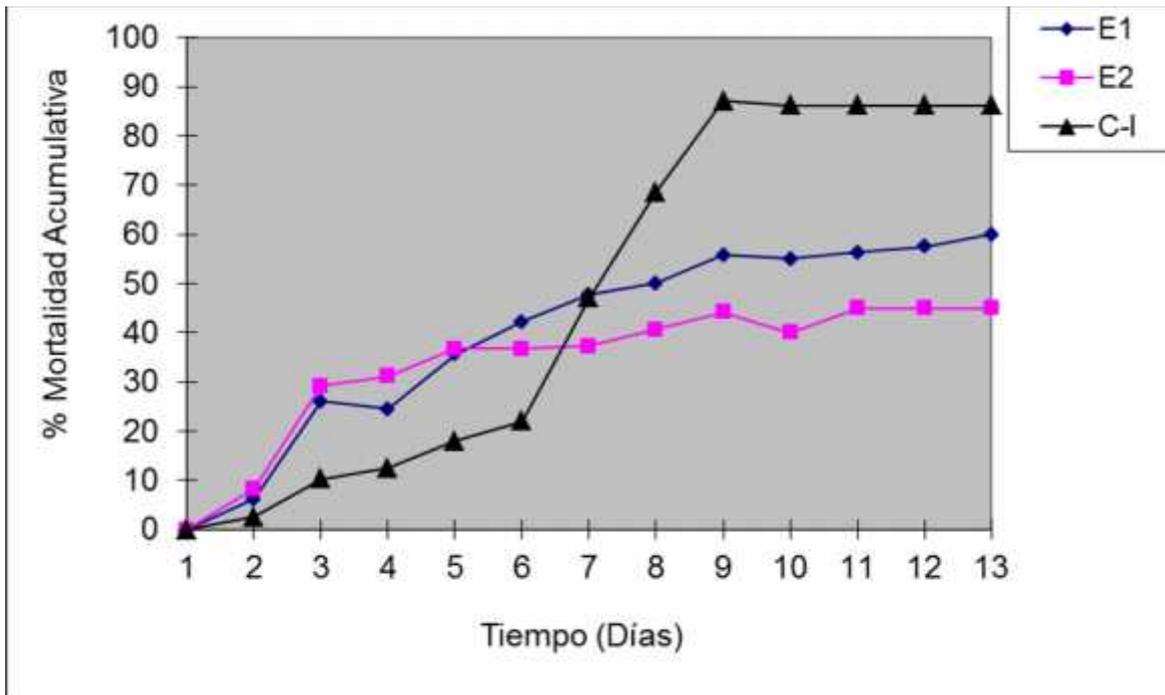


Fig. 12. Mortalidad acumulativa en *P. vannamei* estimulados con 75 ppm de β -glucano en **E1**= Estimulados una vez, **E2**= Estimulados dos veces después de 90 días **C-I**= Control sin estimulación infectado en frente a WSSV. En una prueba de desafío por inmersión durante 13 días.

Al linealizar las funciones de cada tratamiento las líneas de regresión de las mortalidades no se encontró (Fig. 14.) diferencias significativas ($P > 0.05$) entre las pendientes de cada tratamiento. Presentando un índices de correlación diferentes entre cada tratamiento. Estos resultados indicarían que los animales murieron a la misma velocidad en todos los tratamientos.

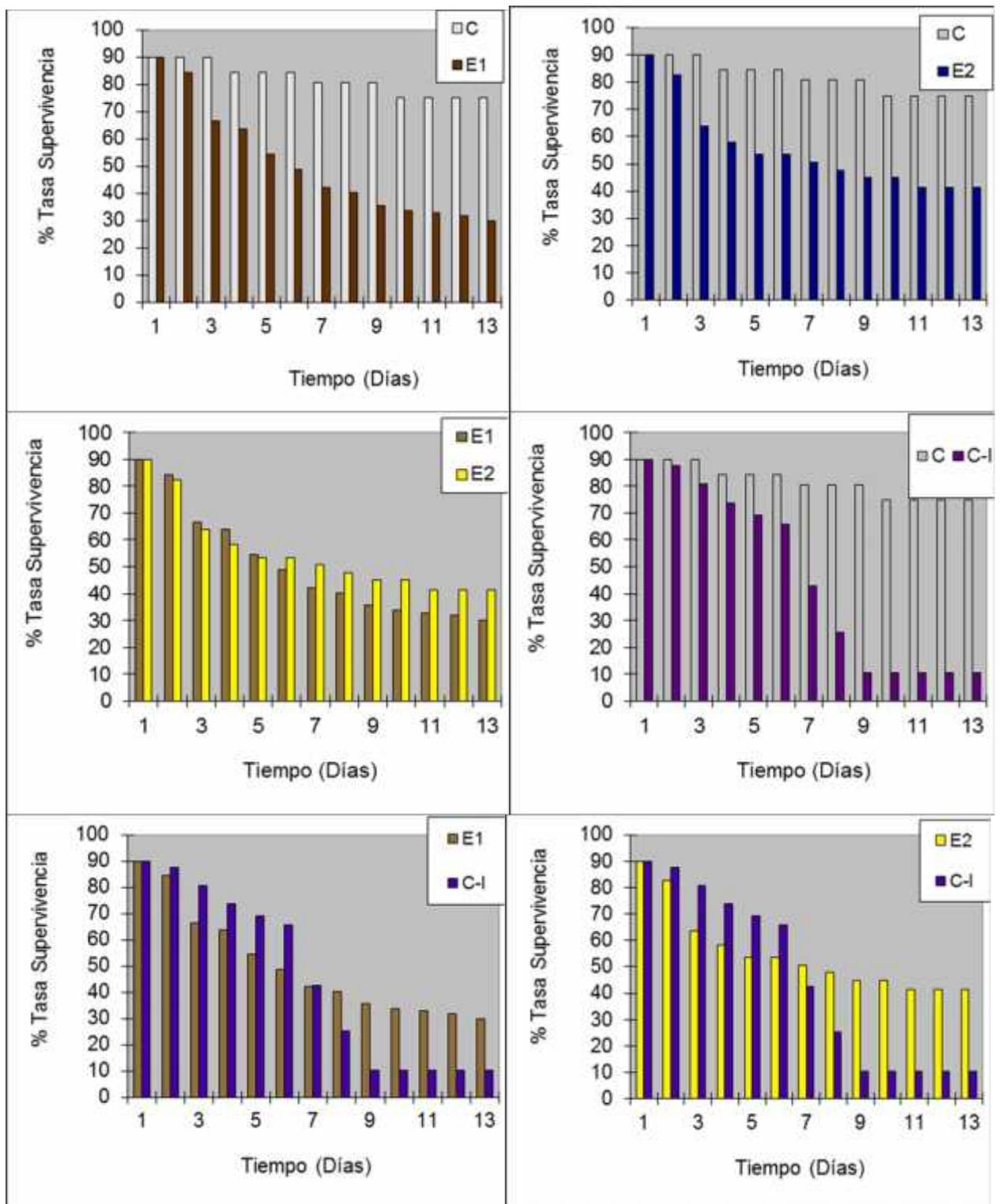


Fig. 13. Supervivencia *P. vannamei* inmunoestimulado con 75 ppm de β -glucano a **E1**= Estimulados una vez **E2**= Estimulados dos veces después de 90 días y **C-I**= Control sin estimulación y **C**= Control, expuestos al WSSV a la prueba desafío por inmersión durante 13 días.

