



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE MANABÍ
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
ECUELA DE ACUICULTURA**

TEMA:

**PARÁMETROS INMUNITARIOS EN CAMARONES
JUVENILES *Litopenaeus vannamei*, EN PISCINAS
CAMARONERAS INFECTADAS CON WHITE SPOT
SYNDROME VIRUS (WSSV)**

REALIZADO EN:

El Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas
“EDGAR ARELLANO M” Fundación CENAIM-ESPOL

ELABORADO POR:

BELGICA MERCEDES MONTESDEOCA SALDARRIAGA

DIRIGIDO POR:

EULALIA IBARRA MAYORGA

BAHÍA - ECUADOR

2001

ABREVIATURAS

AB:	Actividad de Base
A A.n:	Actividad Antibacteriana en hemolinfa normal
A A.r:	Actividad Antibacteriana en hemolinfa rosada
ADN:	Ácido Desoxirribonucleico
AM:	Anómalos
ARN:	Ácido Ribonucleico
APS:	Ammonium persulfate
BSA:	Suero Albúmina Bovina
CaC:	Cacodilato de Sodio
CTAB:	Cetiltrimetilamonio bromuro
DMSO:	Dimethyl sulfoxide
ELISA:	Enzyme linked-immunosorbent assay
EM:	Estructura Membranosa
GR:	Granulosas
% HAM:	Porcentaje de Hemocitos Anómalos
% HAM.n:	Porcentaje de Hemocitos Anómalos en hemolinfa normal
% HAM.r:	Porcentaje de Hemocitos Anómalos en hemolinfa rosada
% H:	Porcentaje de Hialinas
% HH:	Porcentaje de Hemocitos Hialinos
% HH.n:	Porcentaje de Hemocitos Hialinos en hemolinfa normal
% HH.r:	Porcentaje de Hemocitos Hialinos en hemolinfa rosada
% HGR:	Porcentaje de Hemocitos Granulosos
% HGR.n:	Porcentaje de Hemocitos Granulosos en hemolinfa normal
% HGR.r:	Porcentaje de Hemocitos Granulosos en hemolinfa rosada
% HN:	Porcentaje de Hemocitos Normales

% HN.n:	Porcentaje de Hemocitos Normales en hemolinfa normal
% HN.r:	Porcentaje de Hemocitos Normales en hemolinfa rosada
% HSG:	Porcentaje de Hemocitos Semigranulosos
% HSG.n:	Porcentaje de Hemocitos Semigranulosos en hemolinfa normal
% HSG.r:	Porcentaje de Hemocitos Semigranulosos en hemolinfa rosada
kbp:	kilobases
kDa:	kilodaltones
LB:	Lauria Bertani
L-DOPA:	(L-3, 4-Dihydroxyphenyl - Alanine, 3mg/ml)
LDCL:	Quimioluminiscencia Luminol-dependiente
LOS:	Lymphoid Organ Spheroid
LPS:	Lipopolisacáridos
MT:	Marcador de Talla
MHBSS:	Solución Salina Modificada de Hank's
MET:	Microscopía Electrónica de Transmisión
mm:	milímetro
ml:	Mililitro
mM:	millimolar
MO:	Microscopía Óptica
M:	Molaridad
nm:	nanómetros
NP:	Núcleo Pienótico
NTH:	Número Total de Hemocitos
% NTH:	Porcentaje del Número Total de Hemocitos
% NTH.n:	Porcentaje del Número Total de Hemocitos en hemolinfa normal
% NTH.r:	Porcentaje del Número Total de Hemocitos en hemolinfa rosada
NBT:	Nitroblue Tetrazolium
n:	Grupo de animales con hemolinfa normal o azul
O₂n:	Anión Superóxido en hemolinfa normal
O₂r:	Anión Superóxido en hemolinfa rosada

P:	Picnosis
Ps:	Pseudópodos
PO.n:	Fenoloxidasa en hemolinfa normal
PO.r:	Fenoloxidasa en hemolinfa rosada
PCR.n:	Reacción de Polimerización en Cadena en hemolinfa normal
PCR.r:	Reacción de Polimerización en Cadena en hemolinfa rosada
proPO:	Profenoloxidasa
PMA:	Phorbol Myristate Acetate
ppA:	profenoloxidasa Activating protein
Pen:	Peneidinas
PL:	Postlarvas
PBS:	Tampón Fosfato Salino sin Ca ⁺⁺ y Mg ⁺⁺
Prot. P.n:	Proteínas Plasmáticas totales en hemolinfa normal
Prot. P.r:	Proteínas Plasmáticas totales en hemolinfa rosada
ROIs:	Radicales Intermediarios de Oxígenos tóxicos
r:	Grupo de animales de hemolinfa rosada
SDS-PAGE:	Sodium dodecyl sulfate-poliacrylamide gel electroforesis
SG:	Semigranulosas
TAE:	Tris acetato
TSV:	Taura Syndrome Virus
TEMED:	tetramethylethyl-enediamine
μL:	Microlitro
V:	Vacuolas
V/V:	Volúmen a Volúmen
WSSV:	White Spot Syndrome Virus
χ ² :	Chi-square

RESUMEN

Se estudiaron parámetros inmunitarios en camarones juveniles *Litopenaeus vannamei* infectados por el White Spot Síndrome Virus (WSSV). Se realizaron muestreos sucesivos a partir de la tercera semana de post-siembra (durante cuatro semanas, realizando 2 muestreos por semana 20 camarones / muestreo, con un peso de 0,9 a 3,0 gr). Se realizaron análisis individuales con la técnica de (PCR) para WSSV y hemogramas. Para los ensayos inmunitarios como: actividad antibacteriana (AA); actividad fenoloxidasa (PO); detección del anión superóxido (O_2^-); cuantificación de proteínas en el plasma, electroforesis de proteínas plasmáticas e inmunofluorescencia contra WSSV en hemocitos, se utilizó mezclas de hemolinfa de todos los animales muestreados. Además se registró individualmente talla, peso, color de la hemolinfa y estadio de muda de los animales y se tomaron muestras de hemocitos para microscopía electrónica de transmisión (MET). Se analizaron los datos mediante correlaciones de variables múltiples y Chi-square (χ^2).

La infección por WSSV estimuló la generación de las tres poblaciones hemocitarias, lo que sugiere que el camarón tiene la capacidad de reconocer como no propio a este virus. Los hemocitos hialinos y el superóxido mantuvieron una relación inversa con el grado de infección con WSSV. La carga viral estuvo correlacionada directamente con la presencia de hemocitos anómalos, los mismos que serían generados por las subpoblaciones de hemocitos granulosos y hemocitos hialinos. La microscopía electrónica reveló que los hemocitos anómalos serían hemocitos activados, fagocitadores o en apoptosis (pienóticos). No se observó replicación viral en los hemocitos, sugiriendo que las anomalías son producto de la activación o del desgaste celular en el proceso de defensa.

Se encontró una relación directa y significativa entre el porcentaje de hemocitos anómalos y el color rosado de la hemolinfa que es provocado por la melanización del plasma, y se observa en los animales de mayor nivel de infección. Lo anterior sugiere que si las células desgastadas se incrementan en la circulación, estas terminarían liberando su contenido en

la hemolinfa, como en el caso de el sistema pro-Fenoloxidasa. El porcentaje de hemocitos anómalos se mantuvo bajo cuando no decreció el número de hemocitos semigranulosos, lo que podría indicar que estos son los encargados de mantener el equilibrio en la hemolinfa.

Las características de animales negativos para WSSV y de apariencia saludable incluyen: 1). incremento constante de hemocitos semigranulos relacionado al incremento de la actividad antibacteriana del plasma (manteniendo los hemocitos anómalos en bajo porcentaje), 2). alta concentración de hemocitos hialinos y 3). alta producción de anión superóxido. Estos dos últimos parámetros (2 y 3) se incrementan en temprana premuda (D1 y D2), lo que podría explicar el elevado número de animales negativos en este estadio. Los casos más severos se encontraron en D1 y D2, sugiriendo que los animales que no logran eliminar el virus desarrollan la viremia conforme avanza la muda. Por otra parte se encontraron muchos animales positivos en intermuda, en asociación probable con el canibalismo en este estadio de mayor ingestión de alimento.

