

Rol de los canales secretores de las glándulas tegumentales (GT) del camarón en la epidemiología de WSSV

Jenny Rodríguez, Ph. D. & Biol.
Fabricio Echeverría
Laboratorio de Inmunología
Fundación CENAIME-ESPOL

El virus de la mancha blanca (WSSV) ingresa en el hospedero a través de distintos portales. La literatura señala que los primeros tejidos en infectarse son los epitelios de la glándula antenal y las branquias. Utilizando un anticuerpo específico de WSSV hemos detectado señal para este patógeno en glándulas tegumentales (GT) en animales con o sin lesiones de mancha blanca (WSD) (Figura 1) (Rodríguez, 2007; Maldonado et al., 2003). Las GT se encuentran ampliamente distribuidas en el tejido conectivo subepitelial y tanto este último como los epitelios son muy susceptibles al WSSV. Las GT, tienen carácter secretor, están comunicadas con el medio externo y están implicadas en múltiples funciones; tales como esclerotización de la cutícula, actividad fenoloxidasas, formación de la epicutícula, y osmorregulación (Horst and Freeman, 1993). En la región oral son muy abundantes en el labrum y el paragnatha (apéndices bucales), donde secretan el mucus necesario para aglutinar y lubricar el alimento (Horst and Freeman, 1993). Si las GT constituyen portales para el ingreso del WSSV y/u otros virus a los tejidos internos del animal, es fácil imaginar el alto riesgo de infección considerando su abundancia y amplia distribución. Un simple paragnatha puede contener hasta 1000 GT individuales (Horst and

Freeman, 1993). Para determinar si las GT se infectan, replican virus y/o lo acumulan en el mucus, se utilizó hibridación in situ (HIS) para WSSV. La HIS es una técnica confirmatoria, específica y muy sensible que detecta los ácidos nucleicos del patógeno. La presencia de ARN viral se consideró en este estudio como indicador de un activo proceso de infección celular y replicación viral.

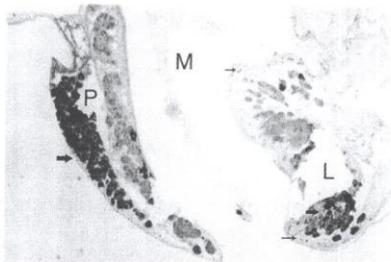


Figura 1. Región oral (boca) con señal positiva para WSSV por inmunohistoquímica. L, labrum. P, paragnatha, M, mandíbula. Células epiteliales positivas a WSSV (flechitas). Glándulas tegumentales positivas a WSSV (flechas grandes).

Materiales y métodos

Para la hibridación in situ, los cortes histológicos fueron desparafinados, tratados con proteinasa K, y fijados con parformadehído. Antes de aplicar la sonda los cortes fueron tratados con DNasa, a fin de degradar el ADN viral y detectar únicamente el ARN. Las sondas fueron sintetizadas mediante PCR para WSSV utilizando los iniciadores de Kimura, et al. (1996)

en presencia de digoxigenina DIG-dUTP (Roche). Luego de incubar toda la noche a 39°C, los cortes fueron tratados con concentraciones decrecientes de SSC (tampón a base de Clna y Citrato de Na) antes de proceder a la detección utilizando un anticuerpo antidigoxigenina. El revelado se realizó con substrato NBT-BCIP. Antes del montaje se tiñó los cortes con Bismark-Brown Y, cuyo color marrón contrasta con el violeta oscuro de la señal positiva para el WSSV (Figura 2). Solo las células que tienen ARN viral darán señal positiva con este protocolo.

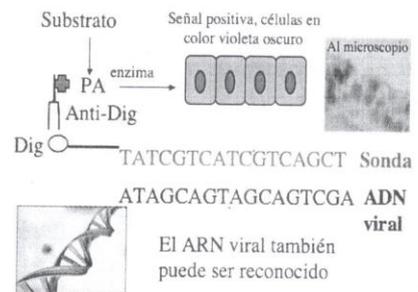


Figura 2. Principio de hibridación in situ (HIS). Esta técnica permite detectar y localizar a nivel de tejidos los agentes patógenos investigados. En este caso la sonda de WSSV, sintetizada por PCR, se hibrida con los ácidos nucleicos (ADN, ARN) virales. La sonda está marcada con digoxigenina (Dig), la cual es detectada luego con un anticuerpo específico (Anti-Dig) marcado a su vez con el enzima fosfatasa alcalina (PA). El enzima hace reaccionar a un substrato (NBT-BCIP) el cual tiñe de violeta obscuro

las células infectadas. A fin de facilitar la observación microscópica los cortes se tiñen con Bismark Brown. La técnica puede ser modificada realizando un tratamiento previo de los cortes con DNAsa, a fin de degradar el ADN, permitiendo que la sonda detecte únicamente el ARN.