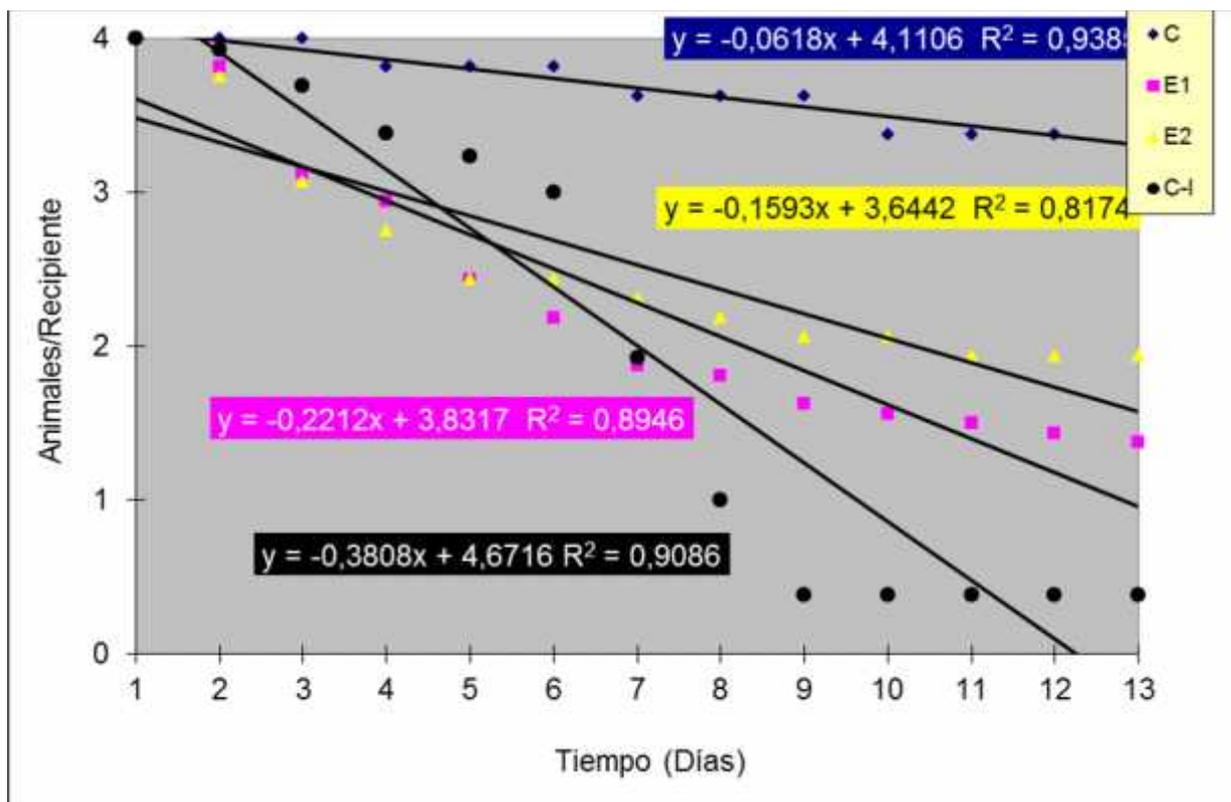


Fig. 14. Análisis de coeficientes de regresión en *P. vannamei* inmunoestimulados con 75 ppm de β -glucano en **E1**= Estimulados una vez, **E2**= Estimulados dos veces después de 90 días, **C-I**= Control sin estimulación infectado y **C**= Control infectado frente a WSSV en una prueba de desafío por inmersión durante 13 días.

Se tomaron 10 camarones sobrevivientes de los tratamientos C, E1, E2 y 5 animales del C-I. Se realizaron análisis de PCR mediante el método de Lo *et al.*, (1998). Teniendo como resultados positivos y negativos al WSSV en todos los tratamientos. El reporte de histología no reveló presencia de WSSV en los sobrevivientes. Se observó vibriosis en algunos animales de todos los tratamientos, en particular en los animales del control infectados.

En los camarones moribundos recolectados del tratamiento Control la histología mostró Vibriosis afectando los órganos del hepatopáncreas y linfoide.

3.2. INMUNOESTIMULACIÓN CON β -GLUCANOS SIGUIENDO EL CICLO DE MUDA

El objetivo de este ensayo fue establecer si la estimulación siguiendo los estadios de muda, mejoraba la respuesta inmune del camarón, teniendo a la vez un

efecto negativo sobre el WSSV. Los β -glucanos fueron aplicados en una dosis fuerte (104 ppm), durante 3 días. En este trabajo se utilizaron animales positivos para WSSV. Los animales restantes después del muestreo de la estimulación de los estadios de mudas sirvieron para el tercer bioensayo.

Cuando las postlarvas (PL 15) llegaron al CENAIM, estos animales fueron negativos al WSSV por PCR (Fig. 15). Con la finalidad de tener una infección no letal crónica con el virus, se colocaron en el mismo tanque 40 animales positivos. Estos camarones fueron marcados con elastómeros a fin de evitar confusiones (Fig. 3). Un análisis por PCR realizado 20 días después demostró una infección generalizada en la población (Fig. 16).



Fig. 15. Análisis de PCR a las postlarvas

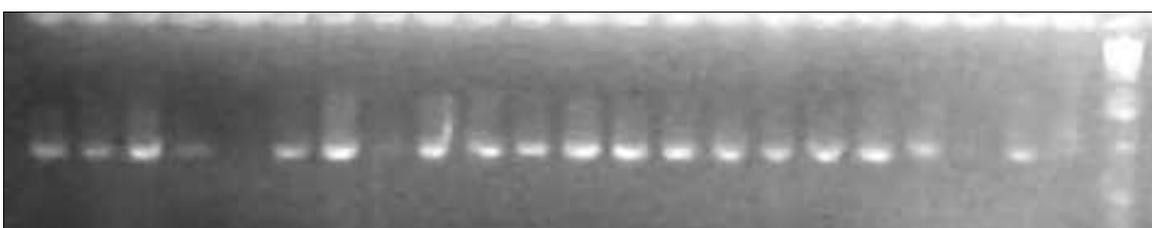


Fig. 16. Análisis de PCR a las postlarvas (depués de 20 días).

Con el propósito de determinar el estadio de muda adecuado para inmunoestimular, se observó periódicamente los estadios de muda en los animales de 5 tanques del bioensayo, reservados para tal efecto. Los resultados sugirieron que solo una parte de la población estuvo sincronizada (Fig. 17). Los animales de 5 tanques fueron estimulados el 11 de diciembre del 2000 cuando un 50 % de la población se encontraba en C-D₀. Los animales de otros 5 tanques fueron estimulados

un día después cuando la población se encontraba en diferentes estadios de muda (Fig. 17).

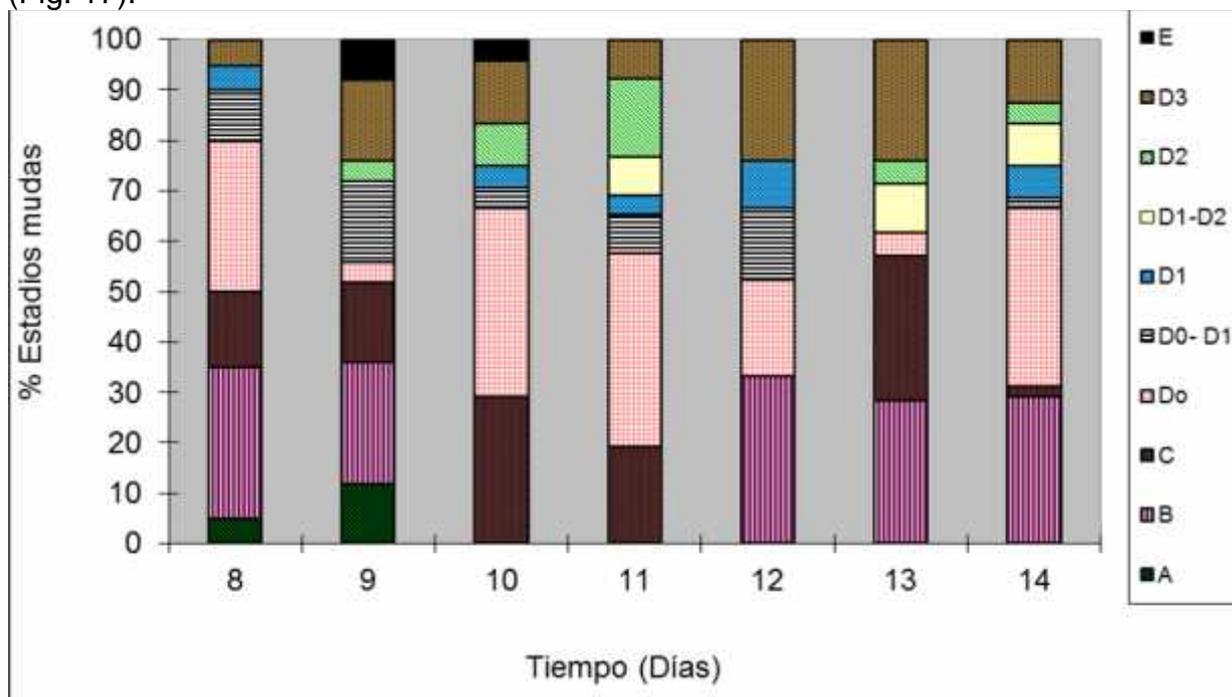


Fig. 17. Seguimiento del ciclo de muda en *P. vannamei* para la aplicación del inmunoestimulante entre los estadios C-D₀ y D₀-D₁. (Las letras en la leyenda representa los estadios de muda) durante el día 8 - 14 de diciembre del 2000.