INDICE GENERAL

ABREVIATURAS	1
RESUMEN	4
INDICE GENERAL	6
INDICE DE FIGURAS	11
INDICE DE TABLAS	13
INTRODUCCIÓN	14
ANTECEDENTES	16
2. 1. EL SÍNDROME DE LA MANCHA BLANCA (WSSV)	16
2. 1. 1. LA ENFERMEDAD	16
2. 1. 2. EL VIRUS CAUSANTE DE LA MANCHA BLANCA (WSSV)	17
2. 2. SISTEMA INMUNE	18
2. 2. 1. LA CUTÍCULA COMO PRIMERA BARRERA DE DEFENSA DE LOS CRUSTÁCEOS	20
2. 2. 2. LOS HEMOCITOS EFECTORES DE LA RESPUESTA INMUNE EN LOS CRUSTÁCEOS	21
* <i>Hemocitos Granulosos</i>	
* <i>Hemocitos Semigranulosos</i>	
* <i>Hemocitos Hialinos</i>	
* <i>El Hemograma</i>	
Defensas Celulares	24
* <i>La Fagocitosis</i>	
* <i>Formación de Nódulos</i>	
* <i>La Encapsulación</i>	
* <i>La Cicatrización</i>	

2. 2. 3. HEMATOPOYESIS	27
2. 2. 4. MECANISMOS INMUNITARIOS RELACIONADOS A LA LIBERACIÓN DE COMPUESTOS CELULARES	27
Sistemas Multiméricos	27
* <i>Sistema de coagulación</i>	
* <i>Sistema Profenoloxidasa</i>	
Mecanismos Humorales	30
2. 2. 5. OTROS EFECTORES DE LA RESPUESTA INMUNE	31
Fagocitos Fijos	31
Órgano Linfoide	32
2. 2. 6. CICLO DE MUDA DEL CAMARÓN	33
3. MATERIALES Y MÉTODOS	36
3. 1. PREPARACIÓN DEL MATERIAL BIOLÓGICO	36
3. 1. 1. Preparación de las muestras para Técnicas Immunitarias	37
* <i>Alicuota 1</i>	
* <i>Alicuota 2</i>	
* <i>Alicuota 3</i>	
3. 1. 2. Preparación de muestras para otras Técnicas Immunitarias	38
* <i>Frotis Teñidos de Hemocitos</i>	
* <i>Microscopía Electrónica de Transmisión</i>	
Técnica de Biología Molecular	38
* <i>PCR (Reacción de Polimerización en Cadena)</i>	
Estadios de Muda	38
3. 2. PROTOCOLOS	38
3. 2. 1. Técnicas Immunitarias	38
Hemogramas	38
Cuantificación del Anión Superóxido O ₂ ⁻	39
<i>Protocolo para la cuantificación del anión superóxido</i>	
Cuantificación de la Actividad Fenoloxidasa (PO)	41

<i>Protocolo para la cuantificación de la actividad fenoloxidasa</i>	
Cuantificación de la Actividad Antibacteriana	42
<i>Protocolo para la cuantificación de la actividad antibacteriana</i>	
3. 2. 2. Técnicas de Bioquímica	44
Concentración de Proteínas Plasmáticas Totales	44
<i>Protocolo de Concentración de Proteínas Plasmáticas Totales</i>	
Electroforesis de Proteínas (SDS-PAGE)	45
* <i>Preparación de la muestra</i>	
* <i>Preparación de los geles</i>	
* <i>Electroforesis</i>	
* <i>Coloración al Azul de Coomasie</i>	
3. 2. 3. Hemocitos en Microscopía Óptica y Microscopía Electrónica	
Preparación de cortes de hemocitos	46
<i>Protocolo para Frotis de Hemolinfa</i>	
Inmunodosificaciónes	46
<i>Protocolo para inmunofluorescencia</i>	
Microscopía Electrónica de Transmisión	47
<i>Protocolo para Microscopía Electrónica</i>	
* <i>Fijación</i>	
* <i>Deshidratación</i>	
* <i>Impregnación</i>	
* <i>Cortes y Teñidos</i>	
3. 2. 4. Técnica de Biología Molecular	49
<i>Protocolo para la Preparación y Extracción de ADN para PCR</i>	
* <i>Extracción del ADN genómico</i>	
* <i>Técnica de Reacción de Polimerización en Cadena de doble paso (PCR)</i>	
* <i>Electroforesis</i>	

3. 3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	50
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	52
4. 1. ANOMALÍAS EN LOS HEMOCITOS DE CAMARONES AFECTADOS POR WSSV	53
4. 1. 1. Microscopía Óptica	54
4. 1. 2. Microscopía Electrónica	56
4. 2. MUESTREOS EN LA CAMARONERA EXPORFRUTO DURANTE EL EPISODIO DE INFECCIÓN CON WSSV	58
4. 2. 1. Muestreo de población de la piscina 42 de Exporfruto	58
4. 2. 2. Análisis de WSSV en los animales muestreados mediante PCR	59
4. 2. 3. Hemograma versus infección por WSSV	61
Hemograma en animales de hemolinfa azul (bajo nivel de infección)	61
Hemograma en animales de hemolinfa rosada (alto nivel de infección)	66
Comparación de la fórmula hemocitaria entre los dos grupos de animales	68
4. 2. 4. Otros parámetros inmunitarios	69
* Anión superóxido	
* Actividad PO	
* Actividad Antibacteriana	
* Concentración de proteínas plasmáticas	
4. 2. 5. Ciclo de Muda en relación a parámetros inmunitarios y grado de infección con WSSV	72
4. 2. 6. Perfil Electroforético de Proteínas Plasmáticas	74

CONCLUSIONES	78
RECOMENDACIONES	80
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81
ANEXOS	93

INDICE DE FIGURAS

Fig 1.	Rol de los hemocitos en la defensa del camarón	24
Fig 2.	Camarón <i>Litopenaeus vannamei</i>	36
Fig 3.	Extracción de la hemolinfa	37
Fig 4.	Hemocitos observados en Microscopio Contraste de Fase	39
Fig 5.	Cuantificación del Anión Superóxido	41
Fig 6.	Cuantificación de la Actividad PO	42
Fig 7.	Cuantificación de la Actividad Antibacteriana	43
Fig 8.	Hemocitos normales observados en Contraste de Fase (A y B) Frotis Teñidos (C y D)	52
Fig 9.	Hemocitos anómalos observados en Contraste de Fase (A, B y C) Frotis Teñidos (D, G y F)	53
Fig 10.	Hemocitos normales observados en Microscopio Electrónico	54
Fig 11.	Hemocitos anómalos observados en Microscopio Electrónico	55
Fig 12.	Hemocitos observados en Inmunofluorescencia	55
Fig 13.	Población y supervivencia en la piscina de "Exporfruto" Movimiento Poblacional (A), Supervivencia (B)	56
Fig 14.	Nivel de infección durante el período de muestreo	56
Fig 15.	División de la población de animales en los muestreos	57
Fig 16.	Infección durante los muestreos en los dos grupos de camarones animales de bajo nivel de infección (A), Alto nivel de infección (B)	57
Fig 17.	Comportamiento hemocitario y prevalencia de WSSV, en animales de bajo nivel de infección	58
Fig 18.	Población hemocitaria frente a la infección viral	63
Fig 19.	Comportamiento hemocitario y prevalencia de WSSV, en animales de alto nivel de infección	64
Fig 20.	Población hemocitaria frente a la infección viral	64
Fig 21.	Comportamiento de las subpoblaciones hemocitarias frente a la infección viral en los animales de hemolinfa azul y rosada	65
Fig 22.	Respuesta celular oxidativa en la población de animales de hemolinfa	

	azul y rosada frente al nivel de infección por el WSSV	66
Fig 23.	Actividad PO en hemocitos GR en poblaciones de hemolinfa normal	67
Fig 24.	La AA en los hemocitos SG durante los muestreos	68
Fig 25.	Concentración de Prot. en la población hemocitaria durante los muestreos	68
Fig 26.	Relación de Concentración de Prot. Plasmáticas con la generación de O ₂ ⁻	69
Fig 27.	Porcentaje de animales en los diferentes estadios de muda	70
Fig 28.	Perfil de Proteina Plasmática de animales infectados por WSSV	71
Fig 29.	Activación celular en el camarón <i>L. vannamei</i>	74
Fig 30.	Infección por canibalismo en un estanque	75

INDICE DE TABLAS

Tabla 1 A.	Correlación de todos los muestreos en animales de baja carga viral	59
Tabla 1 B.	Correlación de picos de infección durante los muestreos, en animales de baja carga viral	60
Tabla 2 A.	Correlación de todos los muestreos en animales de alta carga viral	61
Tabla 2 B.	Correlación de picos de infección durante los muestreos, en animales de alta carga viral	62
Tabla 3.	Nivel de infección por PCR en los estadios de muda	70

INTRODUCCIÓN

La acuicultura ha sido un instrumento efectivo para acelerar el desarrollo de las áreas costeras de muchos países. El Ecuador tiene una área costera de 2.614 Km y ha sido el primer país productor de camarón en el mundo desde 1991. El desarrollo de la camaronicultura ha estado ligado a progresos zootécnicos, y ha sido el tercer "commodity" de exportación más importante luego del petróleo y el banano.

El impacto de brotes epidémicos en el cultivo de camarón se ha traducido en pérdidas económicas debido a la proliferación de enfermedades que han afectado esta industria.

La aparición de una enfermedad está relacionada con el rompimiento del equilibrio entre el huésped y su medio y la estrategia invasora utilizada por el patógeno agresor. En los animales acuáticos la situación se complica a favor del agresor ya que el agua constituye una vía de diseminación del patógeno.

La presencia del Virus del Síndrome de la Mancha Blanca (WSSV) en Latinoamérica fue reportado por primera vez a inicios del año 1999 en Honduras y recibió una atención considerable por parte del sector científico del país (Rev. Mundo Ac. Vol. 6).

Sin duda uno de los aspectos que más preocupa a los maricultores, siendo a la par una de las características más importante en esta enfermedad, es el gran poder de diseminación del virus, las múltiples vías de infección y el amplio espectro de huésped, tanto silvestres como cultivados que pueden albergar al virus y actuar como reservorios (Wang, et al., 1997).

Como para cualquier enfermedad vírica no existe tratamiento, tampoco existen vacunas, ya que el sistema inmune del camarón no está capacitado para dar esa respuesta. Los antibióticos no tienen efecto contra los virus, estos pueden tratar las infecciones bacterianas que podrían presentarse como consecuencia de una infección vírica, pero la enfermedad vírica seguirá presente. La única forma de evitar o amortiguar el impacto de

la enfermedad de la mancha Blanca o cualquier otra enfermedad vírica es la prevención (Alday V., 1999).