Resultados y conclusiones

Los resultados de HIS de cortes tratados con DNAsa mostraron ausencia de señal para WSSV en las GT. La señal se mantuvo en epitelio y en células del tejido conectivo, estrechamente asociadas a las GT y en otros tejidos internos (Figura 3). La pérdida de señal en las GT indica que el virus no las infecta (no hay ARN). Desafortunadamente estos resultados señalan en cambio que el virus se acumula en este tejido. La presencia de señal en las GT más externas de los apéndices bucales (Figura 1) sugiere además que los camarones colectan el virus durante la búsqueda de alimento. Los canales secretores de las GT están recubiertos de una fina epicutícula, la cual es liberada con los exuvios. Los camarones que ingieren los exuvios contaminados tendrán fuertes probabilidades de ser infectados por el WSSV. En conclusión la epicutícula de los canales secretores de la GT constituyen una fuente de infección al capturar y concentrar WSSV desde el medio, en exuvios que serán luego ingeridos por otros animales atraídos por la muda.

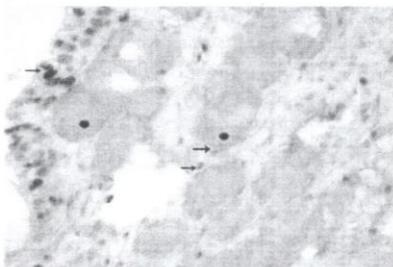


Figura 3. Corte histológico de la región oral. Reacción positiva para WSSV por hibridación in situ en células epiteliales y del tejido conectivo (flechas). Ausencia de señal en glándulas tegumentales (asteriscos).

Estos resultados no descartan además, que el WSSV u otros patógenos puedan utilizar las GT como portales de ingreso a los tejidos internos. Al menos dos observaciones sustentarían esta hipótesis.

- Sistema inmune en alerta: A) Hay muchos reportes sobre esferoides asociados a las GT. B) Ausencia de señal para WSSV en GT de animales que manifiestan alguna forma de resistencia al WSSV, natural o inducida por inmuno-estimulantes (Valladares, 2006), lo cual sugiere que moléculas antivirales podrían estar presentes entre las sustancias secretadas (esto debe investigarse en el futuro).
- Posibilidad de re-infección. Animales con lesiones severas de WSD presentan desorganización de los tejidos conectivo y glandular de la región oral, esto podría facilitar el ingreso del virus acumulado agudizando el riesgo de re-infección.

Referencias

- Horst M. and Freeman J. (1993), Crustacean Integument. Morphology and Biochemistry, capítulo 5:51:186.
- Kimura, T., K. Yamano, H., Nakano, K., Momoyama, Hiraoka, M. and Inouye, K., 1996. Detection of penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV) by PCR. Fish Pathology. 31(2), 93-98.
- Maldonado M. (2003). Respuesta inmunitaria en familias de Litopenaeus vannamei, bajo condiciones de infección con WSSV y el efecto de la adición de β -1,3 glucanos. Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar. Escuela Superior Politécnica del Litoral. Guayaquil - Ecuador. Tesis de maestría.
- Valladares A. (2006). Tratamientos basados en alta temperatura y β -1,3-glucanos para disminuir la prevalencia de la enfermedad de la mancha blanca (WSD) en postlarvas de Penaeus vannamei. Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar. Escuela Superior Politécnica del Litoral. Guayaquil - Ecuador. Tesis de maestría.



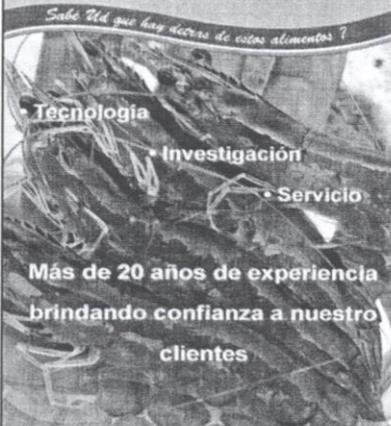
DIAMASA



PISCIS
SISTEMAS DE MANEJO PARA LA PISCICULTURA
GISIS



Sabe Ud. que hay acerca de estos alimentos?



Tecnología
Investigación
Servicio

Más de 20 años de experiencia
brindando confianza a nuestros
clientes

Con la responsabilidad de ser los líderes!



EXPALSA
EXPORTADORA DE ALIMENTOS S.A.

Km. 6.5 Vía Duran Tambo
Phone (593-4) 2809491
Fax: (593-4) 2802262
Mobile: (593-4) 322148
International Sales:
rafael_colka@expalsa.com
P.O. Box: 6646 - Ecuador
www.expalsa.com