Para la extracción de la hemolinfa los animales del primer grupo estimulado fueron seleccionados en intermuda, al tacto, según el grado de dureza de la cutícula. Para muestrear la hemolinfa del segundo grupo se observó al microscopio, los urópodos de animales duros al tacto, clasificando las muestras en los estadios de intermuda (C; C-D₀) y en temprana premuda (D₀ - D₁; D₂.) Se descartó las hemolinfas de animales en estadios D₂ - D₃; D₃ A y B. El muestreo fue similar en los controles de los dos grupos de animales estimulados.

3.2.1. Resultados de pruebas inmunitarias sin considerar la muda

A partir de estos datos se calcularon los índices inmunitarios parciales y globales. En los animales inmunoestimulados la producción del anión superóxido (O₂⁻) y el número total de hemocitos (NTH) fue superior a los no estimulados, esto se reflejó también en un índice inmunitarios más alto. No se observó diferencias significativas entre la formula hemocitaria del control y la de los animales inmuestimulados (Fig. 18).

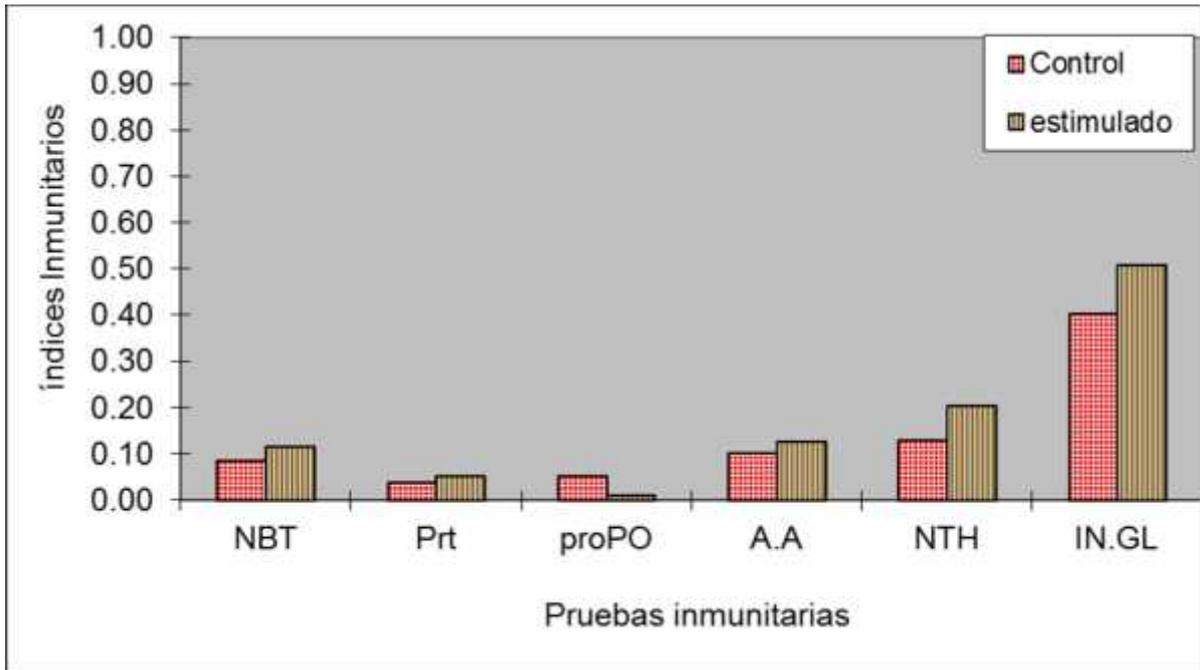


Fig.18. Índice inmunitario parciales y globales en *P. vannamei* estimulados con β -glucanos, muestreados en intermuda evaluados al tacto. **NBT**= Anión Superoxido, **Prt** = Cuantificación de proteínas plásmaticas, **proPO** = Actividad de la profenoloxidasa, **A.A** = Cuantificación de la actividad antibacteriana, **NTH**= Número total de hemocitos y **IN.GL**= Índice global inmunitario.

3.2.2. Pruebas inmunitarias en animales muestreados en intermuda y en temprana premuda

En cuanto a los animales inmunoestimulados, muestreados en C-D₀, fueron superiores a los del control en NTH y actividad fenoloxidasa, este incremento se reflejó en el índice inmunitario global. Se observó, sin embargo una actividad antibacteriana inferior al control (Fig. 19).

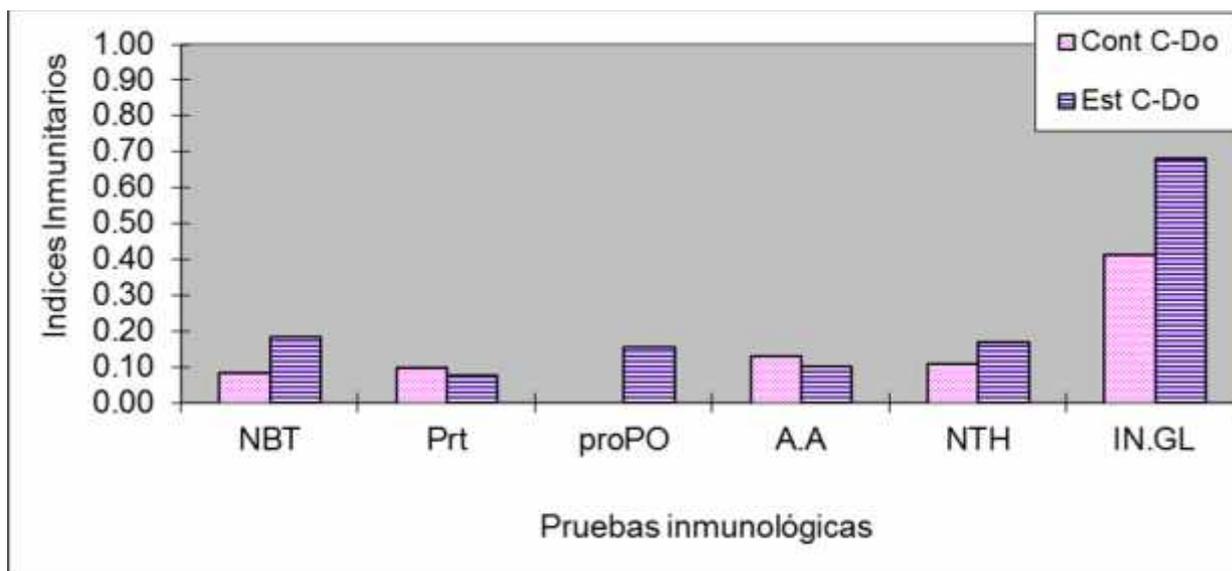


Fig. 19. Índice inmunitario parciales y globales en *P. vannamei* estimulados con β -glucanos, muestreados en intermedia evaluados por observación microscópica. **NBT=** Anión Superoxido, **Prt=** Cuantificación de proteínas plásmaticas, **proPO=** Actividad de la profenoloxidasa, **A.A=** Cuantificación de la actividad antibacteriana, **NTH=** número total de hemocitos y **IN.GL=** índice global

En los animales muestreados en temprana premuda, se observó un incremento de la actividad fenoloxidasa. Este incremento se vio reflejado en el índice global, el mismo que fue mayor en los estimulados (Fig. 20). Los animales del control fueron, sin embargo superiores en producción de anión superoxido. No hubo diferencias en formula hemocitaria entre los animales del control y los inmunoestimulados.