El objetivo básico de este estudio fue incrementar los conocimientos sobre la respuesta inmune en camarones juveniles *Litopenaeus vannamei*, infectados por el WSSV en piscinas camaroneras. Determinar además si las modificaciones en los hemocitos se relacionan al grado de infección de los mismos o a la exocitosis de moléculas celulares, y si el ciclo de muda influye sobre las modificaciones observadas en la hemolinfa de animales portadores de WSSV.

Esta información podría ser utilizada en el manejo de la viremia en las piscinas camaroneras.

2. ANTECEDENTES

2. 1. EL SÍNDROME DE LA MANCHA BLANCA (WSSV)

2. 1. 1. LA ENFERMEDAD

El síndrome de la mancha blanca es una enfermedad viral mortal para los cultivos de camarones marinos comerciales, pudiendo causar el 100% de mortalidad en los cultivos. Se originó en el Continente Asiático (Takahashi., *et al.*, 1994; Chou., *et al.*, 1995; Wongteerasupaya., *et al.*, 1995; Lightner., 1996; Lo., *et al.*, 1996a,b; Flegel., 1997).

Los signos externos típicos que presenta esta enfermedad viral incluyen manchas blancas de 0,5 mm a 2 mm de diámetro en el exoesqueleto y epidermis, disminución rápida del consumo de alimento y nado errático alrededor de la piscina. (Wang., *et al.*, 1995; Lightner., 1996). Bajo el microscopio de luz, se puede observar que las manchas tienen un área obscura en el centro. La coloración corporal de los camarones infectados se torna pálida rosa o café-rojiza. Los primeros cambios histopatológicos de la mancha blanca son la hipertrofia nuclear en las células infectadas en los tejidos de origen mesodermal y ectodermal (Momoyama., *et al.*, 1994).

Además de su alta virulencia, la mancha blanca se caracteriza por ser poco específica en cuanto a la capacidad de invadir y de dañar diversos tejidos (Chang., *et al.*, 1996). Mediante técnicas de histopatología, se han encontrado evidencias de infección y destrucción celular en: tejido conectivo, glándula antenal, branquias, tejido nervioso y ectodermis. Se ha reportado además infecciones en los tejidos del sistema inmune, hemocitos, tejido hematopoyético y órgano linfoide (Chang *et al.*, 1996). Durante la fase de la viremia de la infección, el virus está presente en todos los órganos del camarón. Para examinar los sitios de replicación viral en el camarón *Penaeus monodon* se han utilizado diferentes partes de órganos y tejidos (Lo *et al.*, 1997a) usando como herramienta de diagnóstico microscopía óptica y microscopía electrónica de transmisión (MET), para observaciones histológicas de núcleos infectados.

En *P. monodon* se han observado que infecciones de baja intensidad con WSSV (detectado sólo por PCR anidado) puede mantenerse por largos períodos sin provocar la

muerte de los camarones (Tsai., *et al.*, 1999). Observaciones similares han sido hechas en el CENAIM, donde se ha mantenido por varios meses progenitores y juveniles de apariencia saludable, con un bajo grado de infección (datos no publicados). La situación es diferente cuando el ingreso de partículas virales es masivo.

En el medio natural la baja concentración de partículas virales no permitiría una infección masiva del camarón y el sistema inmune de animales en buena salud podría mantener bajo el nivel de infección.

2. 1. 2 EL VIRUS CAUSANTE DE LA MANCHA BLANCA (WSSV)

Estudios ultra estructurales en microscopía electrónica revelan viriones alargados de forma ovoidea con una envoltura alrededor de la nucleocápsula suelta que los rodea (Takahashi., et al., 1994; Inouye., et al., 1994). El virión mide un promedio de 80 nm de diámetro y 350 nm de largo (Huang, C., *et al.*, 2001). El WSSV posee moléculas de ADN de doble cadena de aproximadamente 300 kilo bases (kbp), es un virus baciliforme, no oculto con estructura en forma de cola (Zhang, X., Xu, X., Hew, C.L., 2001). El WSSV fue clasificado previamente como miembro de la subfamilia de los *Baculoviridae*. (Inouye et al., 1996; Murphy., et al., 1995). Sin embargo Van Hulten., et al., (2000), indicaron en estudios realizados de tres proteínas estructurales del virus, que estas distan de ser homólogas a las proteínas estructurales de otros virus. Esta característica única ayuda a sustentar la idea de que el WSSV puede representar un nuevo género de virus (*Whispovirus*) o quizás una nueva familia (*Whispoviridae*).

El virus de la mancha blanca tiene un amplio rango de hospederos en especie tanto cultivadas como silvestres entre las que se encuentran: *P. monodon*, *Marsupenaeus japonicus*, *Femneropeneus penicillatus* (Alcock., 1905), *Macrobranchium rosembergii*, *Calappa philarigus*, *Charybdis feriatus*, *Helice tridens*, *Portunus pelagicus*, *Portunus sanguinolentus*, y *Scylla serrata* (Chang., *et al.*, 1996; Kanchanaphum., *et al.*, 1998; Peng., *et al.*, 1998; Supamattaya., *et al.*, 1998; Chen., *et al.*, 2000). Igualmente diferentes

especies de copépodos, cangrejos, camarones no cultivados y larvas de insectos de la familia *Ephydidae*, constituyen reservorios del virus de la mancha blanca (Lo, *et al.*, 1996b).

Kasornchandra & Boonyaratpalin, (1998) usaron cultivos primarios de camarón *P. monodon* para estudiar la propagación de WSSV en tejidos y órganos específicos, y para la determinación de la virulencia relativa del WSSV en varias especies de crustáceos. Sin embargo, aunque numerosos intentos fueron realizados en crustáceos, aún no se ha establecido ninguna línea celular continua.

Por otra parte la literatura indicaría que el WSSV agrede al sistema inmune, hibridación *in situ* en hemocitos de camarones infectados por el WSSV mostraron que hemocitos fijos y circulantes presentaron reacción positiva al virus (Durand, S., *et al.*, 1996). Además en animales infectados el número total de hemocitos decrece y el porcentaje total de hemocitos hialinos es 5 veces superior a lo normal (Rodríguez, J., 2000). Los desarreglos del sistema inmune de los camarones infectados por el WSSV, son ilustrados por uno de los síntomas visibles de la enfermedad; animales en etapas terminales de infección presentan una coloración rosada-café claro, la hemolinfa de estos camarones tienen esta misma coloración, en lugar del típico color azul verdoso, dado por la hemocianina (Rodríguez, J., 2000).

2. 2. SISTEMA INMUNE

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, moléculas y células efectoras, sistemas amplificadores y reguladores. Los mismos que podrán estar englobados en factores humorales, factores celulares y sistemas multiméricos que involucran a ambos tipos de factores (Albores, F. & Plascencia, G. 1999).

Los crustáceos y todos los artrópodos en general no poseen un sistema inmunitario adaptativo, basado en la especificidad y en la memoria, sin embargo son capaces de reaccionar contra los patógenos por medio de mecanismos inmunitarios, celulares y humorales que operan para mantener la integridad del organismo (Söderhäll & Cerenius., 1992). Este sistema inmune carece de la complementariedad antígeno-anticuerpo característica de los vertebrados, pero puede reaccionar efectivamente para destruir los microbios invasores y agentes parasíticos (Christensen & Nappy., 1988).

En los crustáceos como en otros invertebrados casi la totalidad de sus mecanismos de defensa dependen de mecanismos no específicos como son; fagocitosis, encapsulación, formación de nódulos, coagulación, la producción de melanina por el sistema profenoloxidasa (proPO) (Smith & Söderhäll., 1986), aglutinación de bacterias y actividad antibacteriana.

La respuesta inmune en los artrópodos se presenta en dos fases. La inmediata no inducible está asociada a los efectores celulares (hemocitos), los cuales son elementos cruciales en reacciones como; fagocitosis, eventos de nodulación y encapsulación, además catalizan el proceso de coagulación y almacenan los enzimas de la cascada proPO (responsable de la melanización). Es ampliamente reconocido que las reacciones celulares en invertebrados están en su mayoría acompañadas por melanización. El enzima clave en la síntesis del pigmento melanina es el fenoloxidasa, el cual está presente en la sangre de los artrópodos (hemolinfa) como un proenzima inactivo, el proPO. Este proenzima es activado por componentes de las paredes celulares microbianas como los β -1, 3-glucanos de hongos, los lipopolisacáridos (LPS) de bacterias Gram negativas o los peptidoglicanos de bacterias Gram positivas (Johansson & Söderhäll., 1989).

2. 2. 1. LA CUTÍCULA COMO PRIMERA BARRERA DE DEFENSA DE LOS CRUSTÁCEOS

Al igual que en los vertebrados, los invertebrados poseen como primera línea de defensa barreras físico-químicas muy eficaces. El moco que cubre el cuerpo de muchos celentéreos, anélidos, moluscos y algunos tunicados, captura y destruye a los posibles patógenos. Algunos celentéreos, moluscos, equinodermos y artrópodos poseen sólidos exoesqueletos, como caparazones o conchas, que les protegen frente a la invasión. Cuando consiguen superar estas barreras, los invasores son expuestos a una serie de reacciones de defensas celulares y humorales (antes descritas) (Humphreys, T. & Reinherz, EL. 1994, *fide Brostoff, et al.*, 1997).

En los crustáceos, la cutícula es usualmente considerada como una formidable barrera física, es capaz de impedir el ingreso al interior del cuerpo de parásitos y otros patógenos, que ingresarían a través de las heridas o durante la muda (Söderhäll & Cerenius., 1992). La cutícula por su actividad bioquímica está considerada además como un factor de defensa inmunitario contra invasores (Ashida & Brey., 1995). El enzima responsable de la esclerotización (endurecimiento y teñido de la cutícula en los artrópodos) es el PO, el mismo enzima responsable de la melanización de microorganismos invasores (Ashida & Brey., 1995).

La cutícula matriz de los artrópodos es secretada por la epidermis subyacente. Está constituida por una capa externa flexible cérea compuesta de lipoproteínas y una capa media endurecida, por infiltraciones de sales de calcio y de quitina, la misma que es un polímero formado por monosacáridos repetidos

En el momento de la muda el animal secreta un enzima que disuelve la capa interna del exoesqueleto, y forma un nuevo esqueleto, aún no endurecido, por debajo del viejo (Barnes & Curtis., 1993).

Además la cutícula cumple las siguientes funciones:

- Previene la deshidratación.
- Es impenetrable al agua.

- Reviste los músculos y órganos vitales.
- Participa en el intercambio gaseoso.
- Induce además, al crecimiento del organismo.

2. 2. 2. LOS HEMOCITOS EFECTORES DE LA RESPUESTA INMUNE EN LOS CRUSTÁCEOS

Los decápodos poseen un sistema circulatorio abierto, a través del cual son distribuidos nutrientes, oxígeno, hormonas y células que viajan a través de la hemolinfa. Los hemocitos (células circulantes) no son considerados equivalentes a los eritrocitos de los vertebrados, ya que estos no contienen el pigmento respiratorio (hemocianina), sin embargo pueden ser funcionalmente análogos a los leucocitos de los vertebrados que se encuentran involucrados principalmente en el reconocimiento y en la eliminación del material extraño (Martin & Hose., 1992; Vásquez., *et al.*, 1997a).

Los hemocitos son la base de la respuesta inmune de los crustáceos, responsables de eliminar microorganismos invasores, sintetizar y almacenar varias moléculas de acción microbicida que incluyen péptidos antimicrobianos y los componentes del sistema enzimático (proPO), el mismo que es liberado de los hemocitos en los sitios de infección (Söderhäll., *et al.*, 1996).

Tres tipos de hemocitos circulantes pueden ser aislados de la hemolinfa de crustáceos y pueden ser separados en subpoblaciones por centrifugación en gradiente de Percoll en presencia de anticoagulante. Los tres tipos de hemocitos pueden ser diferenciados por criterios morfológicos, ultraestructurales (microscopía electrónica), funcionales, antigénicos (mediante anticuerpos monoclonales), e histoquímicos con diferentes técnicas de tinción para células (Bachère., *et al.*, 1995a; Bachère., *et al.*, 1995b; Söderhäll & Cerenius., 1992).

Cada tipo de hemocito cumple funciones determinadas como parte de los mecanismos de inmunidad celular. Al igual que en otros crustáceos, en el camarón se han detectado al

menos tres tipos de células circulantes: los hemocitos hialinos, los hemocitos de gránulos pequeños (semigranulosos) y los hemocitos de gránulos grandes (granulosos).

Hemocitos Granulosos

Se caracterizan por ser células grandes, poseen grandes gránulos, núcleo pequeño y excéntrico, inclusiones citoplasmáticas así como un retículo endoplasmático liso y ribosomas libres en el citoplasma. Estos hemocitos almacenan los enzimas que constituyen el sistema proPO en los crustáceos (Söderhäll & Smith, 1983). En peneidos los hemocitos granulosos constituyen el 20-30% de las células circulantes (Albores F. & Plascencia G., 1999).

Hemocitos Semigranulosos

Poseen un núcleo esférico o en forma de herradura y muchos gránulos pequeños de forma redondeada. Estos hemocitos se encuentran asociados a procesos de activación del sistema proPO en crayfish, además cumplen funciones de fagocitosis, encapsulación y nodulación (Johansson & Söderhäll, 1989; Söderhäll & Cerenius, 1992). En peneidos ellos son los más abundantes en la hemolinfa y según Albores F. & Plascencia, G. (1999) tendrían analogía con los leucocitos polimorfonucleares de los vertebrados.

Hemocitos Hialinos

No son refringentes. Presentan un núcleo central redondeado, con ausencia de gránulos densos o en muy poco número, son células pequeñas que se adhieren y extienden fácilmente. En el cangrejo de río estarían implicados en procesos de fagocitosis (Johansson & Söderhäll, 1989). En los peneidos se encontrarían involucrados en el proceso de coagulación (Omori, 1989) y fagocitosis (Muñoz, com. personal).

El hemograma

Este permite determinar, número proporción y formas de los diferentes grupos de células sanguíneas. En el ser humano la elaboración de un hemograma constituye el primer paso para la evaluación médica de la salud.

En los crustáceos los hemogramas pueden realizarse con técnicas que van desde la fijación de diferentes colorantes, eg: hematoxilina-eosina (Tsing, 1989), hasta técnicas muy sofisticadas como citometria de flujo.

La citometria de flujo es un método en el cual, la medición cuantitativa de multiparametros sobre un gran número de células individuales puede ser hecho sin la necesidad de hacer un "pool" de células de diferentes individuos. Además, permite clasificar un gran número de células en un corto tiempo y la automatización evita mucho la subjetividad inherente en microscopia óptica. La citometria de flujo ha sido utilizada para analizar la cinética de los hemocitos a través del ciclo de muda del camarón *M. japonicus* (Sequeira, et al., 1995).

En el camarón *P. vannamei* se ha ensayado con éxito la técnica de la microscopia óptica con contraste de fases para clasificar los hemocitos. Esta técnica presenta la ventaja de ser rápida, sencilla y de no requerir ningún tratamiento especial para las células (Muñoz, 1996), como las tinciones.

Defensas Celulares

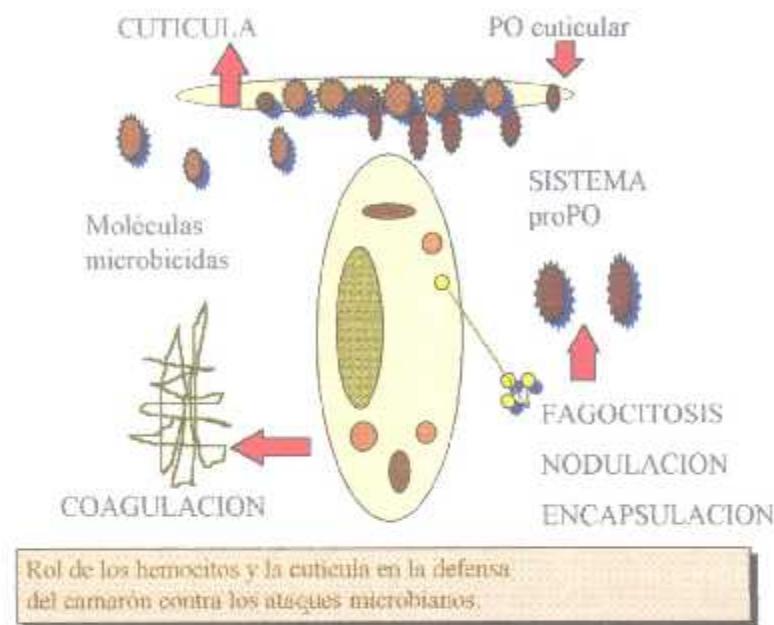


Figura 1. Rol de los hemocitos en la defensa del camarón, contra agentes microbianos

Los mecanismos celulares de defensa implican directamente a los hemocitos y generalmente están relacionados con la respuesta inmune inmediata no inducible que se desencadena luego de que el animal ha sufrido alguna agresión por parte del patógeno o una herida (Johansson & Söderhäll, 1989).

La Fagocitosis

Es un proceso realizado por células especializadas y constituye un evento de la respuesta inmunitaria particularmente estudiada en los invertebrados. Esta contribuye a la eliminación directa de partículas extrañas como bacterias, esporas, o células envejecidas del propio organismo. Todos los invertebrados poseen células fagocíticas que ingieren a los microbios invasores. Ellas en colaboración con los factores humorales, constituyen la primera línea de defensa frente a los microorganismos. La fagocitosis se puede producir en ausencia de factores opsonizantes, como ocurre también en los vertebrados. Sin

embargo, en los moluscos, los artrópodos y los tunicados la fagocitosis es estimulada por lectinas plasmáticas y por los componentes de la cascada de la proPO (Humphreys, T. & Reinherz, EL, 1994).

Todos los fagocitos sanguíneos contienen gránulos ricos en enzimas lisozomiales, los cuales se degranulan en el fagosoma durante la fagocitosis. Además estas células son capaces de entrar en un estado metabólico activo conocido como el "choque respiratorio u oxidativo" (Pipe, 1992), el mismo que se caracteriza por el incremento de la actividad metabólica de los fagocitos y la generación de Radicales Intermediarios de Oxígeno (ROIs), como respuesta a estímulos provocados por partículas foráneas (Klein, 1982).

La activación del choque respiratorio puede ser iniciada por procesos fisiológicos incluyendo fagocitosis de partículas como bacterias, zimosan o por agentes solubles como el phorbol myristate acetate (PMA) (Pipe, 1992).