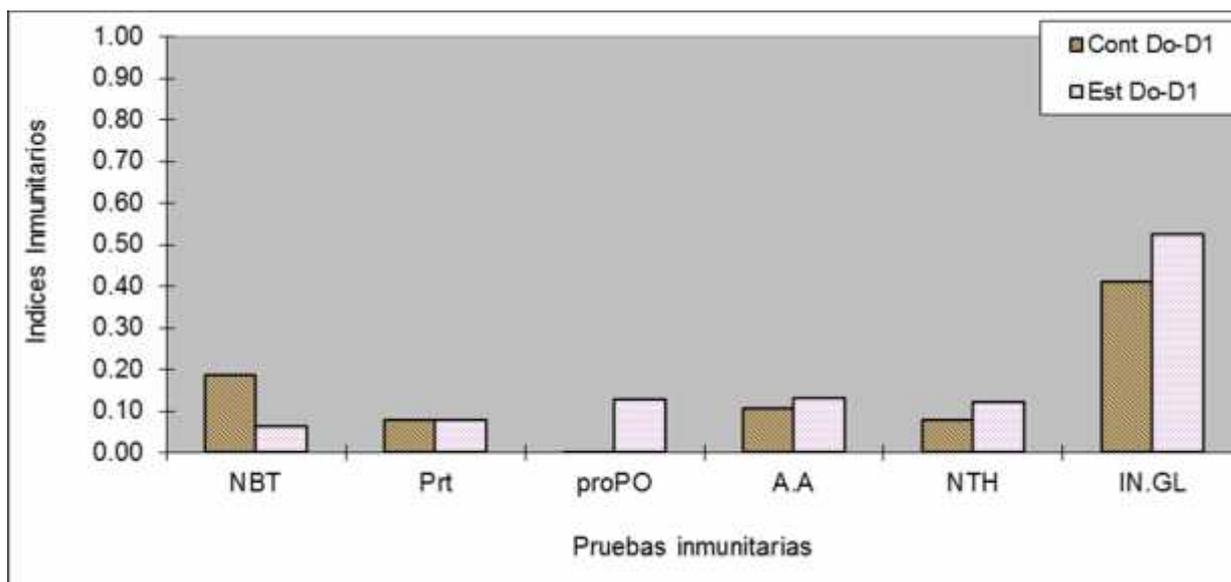


Fig. 20. Índice inmunitario parciales y globales en *P. vannamei* estimulados con β -glucanos, muestreados en intermuda siendo evaluados por observación microscópica **NBT**= Anión Superoxido, **Prt**= Cuantificación de proteínas plasmáticas, **proPO**= Actividad de la Profenoloxidasa, **A.A**= Cuantificación de la actividad antibacteriana, **NTH**= número total de hemocitos y **IN.GL** : índice global .

Tomando los datos en conjunto no se encontró diferencias entre los índices globales de los controles y los estimulados (Fig. 21).

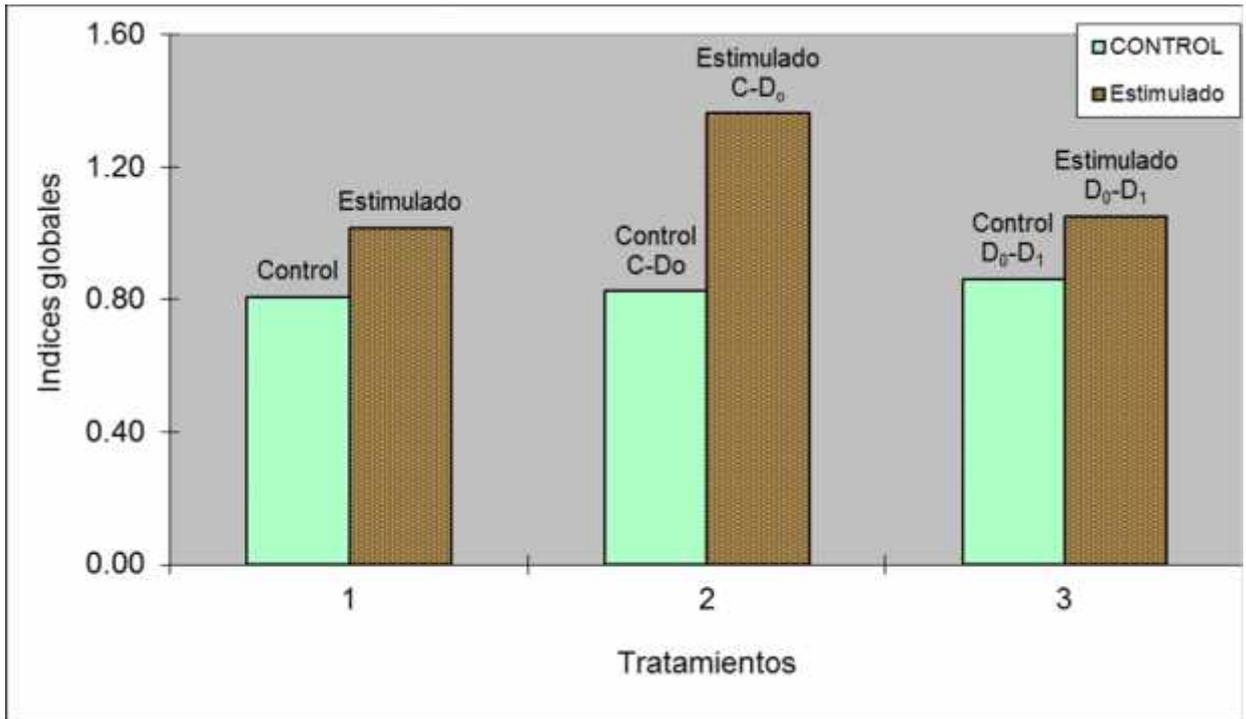


Fig. 21. Análisis índice global inmunitario de tratamientos considerando la muda y sin considerar la muda en *P. vannamei* inmunoestimulados con β -glucanos.

Analizando la concentración de hemocitos hialinos en controles la tendencia fue encontrar una baja concentración de hemocitos hialinos en intermuda. La estimulación actúa incrementando esta concentración. (Fig. 22).

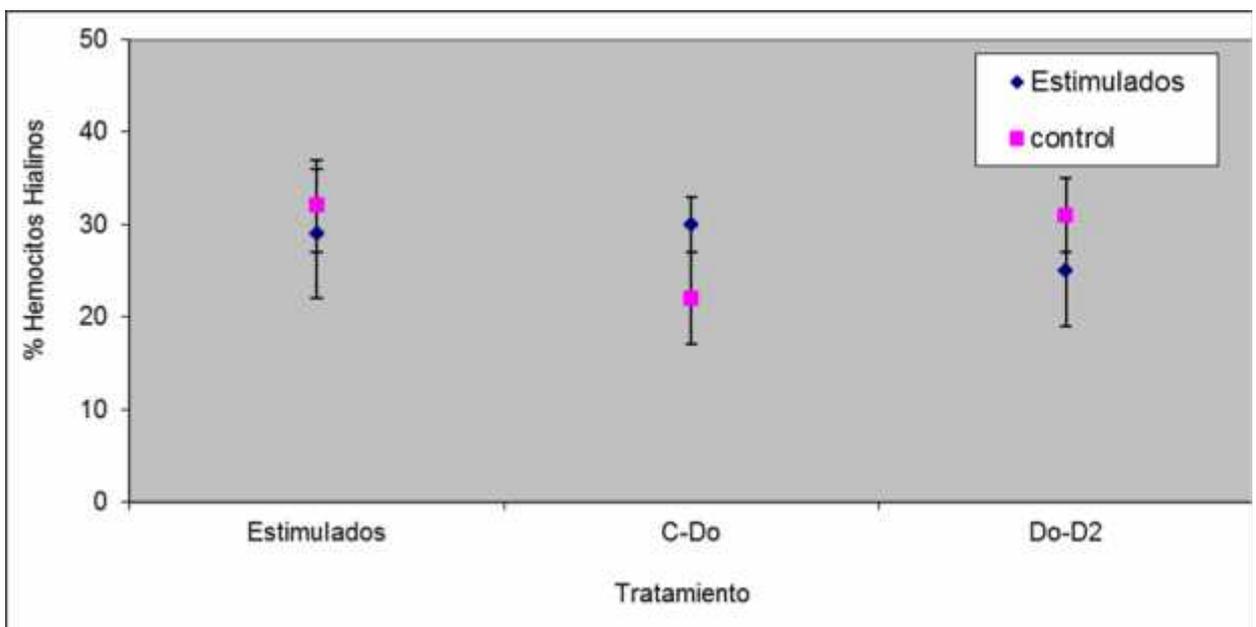


Fig. 22. Datos de hemocitos hialinos en camarones *P. vannamei* estimulados y no estimulados en intermuda, (C-Do), temprana premuda (Do-D2) y sin considerar la muda (S.M).

3.2.3. Respuesta inmunitaria a largo plazo en animales inmunoestimulados

Los animales sobrevivientes del segundo bioensayo se agruparon y fueron distribuidos aleatoriamente, siguiendo la misma dinámica de trabajo del bioensayo antes mencionado (inmunoestimulación siguiendo los estadios de muda).

La actividad antibacteriana fue más alta en el control y esto se reflejó en el índice global. Por otro lado, se presentó una baja producción del anión superóxido en los tratamientos inmunoestimulados con β -glucanos, así como el control. La respuesta inmunitaria fue baja en todos los tratamientos incluyendo el control esto se reflejó en el índice global más bajo que en el ensayo anterior (Fig. 23).

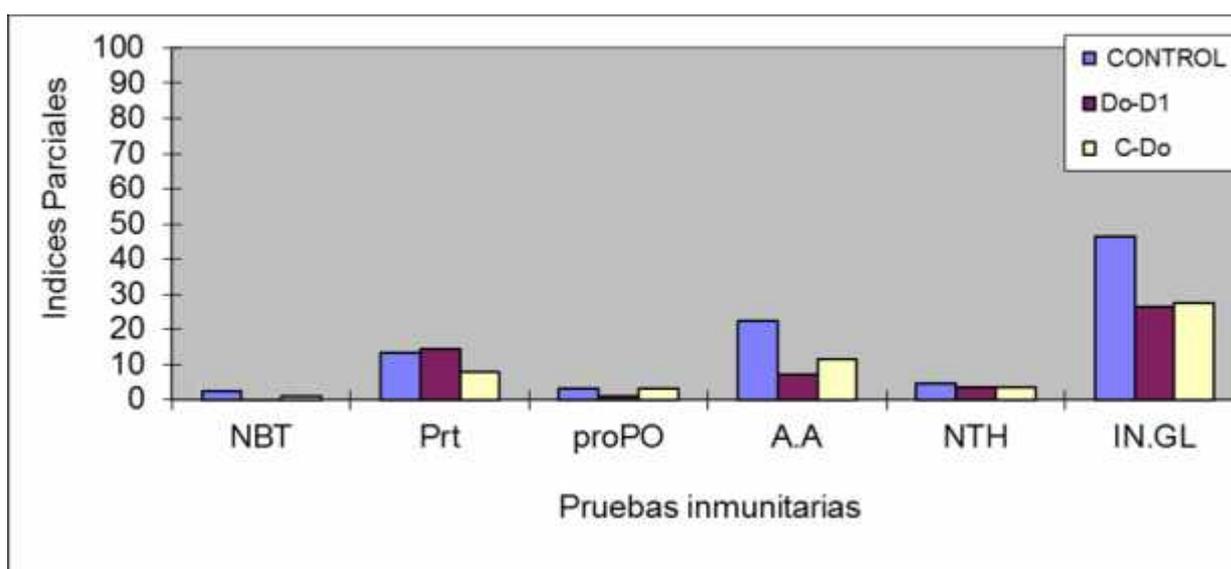


Fig. 23. Índices Parciales y Globales en *P. vannamei* **NBT**= Anión Superóxido, **Prt**= Cuantificación de Proteínas Totales, **proPO**= Actividad Antibacteriana, **A.A**= Actividad Antibacteriana, **NTH**= Número de Hemocitos Totales y **IN.GL**= Índice global.

Curiosamente Los animales que fueron inmunoestimulados hasta temprana premuda mantienen mucho tiempo después altas concentraciones de hemocitos hialinos (Fig. 24).

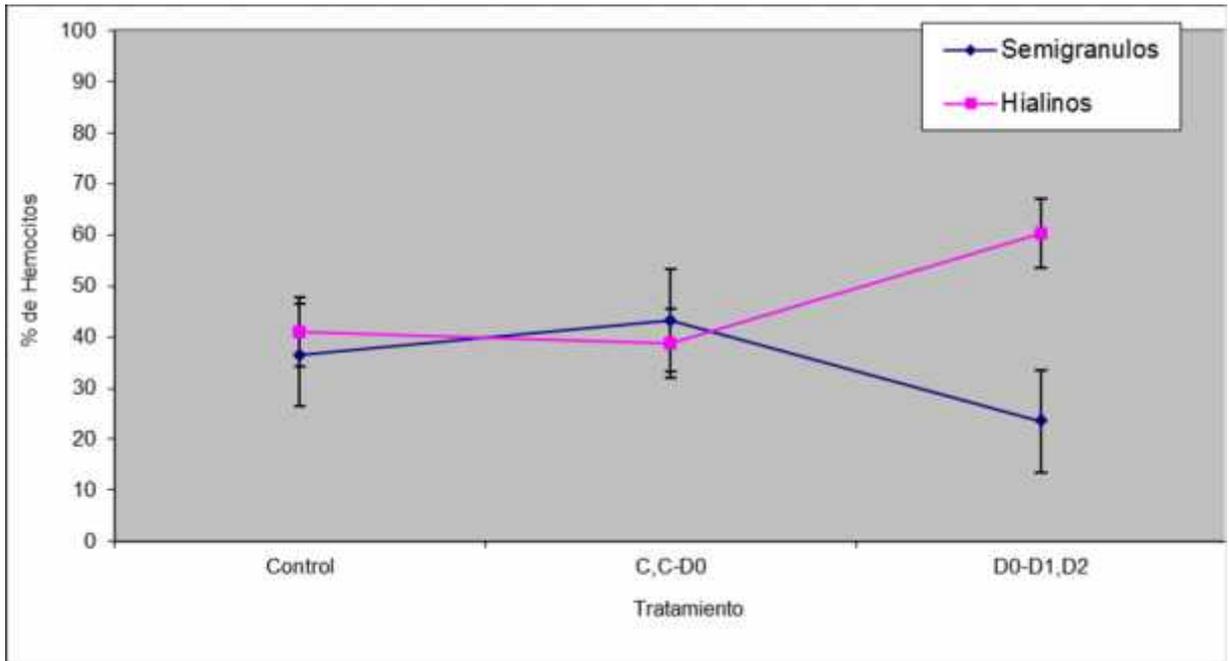


Fig. 24. Concentración de hemocitos hialinos y semigranulosos, en animales muestreados mucho tiempo después de la inmuoestimulación, realizada siguiendo el estadio de muda.

3. DISCUSIÓN

En el primer bioensayo antes de la aplicación del inóculo de WSSV, no se observaron mortalidades durante el período de descanso en las cuatro gavetas. Los animales presentaron un comportamiento normal, su exoesqueleto limpio de máculas y sus apéndices sin coloración alguna indicadora de enfermedad.

Luego de la infección con el inóculo del WSSV se comenzó a observar a partir del segundo día modificaciones en el comportamiento del animal. Presentando nados muy rápidos, golpes en las paredes del recipiente y poca ingestión de alimento. Luego se observaron signos clínicos como: constante presencia de exuvios, decoloración del cuerpo, coloración rojiza en la cola. Estas observaciones coinciden con las realizadas por Hameed, *et al.*, (2000), quien reportó: letargía y pérdida de apetito, coloración rojiza en los urópodos, telson, periópodos, y pleópodos en camarones marinos *Penaeus monodon* y *Penaeus indicus* y en camarones de agua dulce *Macrobrachium rosenbergii*, *M. lamerrae* y *M. idella* infectados experimentalmente. Estos signos clínicos no son generalizados a todos los crustáceos. Por otra parte Hameed *et al.*, (2000), mencionaron que los juveniles de *M. rosenbergii* muertos no mostraron todos los signos clínicos de infección, el adulto *M. rosenbergii* mostró letargía durante los días de post-inoculo, recuperándose días después. Estos signos clínicos se obtuvieron también, en los animales inmunoestimulados, estos estudios no coinciden con los estudios realizados por Huang & Song (1999) quienes mencionaron que los grupos de hembras de *P. monodon* tratadas con glucanos e infectadas con el WSSV, no mostraron signos como; coloración rojiza en el cuerpo y manchas blancas en el exoesqueleto

Se observó un alto porcentaje de exuvios en todos los tratamientos infectados a partir del segundo día de infección, coincidiendo con el inicio de las mortalidades. Estas observaciones sugieren que el WSSV, influyó sobre la muda acelerándola.