Varios ensayos han sido realizados para la detección de Los ROIs. Estos ensayos han sido usados para medir respuestas immunotoxicológicas y reacciones parásito-huésped. Entre los métodos más conocidos para cuantificar ROIs están los basados en la reducción del Nitroblue Tetrazolium (NBT) para la detección del O_2^- y la quimioluminiscencia luminol dependiente (LDCL) (Anderson, 1994).

Formación de Nódulos

Cuando las partículas extrañas o patógenos invasores son numerosos o más grandes que los hemocitos, estos son confinados en agregados pluricelulares denominados nódulos o cápsulas, parecidos a los granulomas de los mamíferos. Los nódulos son agregados multicelulares de hemocitos capaces de reducir un número importante de bacterias. Cuando las masas bacterianas se forman en el hemocele aglutinadas por lectinas, los hemocitos los rodean para formar nódulos melanizados. Los nódulos son pequeñas cápsulas desde las cuales ciertos hemocitos se desprenden por si mismos y se infiltran en la masa de bacterias intentando fagocitarlas. La formación de nódulos representa un híbrido de encapsulación y reacciones fagocíticas (Amirante, 1986).

Se cree que los organismos capturados son destruidos mediante melanización, enzimas lisozomiales y el lisozima, así como el peroxidasa y los compuestos reactivos de oxígeno (detectados en varios anélidos, moluscos y artrópodos) (Humphreys T. & Reinherz EL, 1994).

La Encapsulación

Cuando una partícula es demasiado grande para ser fagocitada, muchos hemocitos la cubren, formando capas alrededor de ella (Söderhäll y Cerenius, rev. 1992). La muerte de los organismos encapsulados probablemente sea provocada por asfixia, por su conversión a desechos o por la acción tóxica de los quinones, precursores de melaninas (Salt, 1963; Nappi, 1977; Poinar *et al.*, 1979). La encapsulación sería realizada en el crayfish *P. leniusculus* y el camarón *S. ingensis* por las células granulosas y semigranulosas.

Se ha observado que la encapsulación en los mosquitos y en caracoles pulmonados confina eficazmente a los parásitos, y tal vez los destruyen.

La Cicatrización

La observación del fenómeno de cicatrización fue realizada en camarones *M. japonicus* (Tsing, 1987). Un examen histológico además de la presencia de melanina, reveló imágenes clásicas de coagulación con una importante aglutinación de hemocitos, que conducen a la formación de un tapón cicatrizable que obstruye la herida. Los hemocitos circulantes aumentan continuamente este coágulo. A demás de los tres tipos de hemocitos implicados en este proceso, los hemocitos de gránulos grandes son los que tienen el mayor rol en este proceso.

La degranulación hemocitaria es importante por parte de los granulositos fagocitantes de las células necrosadas. Después de algunos días, en el sitio de cicatrización de la herida se desarrollan tres capas; la primera que se encuentra próxima a la herida está compuesta por células aplastadas oscuras, la segunda contiene células vacuolizadas y la tercera está formada de hemocitos débilmente vacuolizados esta capa es reforzada por los hemocitos circulantes (Tsing, 1987).

2. 2. 3. HEMATOPOYESIS

En los crustáceos el tejido hematopoyético se encuentra situado en la cavidad dorsolateral en la superficie del estómago y está rodeado por tejido conectivo. Las células del tejido hematopoyético que son de diferentes morfología, están organizadas y densamente empaquetadas en pequeños lóbulos y algunos de estos tipos son también encontradas en espacios interlobulares. Esto ocurre en *Carcinus maenas* (Ghiretti *et al.*, 1977, *fide* Söderhäll, K., *et al.*, 2000), la langosta *Homarus americanus* (Martin *et al.*, 1993), y en el crayfish *P. leniusculus* (Chaga *et al.*, 1995). La organización es diferente en camarones *peneidos*, eg., en *Sicyonia ingentis* (Hose *et al.*, 1992). Donde el tejido hematopoyético se cree estar presente en emparejados nódulos epigástricos, los cuales consisten en una extensiva red de bazos reticulares.

La morfología de las células en el tejido hematopoyético en *P. leniusculus* fue recientemente estudiada por microscopia electrónica. Cinco tipos de células morfológicamente diferentes fueron identificados en la parte apical de los lóbulos (Chaga *et al.*, 1995), las cuales darian origen a los hemocitos.

2. 2. 4. MECANISMOS INMUNITARIOS RELACIONADOS A LA LIBERACIÓN DE COMPUESTOS CELULARES

Sistemas Multiméricos

En asociación con la liberación de moléculas a partir de células circulantes se encuentran dos sistemas multiméricos; el sistema de coagulación y el sistema profenoloxidasa (proPO). El primero es el responsable de establecer una barrera física para evitar la invasión y la pérdida de hemolinfa, ya que los camarones tienen un sistema circulatorio abierto. Por su parte, el sistema proPO se encargará de intoxicar los patógenos que hayan podido penetrar al interior del organismo a través de quinones y melanina (Albores F & Plascencia G, 1999).

Sistema de Coagulación

Aunque la cutícula forma una barrera estructural y química, es necesario un eficiente sistema interno de defensa que pueda evitar el ingreso de los microorganismos a la cavidad del cuerpo a través de las heridas o durante la muda. Así, un importante proceso en los crustáceos acuáticos es el rápido sellado de las heridas, mediante la coagulación, para prevenir pérdidas de hemolinfa y también para evitar el ingreso de microorganismos.

La coagulación ha sido ampliamente estudiada en los cangrejos hendidura (*Limulus polyphemus* y *Tachypleus tridentatus*) en los que todas las proteínas necesarias para la reacción de coagulación están localizadas dentro de las vesículas de los amebocitos (Armstrong, 1985; Söderhäll & Cerenius, 1992). Las bacterias que entran en la cavidad del cuerpo a través de una herida pueden liberar LPS de sus paredes celulares, y estos polisacáridos pueden inducir una exocitosis de la cascada de coagulación en el plasma. Una vez liberados en el plasma los LPS pueden inducir la activación del sistema de coagulación, que comprende una cascada de serinas-proteasas y un coagulógeno (Armstrong, 1985; Söderhäll & Cerenius, 1992, *fide* Cedeño R. 1998).

En los crustáceos dos tipos de procesos de coagulación han sido definidos: la coagulación celular (tipo A), coagulación plasmática (tipo C) y un intermediario entre estos dos tipos (tipo B) (Tait J, 1911). En los crustáceos, es una reacción de defensa rápida y eficiente que implica la reticulación de una proteína plasmática, el factor de coagulación, un dímero en el que cada monómero pesa alrededor de 200 kda, por acción de un enzima celular de tipo transglutaminasa (Söderhäll & Cerenius, 1992).

Sistema Profenoloxidasa

El sistema profenoloxidasa (proPO) es una compleja cascada enzimática integrada de varios factores, ya que involucra moléculas de reconocimiento, células y sus actividades efectoras, potencializa el estímulo y requiere de reguladores para evitar el daño sobre el tejido del camarón (Albores F. & Plascencia G. 1999). El sistema proPO en los invertebrados es un mecanismo de defensa acompañado por melanización. Se encuentra en

el interior de las células granulares y semigranulares y puede ser liberado por estimulación con β -glucanos o LPS. Una vez liberado el contenido granular, el proPO es activado en fenoloxidasa (PO). El enzima activador es una serina-proteasa de tipo tripsina llamada "profenoloxidasa activating protein" (ppA) (Albores, F. & Plascencia, G. 1999). El PO es el responsable de los procesos de melanización en los artrópodos, cataliza la acción de fenoles en quinones. (Söderhäll & Cerenius., 1998, Söderhäll *et al.*, 1996). Los quinones polimerizan formando la melanina, la cual debido a su naturaleza pegajosa se deposita y adhiere a los invasores.

En los camarones con viremia aguda por WSSV, la actividad PO en los hemocitos es baja, sin embargo el plasma (hemolinfa libre de hemocitos) de estos camarones ennegrece completamente, horas o pocos días después de tomar la muestra de hemolinfa (Echeverría, com. pers).

Mecanismos Humorales

Se han registrado para invertebrados, numerosas moléculas que matan células extrañas o microorganismos. Tales factores son usualmente no específicos y sus efectos varían desde desinfección general hasta lisis de microbios como las lisozimas que rompen los enlaces peptidoglicanos (Chisholm & Smith, 1992).

Los insectos han sido evolutivamente exitosos, se estima que el 90% de las especies conocidas del reino animal pertenecen a esta clase. Este éxito se puede atribuir a varias razones entre las cuales podemos citar las potentes reacciones antibacterianas de defensa (Cociancich. *et al.*, 1994). En crustáceos, los conocimientos sobre inmunidad humorar son limitados y la información disponible es escasa, debiendo recurrir a conocimientos adquiridos en otros artrópodos (insectos y limulus) para entender este tipo de reacciones de defensa.