Los animales inmunoestimulados E2 con β -glucanos mostraron una supervivencia mayor a los estimulados por una vez (E1), sin existir diferencias significativas entre ellos ($P = 0.635$) indicando que la inmunoestimulación tuvo un efecto de protección a largo plazo (100 días). Por otra parte una segunda estimulación reforzaría esta respuesta, indicando que no sería necesario realizar múltiples estimulaciones para incrementar la supervivencia de los camarones al WSSV.

Cabe mencionar que nuestros resultados de supervivencia fueron superiores a los reportados de otros autores en animales inmunoestimulados. En otras publicaciones, la tasa de supervivencia para postlarvas y juveniles alimentados con glucanos fue menor al 20 % y el desarrollo de la resistencia fue apareciendo lentamente, durante 20 días. En estudios similares Song *et al.*, (1997), investigaron los efectos del β -1,3; β 1,6 glucanos, sobre la resistencia al WSSV en el camarón tigre negro alimentado con una dieta que contenía glucanos provenientes de la levadura de *Saccharomyces cerevisiae* (4,5 mo). Las tasas de supervivencia para PL 66 y P L 113 (l. e. juveniles y sub adultos) fueron entre 59 y 24 % respectivamente en una prueba de desafío contra el WSSV por inmersión durante 6 días.

Al inicio del desafío con el WSSV la caída de la población es similar en los tratamientos estimulados y el control. Estabilizándose al noveno día en los animales estimulados. Estos resultados sugieren que entre los camarones existen animales que no responden a la estimulación, muriendo de la misma manera que el control no tratado, pero que una parte de la población responde positivamente sobreviviendo a la infección y son ellos los implicados en la estabilización de la pendiente de mortalidad al séptimo día. Nuestros resultados no prueban la existencia de alguna memoria inmunitaria en el camarón, siendo muy probable que en estos animales la estimulación en estadios muy tempranos estimule una acelerada maduración de la respuesta inmune, Pero indicarían que estos crustáceos tienen la capacidad de conservar a largo plazo Los efectos de la inmunoestimulación.

Analizando las pendientes de las funciones lineales no se encontró diferencias de velocidades de mortalidad. Probablemente esto se debió a dos causas. La primera, una alta mortalidad en todos los tratamientos al inicio del bioensayo, estas mortalidades fueron de mucho peso al momento de analizar Los datos. La segunda causa guardó relación con la baja densidad en las réplicas (4 animales / recipiente), trayendo como consecuencia una alto coeficiente de variabilidad, considerando que cada animal representó un 25 % de la población del recipiente.

Algunos estudios realizados muestran puntos a considerar durante la prueba de desafío, para evitar la contaminación (anexos tabla .3). En nuestro bioensayo teniendo en cuenta estas indicaciones, los animales muertos y moribundo fueron retirados periódicamente durante el desafío para evitar ingestión. Sin embargo se encontró animales muertos y partes de camarón. En base a esto se consideró un margen de error por canibalismo, del 8.5 % en las tres gavetas infectadas y del 16 % en el control.

Con la finalidad de determinar si los parámetros inmunitarios que se miden en CENAIM eran capaces de detectar una excitación del sistema inmune mucho tiempo después de la inmunoestimulación se diseñaron dos bioensayos. En el primero se estimuló a los camarones muestreando la hemolinfa inmediatamente después. Estos animales fueron guardados durante varias semanas y muestreados nuevamente. A fin de obtener, información útil para el manejo de la mancha blanca en los estanques de cultivo, se evaluó a la vez en los mismos animales si la inmunoestimulación en intermuda era más eficaz que la inmunoestimulación en premuda. Considerando que los animales en las piscinas son en términos generales positivos al WSSV, antes de iniciar el primer bioensayo se provocó una infección horizontal por cohabitación.

En términos generales se podría decir que la aplicación de β -glucanos considerando y sin considerar la muda, excitó el sistema inmune del camarón, particularmente en los animales estimulados hasta intermuda. Se observó además un hecho corroborado por la literatura, es decir, que en intermuda (en Los camarones del control), se observó las más bajas concentraciones de hemocitos hialinos (los hemocitos hialinos se incrementan en periodo ecdicial). Observaciones previas indican que la concentración de este tipo celular tiene una relación negativa con la concentración de hemocitos semigranulosos y que durante procesos de inmunoestimulación o infecciones, es frecuente observar incremento de hemocitos hialinos y pérdida de hemocitos semigranulosos circulantes. Esta inversión de la fórmula hemocitaria podría ser un indicador de excitación inmunitaria. En los animales estimulados en intermuda el número de hialinas se incrementó con respecto al control. En los animales estimulados hasta temprana premuda la concentración de hemocitos hialinos decrece, incrementándose por lo tanto las concentraciones hemocitos semigranulosos circulantes.

Le Moullac *et al.*, (1997) Se observaron cambios significativos en el conteo de hemocitos y la actividad fenoloxidasa en los estadios de premuda e intermuda del camarón ellos confirmaron que en el estadio de premuda el animal es más susceptible a enfermedades que durante la intermuda (48% contra un 28 % de mortalidad en intermuda). Indudablemente los hemocitos se encuentran asociados a varias funciones inmunitarias, e. g. el sistema profenoloxidasa (proPO) que involucra a la vez a la encapsulación y la melanización y funciones de reconocimiento no específicos (Smith & Söderhäll, 1983; Johansson & Söderhäll, 1989). Sin embargo las variaciones en el medio ambiente inducen a cambios de estado de la respuesta inmune en los crustáceos y hacen que este sea manipulable. la inmunoestimulación (factor externos) aplicada según el estadio de muda (factor intrínseco), induciría modificaciones de la

formula hemocitaria, las cuales podrían provocarse en situaciones de alerta epidemiológica.

El segundo muestreo de los animales inmunoestimulados y del control reveló por una parte un debilitamiento general de la población, provocado posiblemente por la infección crónica con el WSSV. No se observaron diferencias significativas de peso y supervivencia entre los animales inmunoestimulados y del control. Según la fórmula hemocitaria el estado de excitación del sistema inmune se mantuvo en los animales inmunoestimulados hasta premuda. Posiblemente para un estudio de esta naturaleza sea preferible utilizar animales libres de este patógeno.

CONCLUSIONES

La inmuoestimulación de animales en postlarva, tuvo un efecto protector que se extendió durante 2 meses.

Los resultados alcanzados no indican de manera concluyente inmunidad adaptativa en el camarón, pero si un efecto inmuoestimulador a largo plazo.

Se consiguió infectar a los animales por inmersión y cohabitación.

Las observaciones de los signos clínicos de los animales infectados indicarían que el WSSV influye sobre la muda acelerándola.

Un alto porcentaje de la población responde a la inmuoestimulación y sobrevive al WSSV, sin embargo una parte de esta población no responde cayendo bruscamente en los primeros días de desafío con WSSV.

Los resultados de inmuoestimulación según el estadio de muda indicarían que sería preferible inmuoestimar de postmuda a intermuda.

RECOMENDACIONES

Independientemente de las dificultades de técnicas para la inmunización de los camarones, cabe señalarse que los camarones deben ser inmunizados en edades tempranas, donde además son más susceptibles a las infecciones.