Recientemente, la presencia de péptidos antimicrobiales fue reportada en diferentes especies de crustáceos incluyendo los cangrejos *C. maenas* (Schnapp *et al.*, 1996), *Callinectes sapidus* (Khoo *et al.*, 1999) y el camarón *L. vannamei* (Destoumieux *et al.*, 1997). Tres péptidos, peneidinas (Pen)-1, -2 y -3, fueron encontrados en los hemocitos

siendo la peneidina -3 la más abundante. Los tres péptidos presentaron considerables similitudes en propiedades y en la composición de aminoácidos. Las peneidinas son activas contra bacterias Gram + y hongos (Destoumieux *et al.*, 1999). Las peneidinas son liberadas por degranulación durante los procesos infecciosos, los mismos que no inducen ni incrementan la síntesis de nuevas peneidinas (Destoumieux *et al.*, 2000). La rápida estimulación de degranulación de los hemocitos es una de las reacciones inmediatas de los crustáceos (Smith & Söderhäll, 1983b; Johansson & Söderhäll, 1985) y en los cangrejos de agua dulce *P. leniusculus*, la degranulación provoca un rápido decrecimiento en RNA y síntesis de proteínas en células granulares (Johansson & Söderhäll, 1989).

La distribución de peneidinas y transcripción de péptidos en varios tejidos revelan que las peneidinas son sintetizadas constitutivamente y almacenadas en los hemocitos del camarón. Más aún, análisis de Northern blot efectuados con extracto de ARN de hemocitos y otros tejidos revelaron que los hemocitos fueron el principal lugar de síntesis de peneidinas. Por inmunohistoquímica y ultraestructura se demostró que están localizadas en los gránulos citoplasmáticos. Los niveles de ARN mensajero de peneidinas disminuye en los hemocitos circulantes en las primeras horas de una continua estimulación. Luego se observó un incremento de concentración en el plasma de peneidinas detectándose después la inmunoreactividad en el tejido cuticular. Signos más débiles de hibridación fueron observados en tejidos como corazón, branquias, testículos y nódulos epigástricos hematopoyéticos, con probables infiltraciones de hemocitos (Destoumieux *et al.*, 2000).

2. 2. 5. OTROS EFECTORES DE LA RESPUESTA INMUNE

Fagocitos Fijos

Además de los hemocitos la limpieza fagocítica de material particulado (con excepción de las pequeñas virosis de 30 nm de diámetro) está dada por dos tipos de células fijas en lugares de alta circulación de hemolinfa. Las células de reserva y los fagocitos fijos. En

palaemonidos y peneidos hay en el corazón las células fagocíticas de reserva que están intimamente involucradas en la limpieza de carmin y carbón inyectado. Los fagocitos fijos en cangrejos están localizados en la parte exterior de las arteriolas en los espacios hémicos del hepatopáncreas. Estas células son altamente especializadas, diseñadas para secuestrar gran cantidad de materia particulada, están rodeadas de una lámina semejante a un cernidor de material granular que rodea los sitios libres del fagocito (Johnson P, 1987). En los camarones se han descrito fagocitos fijos en el órgano linfoide (Kondo, *et al.*, 1998).

Órgano Linfoide

El órgano linfoide es considerado una parte integral del sistema circulatorio de los camarones peneidos, funcionando como filtro de la hemolinfa (Oka 1996; Bell & Lightner 1988; Hasson *et al.*, 1999). Posee dos componentes primarios llamados "túbulos arteriales" y estructuras nodulares con células vacuoladas (Kondo *et al.*, 1994; Martin *et al.*, 1996). Además jugaría un rol importante en la respuesta inmune de los peneidos y constituiría uno de los tejidos implicados en los mecanismos de defensa antivirales (Martin *et al.*, 1996; Hasson *et al.*, 1999).

En el camarón blanco Owens *et al.*, (1991-1992), describen vacuolizaciones linfoidiales virales provocadas por un parvo-virus. Lightner *et al.*, (1987); Hasson *et al.*, (1995); Fraser & Owens (1996), observaron en el órgano linfoide de camarones *P. monodon* y *P. penicillatus*, extrema actividad de esferoides descritas como hiperplasias en los túbulos de la base central de este órgano. Lightner (1996), en camarones *L. vannamei* infectados con Taura Syndrome Virus (TSV), describe a estos esferoides como largas y prominentes vacuolas citoplasmáticas. Más tarde Fraser & Owens (1996), definen a los esferoides, como vacuolas y encapsulaciones provocadas por infecciones virales, donde presuntamente existen células encargadas de fagocitar al material extraño (virus, bacterias, etc.,) y clasifican a estos cambios celulares en el órgano linfoide como esferoides en tres morfotipos: Tipo A; es la formación de vacuolas con necrosis y picnosis nuclear, tipo B;

incremento de las vacuolizaciones y las condensaciones nucleares, y tipo C; degradación de células necróticas (Anggraeni & Owens, 2000).

En estudios realizados en el tejido linfóide en animales infectados por TSV, se han observado cambios histológicos que se han denominado esferoides del órgano linfóide, (LOS - Lymphoid Organ Spheroid), las cuales son vacuolizaciones presuntamente ocasionadas por agentes virales.

Hasson (1998) & Hasson *et al.*, (1995, 1999b), mostraron las características histológicas de la fase crónica de infección del TSV en *L. vannamei* infectados experimentalmente. Que se caracterizó en ausencia completa de lesiones severas del epitelio cuticular, baja prevalencia del desarrollo de esferoides ectópicos, hipertrofia directa del órgano linfóide resultando en una rápida proliferación de numerosos esferoides en el órgano linfóide y sucesivas morfogénesis. Clínicamente la fase crónica de infección por TSV incluyen ausencia de signos de enfermedad y aparente cese de mortalidades inducidas por TSV (Hasson, *et al.*, 1999b).

Según la literatura sería uno de los órganos afectados por la presencia del WSSV. Incluso se han realizado estudios interesantes *in vitro* del efecto del virus sobre el camarón, usando cultivos primarios de células del tejido linfóide para evaluar la cantidad de inhibidores virales y la síntesis de proteína viral (Hsu., *et al.*, 1995; Lu., *et al.*, 1995a,b; Loh., *et al.*, 1997; Tapay., *et al.*, 1997).

2. 2. 6. CICLO DE MUDA DEL CAMARÓN

A causa de su exoesqueleto rígido los crustáceos necesitan mudar para seguir creciendo. La fisiología, comportamiento y reproducción de los crustáceos están estrechamente relacionados al ciclo de muda.

Durante el ciclo de muda los camarones acumulan en la glándula digestiva reservas de glucógenos, lípidos y proteínas, que son utilizadas mayormente en la construcción del futuro exoesqueleto y en la síntesis de nuevos tejidos.

Estas reservas son movilizadas de una manera diferente según el estadio de muda. Los estadios extremos, premuda tardía (D3 y D4) y postmuda (A, B), son caracterizados por una ausencia en el consumo de alimento y en la absorción de grandes cantidades de agua. Durante estos períodos, los nutrientes acumulados en la hepatopáncreas son utilizados de una forma óptima (Drash, 1939; Renaud, 1949; Fernández, 1998, *fide* Vega Villasantes F, 2000).

Los estadios de muda se han identificado exactamente, observando los cambios bioquímicos y biológicos, incluyendo cambios externos en el color del exoesqueleto y los cambios de morfología interna asociados con el retiro de la epidermis por la cutícula. El ciclo de muda fue dividido por Crac (1939), en cinco estadios con posteriores divisiones en varios subestadios. Los cambios morfológicos fueron observados a través del microscopio en los pleópodos (Shafer 1968; Longmuir 1983), urópodos (Read., 1977; Huner & Colvin 1979, *fide* Robertson, *et al.*, 1987) y en histología, en secciones abdominales preparadas (Smith & Dall 1985, *fide* Robertson, *et al.*, 1987). Desde entonces este sistema de división de estadios fue adoptado universalmente. Los estadios más importantes son: A (postmuda temprana inmediata), B (postmuda), C (intermuda), D (premuda), y E (ecdysis). Este ciclo se repite a lo largo de la vida del camarón y disminuye su frecuencia según el organismo va envejeciendo.

En cuanto al manejo de crustáceos cultivables los estadios de la muda se usan para determinar la madurez sexual de los reproductores, y a la vez para una buena producción larval (Browdy & Samocha 1985). La observación del ciclo de muda es usada también para determinar el tiempo para la ablación ya que durante esta pueden ocurrir grandes mortalidades de los reproductores (Aquacop. 1977-1979, *fide* Robertson, *et al.*, 1987) y durante la premuda cuando hay la maduración ovárica (Crocos & Kerr 1983; Browdy & Samocha 1985, *fide* Robertson, *et al.*, 1987). Por otra parte es de gran ayuda conocer el estadio de muda en los animales para determinar el tiempo de cosecha de piscinas de cultivo, ya que la dureza condiciona el valor de los camarones en el mercado (Apud. *et al.*, 1983, *fide* Robertson, *et al.*, 1987).

Por otra parte el ciclo de muda es una fuente interna de variaciones fisiológicas en los crustáceos, causando también efectos sobre las defensas celulares. Existen algunos estudios con relación a los cambios de estados inmunitarios durante el ciclo de muda de los crustáceos. Por ejemplo, Tsing *et al.*, (1989), en *M. japonicus* & Le Moullac *et al.*, (1997), en *Litopenaeus stylirostris*, obtuvieron variaciones en el hemograma a través del ciclo de muda, encontrando el mayor número de hemocitos durante los estadios de postmuda y el menor durante los estadios de intermuda. Similares variaciones fueron observadas, en *Sicyonia ingentis* (Hose *et al.*, 1992), entre las cuales; la más importante fue, mayor liberación de hemocitos hialinos del tejido hematopoyético durante los estadios de postmuda. En *L. stylirostris* y *S. ingentis*, el mayor número de hemocitos granulares en el conteo diferencial ocurre en intermuda (Le Moullac *et al.*, 1997; Hose *et al.*, 1992). El pico de las células hialinas ocurre durante el periodo ecdacial en *S. ingentis* y *M. japonicus* (Hose *et al.*, 1992 & Sequeira *et al.*, 1995). La presencia del elevado número de células hialinas en el periodo ecdacial (cuando la cutícula está débil) parece estar relacionada a la coagulación y a la formación de la cutícula (Hose *et al.*, 1992).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizaron ocho muestreos en la camaronera "EXPORFRUTO" (Engunga), vía Guayaquil - Santa Elena.

Los muestreos se iniciaron la tercer semana post-siembra de la piscina, con larvas PL 25 ya que a partir de esta semana se incrementan los riesgos de infección y los animales empiezan a presentar signos clínicos.

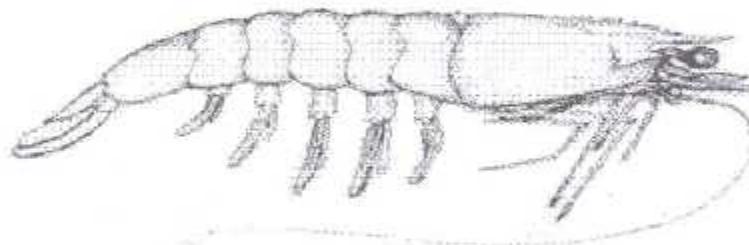


Figura 2: Camarón *Litopenaeus vannamei*

3. 1. PREPARACIÓN DEL MATERIAL BIOLÓGICO

En cada uno de los monitoreos se escogió alrededor de 25 camarones al azar, inicialmente se trabajó con animales de 1gr. de peso promedio. De estos camarones fue extraída la hemolinfa con jeringuillas de 1ml. (Insulin Syringe 26 G 1/2) cargadas con anticoagulante Citrato de Sodio al 10%.

Se incrementó el volumen del anticoagulante según se incrementaba el volumen de hemolinfa extraída del animal. La hemolinfa igualada (V/V) con Citrato de Sodio se dividió en tres aliquotas diferentes para las diferentes pruebas inmunitarias. A demás se tomaron urópodos para identificar los estadios de muda.

En cada uno de los animales se realizó PCR para WSSV. (Detection Kit For Spot Syndrome Virus WSSV in Penaeid Shrimps). "IQ2000™ WSSV DETECTION AND PREVENTION SYSTEM".

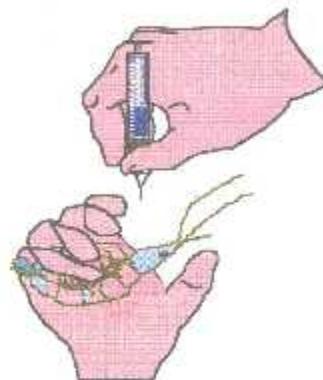


Figura 3: Extracción de la hemolinfa

3. 1. 1. Preparación de las muestras para Técnicas Inmunitarias

Alicuota 1: Fue utilizada en los hemogramas; añadiendo 10 μ l. de hemolinfa a un volumen igual de formaldehído al 10%. Las muestras fueron conservadas al ambiente, rotuladas y clasificadas por muestreo, hasta su observación en microscopio óptico de contraste de fases.

Alicuota 2: Fue utilizada para Cuantificación de anión superóxido O₂⁻ (Técnica de reducción del NBT). Las muestras de hemolinfa extraídas se procesaron al instante ya que para esta prueba se necesita de muestras frescas.

Alicuota 3: Se utilizó para Detección de la Actividad PO, Cuantificación de la Actividad Antibacteriana y Determinación de la Concentración de Proteínas Plasmáticas. Las muestras fueron centrifugadas a 800 g. por 10 minutos. Se retiró el plasma para la Actividad Antibacteriana y Cuantificación de Proteínas Plasmáticas. El precipitado fue resuspendido en tampón Cacodilato de Sodio (CaC) 10mM de baja osmolaridad. Luego se sometió a una fuerte centrifugación (10.000 rpm por 5 minutos), la baja osmolaridad y la

fuerte centrifugación, liberan el sistema pro-Fenoloxidasa. El sobrenadante es separado de los restos celulares preservado en un congelador de -20°C y utilizado en cuanto sea posible en la cuantificación de la actividad PO.

3. 1. 2. Preparación de muestras para otras Técnicas de análisis

Frotis Teñidos de Hemocitos. Las Muestras de hemocitos restantes, de los hemogramas fueron utilizadas para preparar frotis teñidos.

Microscopia Electrónica de Transmisión (MET). Las muestras de hemolinfa fueron diluidas tres veces más en solución anticoagulante Citrato de Sodio 10%, en presencia de 50µl. de fijador (glutaraldehido 3%, Cacodilato de Sodio 100mM. pH 7.5), centrifugadas a 800 g. por 10 minutos. El precipitado celular se resuspendió en 100µl. de fijador glutaraldehido y se conservó al frío a 4 °C hasta ser procesado.

Técnica de Biología Molecular

PCR (Reacción de Polimerización en Cadena). Para detectar la presencia del virus de la mancha blanca, las muestras de camarones se preservaron en etanol al 95%.

Estadios de muda

Los urópodos de los camarones fueron debidamente rotulados, procesados en formaldehído 10% en un ependorff para observar los diferentes estadios de muda del camarón.

3. 2. PROTOCOLOS

3. 2. 1. Técnicas Inmunitarias

Hemogramas

Esta prueba consiste en el conteo total y diferencial de hemocitos mediante hemocitómetro (cámara de Neubauer). Utilizando para ello un microscopio invertido provisto de un

dispositivo de contraste de fases (Olympus BH2), el mismo que permite diferenciar cada tipo hemocitario; por su forma, tamaño y refringencia. (Muñoz, 1996). El número de hemocitos es expresado en millones de células por ml, y la fórmula hemocitaria en porcentaje de tipos hemocitarios.

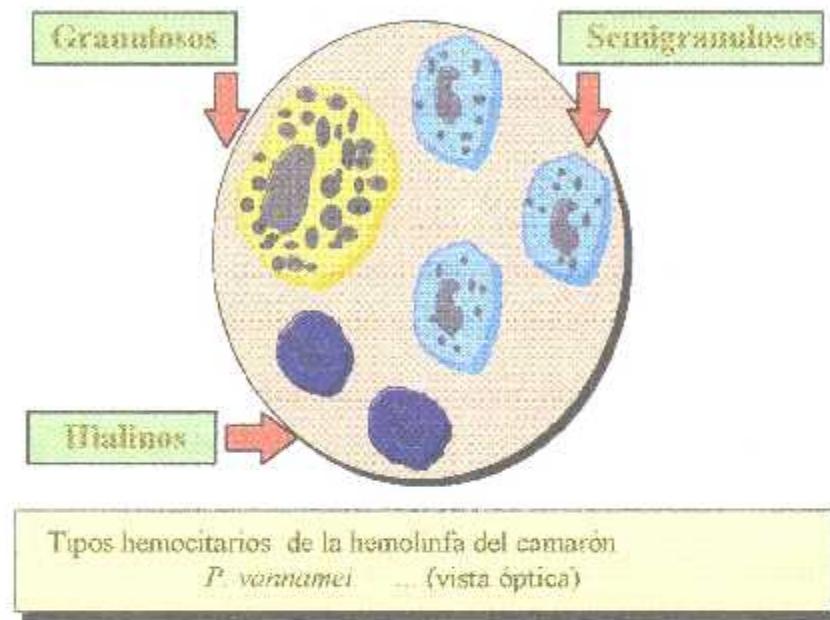


Figura 4: Hemocitos observados en Microscopio de Contraste de Fase

Cuantificación del Anión Superóxido O_2^-

Este radical de oxígeno se cuantificó por medio de la técnica de reducción del NBT según el protocolo optimizado por Muñoz, *et al.*, (2000). El O_2^- generado por los hemocitos estimulados, reduce el NBT en formazan, el mismo que es solubilizado y cuantificado espetrofotométricamente.

La producción de superóxido es expresada en tasas. Las tasas se obtuvieron dividiendo el valor de la absorbancia de la muestra estimulada para la fagocitosis, para el valor de la absorbancia de la misma muestra sin estimulación.

Protocolo para la cuantificación del anión superóxido

- En una microplaca tipo Elisa, se depositaron 50 μ l. de hemolinfa por hoyo, se llenó por triplicado para la Actividad de Base (AB) y por triplicado para la Estimulación (St), dando un total de 6 hoyos, es decir un volumen de 300 μ l por muestra.
- Luego se realizó un primocultivo, adicionando 50 μ l. de Solución Salina Modificada de Hanks (MHBSS 3) contenido (Ca⁺⁺18mM y Mg⁺⁺39mM) a todos los pozos, se incubó por 45 minutos a 23°C.
- Se eliminó el sobrenadante y se agregó en todos los hoyos 50 μ l. de MHBSS 1 contenido (Ca⁺⁺6mM y Mg⁺⁺13mM).
- En los hoyos estimulados se añadieron 50 μ l. de PMA (A-Phorbol Myristate) (30 μ g/ μ l) en MHBSS 3 (Ca⁺⁺18mM y Mg⁺⁺39mM). En los hoyos que sirvieron de control para evaluar la actividad básica de los hemocitos se añadió MHBSS sin PMA.
- Se colocaron en todos los hoyos 50 μ l. de NBT al 0,24% preparado en Hanks 0 (sin Ca⁺⁺ y Mg⁺⁺). Se incubó la placa a temperatura ambiente durante 2 horas, protegida de la luz debido a la fotosensibilidad del NBT.
- Se eliminó el sobrenadante de los hoyos suavemente con una pipeta multicanal y se adicionó 200 μ l. de metanol 100% para detener la reacción, permeabilizar las células y hacer el primer lavado. Se realizaron 2 lavados más con metanol de 70% (3 minutos cada uno). Se dejó secar la placa a temperatura ambiente.
- Se utilizaron 120 μ l. de KOH 2M. (hidróxido de potasio) y 140 μ l. de DMSO (dimethyl sulfoxide), para solubilizar el formazán intracelular.
- Finalmente se midió la densidad óptica en un espectrofotómetro de micro Elisa a una longitud de onda de $\lambda=620$ nm.