- Realizar análisis de lixiviación de Los β -glucanos en el agua, para determinar cuánto inmunoestimulante ingresa realmente en el animal.
- Tomar en cuenta el ciclo de muda para aplicar inmunoestimulante.
- Repetir el tercer bioensayo (análisis inmunitario de animales varias semanas después de la inmunoestimulación) en animales libres de WSSV.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alday, V.,1999. Diagnóstico y prevención de la enfermedad del punto blanco. Mundo acuícola; 5(1):3-6
- Boonyaratpalin, S., Boonyaratpalin, M., Supamattaya, K y Toride, Y., 1995. Effects of peptidoglycan (PG) on growth, survival, immune response, and tolerance to stress in black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. In M Shariff, J. R. Arthur & R. P.Surbasinghe (eds.). Disease in asian aquaculture II. Fish health section, Asian Fisheries Society, Manila; 469-477.
- Bray, J. Y, and Lasso- de la Vega, E.,1992. Bacteria in the hemolymph of the freshwater prawn *Machrobrachium rosenbergii*. J. Aquat. Anim Health 4: 67-69.
- Cedeño, V. R., Mialhe, E. y Rodríguez, J., 2000. Efectores inmunitarios como marcadores de deficiencias nutricionales en dietas para *Litopenaeus vannamei*. Panorama acuícola: 5 (2):42-44.
- Chan, S. M., Rankin, S, and Keeley, L. L., 1988. Characterization of the molt stages in *Penaeus Vannamei*: setogenesis and hemolymph levels of total protein, ecdysteroids and glucose . Biol. Bull. 175: 185-192.
- Chen-fang, Ch., Mao-Sea, S., Hounng-Yung, Ch., Chu-Fang, L., Guang-Hsiung, K y I-Chiu, L., 1999. Effect of dietary β -1,3-glucan on resistance to white spot syndrome virus (WSSV) in postlarval and juvenile *Penaeus monodon*. Diseases of Aquatic Organisms:31 (36):163-168.
- Chou, H. Y., Huang, C., Lo C. C, and Kou, G. H.,1998. Studies of transmission of white spot syndrome associated baculovirus (WSBV) in *Penaeus monodon* and *P. japonicus* via water-borne contact and oral ingestion. Aquaculture. 164: 263-276.
- Cuénot, L., 1905. L'organe phagocytaire des crustacés décapodes. Arch. Zool. Exp.Gén., Sér. 4, 3, 1 pl. I.
- Dall, W., Hill, J., Rostehlisberg, P. C, and Shaples, D. J., 1990. The biology of the penaeidae. Academic press, San Diego, C. A, 489.

- Darryl, E. J. y Dixon, H. M., 1999. Presencia del virus de la mancha blanca en camarones de América Central. *Panorama acuícola*: 5 (4):9-12.
- Dehasque, M., Van Assche, J. y Devresse, B., 1995. Evaluación de los efectos de la administración oral de inmunoestimulantes en las enfermedades de especies para la acuicultura. *Aquaculture N.V*:403-422.
- Devresse, B., 1998. Nutrition and health: the nutraceutical approach. *International Aqua Feed*.
- Duvic, B. y Söderhall, K., 1994. Purification and partial characterization of a 1,3 β -glucans-binding protein-membrane receptor from blood cells of the crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *Eur. J. Biochem*;207: 233-238.
- Echeverria, R. L. F.,1998. Desarrollo de un ensayo de cuantificación de la actividad fenoloxidasa (PO) como una herramienta de inmunoevaluación del camarón *Penaeus vannamei*. Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas CENAIM.1-17.
- Engastad, R. E., 1994. Yeast β -glucan as an immunostimulant in Atlantic salmon(*salmon salas*): biological effects, recognition and structural aspects University of tromso; 42.
- Hameed, A. S., Charles, M. X, Anilkumar. M. 2000. Tolerance of *Macrobrachium rosenbergii* to white spot syndrome virus. *Aquaculture* 183: 207-213.
- Huang J, Song XL, Yu J, Yang CH, 1995. Baculoviral hypodermal and hematopoietic necrosis-study on the pathogen and pathology of the explosive epidemic disease of shrimp. *Mar fish Res* 16(1):1-10.
- Inouye, K., Miwa, S., Oseko, N., Nakano, H., Kimura, T., 1994. Mass mortalities of cultured kuruma shirmp, *Penaeus japonicus* in Japan In: electron microscopic evidence of the causative virus. *Fish. Pathol* 29: 149-158.
- Itami, T. Y. y Takahashi, Y. Y., 1992a. Studies on vaccination against vibriosis in cultured kurama prawn *Penaeus japonicus*. J. shimonoseki Part I. Effect of vaccine concentration and duration of vaccination efficacy. *Aquaclture*: 40 (1-4): 83-87.

- Itami, T. Y. y Takahashi, Y. Y., 1992b. Studies on vaccination against vibriosis in cultured kurama prawn *Penaeus japonicus*. parte II J. shimonoseki Part I. Effect of vaccine concentration and duration of vaccination efficacy. *Aquaculture*: 40 (1-4): 139-144.
- Itami, T. Y., Takahashi, Y. Y y Nakamura, Y., 1989. Efficacy of vaccination against vibriosis in cultured kurama prawn *Penaeus japonicus*. *Journal of. Aquat. Animal Health. Aquaculture*:3 (1):238-242.
- Itami, T., Kubono, K., Asano, M., Tukishige, K., Susuki, N., Takeno, N., Nishimura, H., Kondo, M. y Takahashi, Y., 1998a. Enhancement of disease resistance of kurama shrimp, *Penaeus japonicus*, after oral administration of peptidoglycan derived from *Bifidobacterium thermophilum*. *Aquaculture*: 164 (1-4) 277-288.
- Itami, T., Maeda, M., Susuki, N., Tokushige, K., Nakagama, A., Hennig, O., Kondo, M., Kasomchandra, J., Hirono, I., Aoki, T., Kusuda, R. y Takhashi, T., 1998b. Possible prevention of whit spot syndrome (WSSV) in kurama shrimp, *Penaeus japonicus*, In Japan: T.W Flegel (ed) *Advances in shrimp biotechnology*, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok: *Aquaculture*: 164 (1-4) 291-295.
- Johnson, P. T., 1987 A review of fixed phagocytic and pinocytotic cells of decapod crustaceans, with remarks on hemocytes *Developments and comparative Immunology* : 11 : 679-704.
- Le Moullac., G. P., Saulnier, L. D., Gaorant, C y Dehaque, M., 1998. Principal and problems involved in the evaluation of Immunoestimulant on juvenile shrimp. IV simposium International of nutrition aquaculture; 15-18 Nov. 9-10.
- Lightner, D. V., 1983. Diseases of cultured penaeid shrimp. In: Mcvey, J. P. (ed). *CRC Handbook of mariculture Crustacean Aquaculture*. CRS Press Boca Raton, Florida; (1): 289-320.
- Lightner, D. V., 1988. Bacterial shell (brow spot) disease. In. Sindermann, C. J. Lightner, D. V., (Eds) *Diseases Diagnosis and Control in North American Marine Aquiculture* . *Developments in Aquiculture and fisheries Societe*, 17: 48-51.

- Lightner, D. V., 1996. A handbook of pathology and diagnostic procedures for diseases of penaeid acute viremia (PAV). *Fish Pathol.* 31: 39-45.
- Lo, C. F and Kou, G. H., 1998. Virus-associated of white spot syndrome of shrimp in Taiwan *Fish Pathology*, 33:365-371.
- Lowry, O.H. , Rosebrough, N. J., Farr , A. L. et Randall, R. J. (1951) *J. Biol. Chem.* 193,265
- Mari, J., J.R. Bonami and D.V. Lightner. 1993. Partial cloning of the genome of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus, unusual parvovirus pathogenic for penaeid Shrimps; diagnosis of the diseases using a specific probe *J. Gen viral* 74;2637-2643.
- Molina, C. y Montoya, N., 1999. Histopatología de la influencia de la vitamina C en camarón blanco, *Penaeus vannamei*. V Congreso Ecuatoriano de Acuicultura; 1-7.
- Molina, C., 1998. Efectos del balance de energía en dietas para juveniles *Litopenaeus vannamei* *Inf. Act. CENAIM - ESPOL. ECUADOR*: 12-14.
- Muñoz, N. M., 1996. Desarrollo y optimización de ensayos para la evaluación del estado inmunitario del camarón *Penaeus vannamei* Tesis de Acuicultura. Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar. Escuela Superior Politécnica del Litoral-Ecuador.
- Nunan, L. M., Poulos, B. T, and Lightner, D. V. 1998. The detection of white spot syndrome virus (WSSV) and yellow head virus (YHV) in imported commodity shrimp. *Aquaculture*. 160: 19-30.
- Owens, L., Anderson, I. G., Kenway, M., Trott, L and Benzie, J. A. H., 1992. Infectious hypodermal and haemotopoietic necrosis virus (IHHNV) in a hybrid penaeid prawn from tropical Australia. *Dis. Aquat. Org*; 14, 219-228.
- Paterson, W. D., Stewart, J. E. and Zwicker, B. M. (1976). *J. Invertebr. Pathol* 27 95-104.

- Raa, J., Roerstad, C. Engstad, R, and Robertsen, B., 1992. The use de immunostimulants to increse resistance of aquatic organisms to microbial infections. Dis. Asian. Aquacult 1; 391-400.
- Ratcliffe, N. A., Rowley, A. F., Fitzgerald, S. W. and Rhodes, C. P., 1985. Invertebrate immunity : basic concepts and recent advances. Int. Rev. Cytol. 97: 183-350.
- Rodríguez, J., Boulo, V., Mialhe, E, and Bachère, E., 1995. Characterization of shirmp hemocytes and plasma components by monoclonal antibodies. J. Cell. Sci. 108: 1043-1050.
- Rousseau, Ch., 1993. Inmunología y genética de los camarones: Características del sistema de defensa y su posible aplicación para el control de enfermedades. Acuicultura. Tropical. 1: 41-44.
- Siwiski, A. K., Anderson, D. P, and Reumsey, G. L., 1994. Dietary intake of immunostimulantns by rainbow truot affects non-specific immunity and protection against furunculocis. Vet. Immunol Immunopathol 41: 125-139.
- Smith DM, W Dall 1985. Moulthing staging the tiger prawn *Penaeus esculentus*. In P. Rothlisberg C., Hill, B. J., Staple, D. J. Eds. Second Australian National Prawn Seminar. NPS2, Cleveland, Queensland, Australia. pp. 85-93.
- Smith, V. J, and Ratcliffe, N. A., 1980. Host defence reactions of the shore crab, *Carcinus maenas* (L); clearance and distribution of injected particles. J. Mar. Biol. Assoc. U. K. 60: 89-102.
- Smith, V. J, and Söderhäll, K. 1983. Induction of degranulation and lysis of hemocytes in the freshwater crayfish *Astacus astacus* by components of the prophenoloxidase activating system *in vitro*. Cell and Tissue Research, 233: 295-303.
- Söderhäll, K. y Cerenius, L., 1992. Crustacean immunity. Ann. Rev. of Fish Diseases; 712, 155-161.
- Söderhäll, K., 1992. Biochimical and molecular aspects of cellular communication in arthropods Ann. Boll. Zool; 59:141-151.

- Song, Y. L. Sung, H. H. y Kou, G. H 1994. Vibriosis resistance induced by glucan treatment in tiger shrimp *Penaeus monodon*. Fish Pathol; 29, 11- 27.
- Song, Y-L. and Hsieh, Y-T., 1994. Immunostimulation of tiger shrimp *Penaeus monodon* hemocytes for generation of microbicidal substances: analysis of reactive oxygen specie. Developmental and Comparative Immunology 18: 201-209.
- Sörderhäll, K, and Smith, V. J., 1983. Separation of the haemocytes populations of *Carcinus maenas* and other marine decapods, and prophenoloxidase distribution. Dev. Comp. Immunol. 7: 229-239.
- Su, M. S., Liu, K. F. Chang, C. F., Liao I. C., 1995. Enhancement of grass prawn *Penaeus monodon* postlarvae viability by β -1,3-glucan from *Schizophyllum commune* J. Taiwan Fish. Res. 3: 125- 132.
- Supamattaya, K., Hoffmann, R. W., Booyarattpalin. S., Kanchana-phum P. 1998. Experimental transmission of white spot syndrome virus (WSSV) from black tiger shirmp *Penaeus japonicus* to the sand crab *Portunus pelagicos*, mud crab *Scylla serrata* and krill *Acetes* sp Dis. Aquat. Org. 32: 79-85.
- Takahashi, Y., Itami, T., Kondo, M., Maeda, M., Fujii, R, Tomonaga, S., Supamattaya, K, and Boonyaratpalin, S., 1994. Electron microscopy evidence of bacilloform virus infection in Kuruma shrimp (*Penaeus japonicus*). Fish. Pathol 29: 121-125.
- Tapia., 1997. Optimización de ensayos antibacterianos y estudios sobre la inducción de la actividad antibacteriana en el hemolinfa del camarón *Penaeus vannamei*. Tesis de Acuicultura. Facultad de Ingeniería Maritina y ciencias del mar. Escuela Superior Politécnica del Litoral-Ecuador.
- Tsing, A., 1987. Recherche sur les hemocytes et l'immunité chez le crustace *Peneaeus japonicus* (Bate, 1881). These doctoract, Universite des Sciences et techniques du languedoc, Montpellier.
- Vargas, A. F., Higuera, C. I., Jimenez, V. F., Hernandez, L. J., Gollas, G. T y Yepiz, P. G., 1999. Posibilidades de inmunoestimulación del camarón a través del alimento. Avance en Nutrición Acuicola III: 433-439.

- Vargas-Albores, F. Jiménez-Vega, F. Sörderhäll, K., 1996. A plasma protein isolated from brown shrimp (*Penaeus californiensis*) which enhances the activation of prophenoloxidase system by β -1,3-glucan. *Developements and comparative Immunology* : 20 : 299-306.
- Vargas-Albores, F., 1995. Sistema de defensa del camarón café (*Penaeus californiensis*). *Ciencia*. 46: 33-45.
- Vargas-Albores, F., Guzmán-Murillo, A, and Ochoa, J. L., 1993. An anticoagulant solution for haemolymph collection and prophenoloxidase studies of shrimp (*Penaeus californiensis*). *Comp. Biochem. Physiol.* 106: 299-303.
- Vega- Villasante, F., Nolasco-Soria, H., Civera-Cerecedo, R., Gonzales-Valdés., R., 2000. Alternativa para la alimentación del camarón en el cultivo: el manejo de muda. *Avances en nutrición acuícola* V. 313-320.
- Verlhae, V., Gabaudan, J., Obanch, A., Schuep, W y Hole., R. 1995. Influence of dietary glucan and vitamin C on non-specific-immune responses of rainbow. out (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*: 143 (1-2): 123-133.
- Wang, C. H., Lo, C. F., Leu, J. H., Chou, C. M., Yeh, P. Y., Chou, H. Y., Tung, M. C. Chang, C. F., Su, M. S, and Kuo, G. H., 1995. Purification and genomic analysis of baculovirus associated whit white- spot syndrome (WSBV) of *Penaeus monodon*. *Dis. Aquat. Org.* 23: 239-242.
- Wheatly M.G. and M.K. Hart., 1994. Hemolymph ecdysome and electrolytes during the molting cycle of crayfish: A comparison of natural molts with those induced by eyestalk removal or multiple limb Autotomy. *Depart. of Zool. University of Florida, Gainesville, Florida*, pp. 3261-8525.
- White ,K. N, and Ratcliffe, N. A., 1982The segregation and elimination of radi-and fluorescent - labelled marine bacteria from the haemolymph of the shore crab, *Carcinus maena*. *J. Mar Biol. Ass. U. K.*, 62: 819.
- Wongteerasupaya, C., Vickers, J. E., Sriurairatana, S., Nash, G. L., Akarajamaron, A., Boonsaeng V., Panyim, S, Tassanakajon, A., Withyachumnarnkul, B, and Flegel T. W., 1995. Anon- occluded, systemic baculovirus that occurs in cells of

ectodermal and mesodermal origin and causes high mortality in the blank tiger prawn *Penaeus monodon* . Dis. Aquat. Org. 21: 69-77.

Yuan, W., 1999. Bioseguridad y métodos de recambio de agua relacionado al virus de la mancha blanca (WSSV). Panorama acuícola; 5 (4):32-35.

Zar, J. H. 1999. Biostatistical Analysis Fourth Edition.