Figura 5: Cuantificación del Anión Superoxido

Cuantificación de la Actividad Fenoloxidasa (PO)

Se realizó según un protocolo estandarizado por Echeverría (1998). El principio se basa en la reacción de una muestra de extracto hemocitario con laminaria (β -glucanos solubles), en presencia de Ca^{++} . Luego de un tiempo de incubación, en el que el proenzima profenoloxidasa (proPO) inactiva pasa a PO activa, se añade el sustrato cromogénico L-Dopa, el cual por acción del PO pasará a Dopacromo de coloración café. Luego de 10 minutos de reacción se realiza la lectura en el lector de microplacas a una longitud de onda de $\lambda = 490 \text{ nm}$.

Protocolo para Cuantificación de la Actividad Fenoloxidasa

- Se colocaron $50\mu\text{l}$ de muestra de extracto celular correspondiente a una concentración de 200.000 células / hoyo diluidos en CaC 10mM (4 réplicas por muestra) y se añadió $50\mu\text{l}$ de laminaria 2mg / ml Ca^{+} 20mM, en CaC 10mM.
- Se incubó durante 70 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente. Se añadió $50\mu\text{l}$ de L-DOPA (L -3, 4-Dihydroxyphenyl - Alanine, 3mg / ml.) en Cac 10M. Se incubó en la oscuridad por 10 minutos y se realizó la lectura en el lector de microplacas con el filtro de $\lambda = 490 \text{ nm}$.

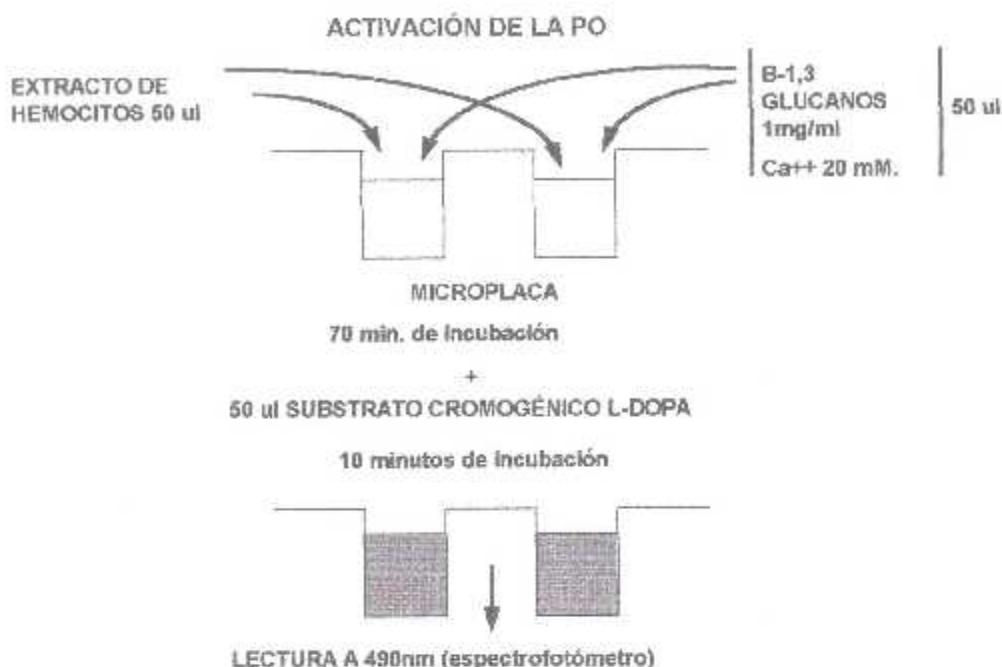


Figura 6: Cuantificación de la Actividad Fenoloxidasa.

Cuantificación de la Actividad Antibacteriana

Se detectó y cuantificó por medio de un método turbidométrico (Tapia, 1996), cuyo principio se basa en la medición de la turbidez de suspensiones bacterianas en presencia o ausencia del plasma del camarón. La actividad antibacteriana es expresada en porcentajes de inhibición del crecimiento bacteriano, el mismo que es calculado relacionando el valor en absorbancia obtenido a partir de las bacterias cultivadas en presencia de plasma contra el valor del control negativo, constituido de bacterias cultivadas en presencia de solución salina en lugar del plasma. El control negativo corresponde al 100% del crecimiento bacteriano.

Protocolo para la Cuantificación de la Actividad Antibacteriana

- Se sembró la bacteria *E. coli*, en una caja petri. Una colonia se sembró en medio líquido y se dejó incubar por 12 horas a 37°C. luego se repicó en diluciones (1/100) y se colocó en baño María con agitación por 2 horas. Despues se tomó la densidad óptica y se llevó la concentración a 40×10^6 bacterias / ml. Luego de esto se guardó

la solución bacteriana en refrigeración a 16°C, para evitar que la concentración se modifique mientras se prepararon las muestras de plasma.

- Las muestras de plasma, se distribuyeron en cuatro réplicas en una placa tipo Elisa (10 μ l por pozo), de igual manera se colocó el control negativo (Solución de Citrato de Sodio en Agua de mar estéril).
- Se colocaron, 10 μ l de Solución bacteriana en el control negativo y en tres de las cuatro réplicas. La cuarta réplica se complementó con medio de cultivo, libre de bacterias, y constituyó el control plasma.
- Se incubó por 1h a temperatura ambiente, después de lo cual se adicionó 200 μ l de medio LB y se realizó la primera lectura ($t=0$) en el espectrofotómetro de Elisa a $\lambda=620$ nm.
- Se incubó a 37°C por 8h y se realizó la segunda lectura a $\lambda=620$ nm ($t=8$).
- Para calcular el porcentaje de inhibición se utilizó la siguiente fórmula.

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{(\text{mDO en presencia de plasma} \times 100)}{\text{mDO control negativo}}$$

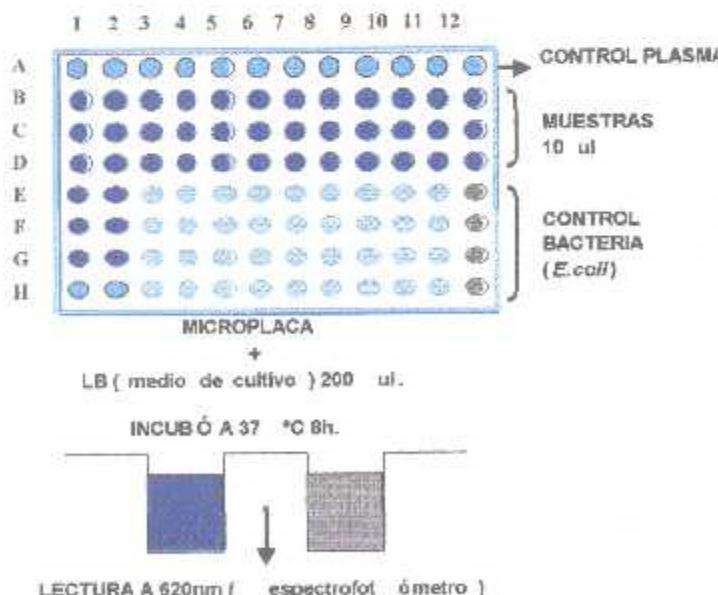


Figura 7: Cuantificación de la Actividad Antibacteriana

3. 2. 2. Técnicas Bioquímicas

Concentración de Proteínas Plasmáticas Totales

Se realizó la cuantificación de proteínas plasmáticas totales, por medio del método de Lowry *et al* (1951), miniaturizado en microplacas (CENAIM). La concentración de proteinas es expresada en microgramos por microlitro ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$).

Protocolo para la Concentración de Proteínas Totales

- Las muestras se diluyeron en agua destilada (1 / 50).
- Se procedió a llenar las dos primeras filas de la microplaca Elisa con BSA (Suero de Albúmina Bovina) preparado a una concentración $1\mu\text{g} / \mu\text{l}$. El llenado en la placa se lo realizó en forma progresiva desde (0, 2, 4, 6, 8,... $20\mu\text{l}$) y se completó a un volumen de $20\mu\text{l}$ con agua destilada. El objetivo de este llenado progresivo es obtener una curva estándar.
- Se colocaron por triplicado $20\mu\text{l}$ de las muestras de plasma diluidas.
- Se agregó a toda la placa $20\mu\text{l}$ de una solución conteniendo (91% de Sol. A, 45% de Sol. B y 4,5% de Sol. C.
 1. Solución A: Na_2CO_3 al 10% preparado en una solución de NaOH 0,5M.
 2. Solución B: $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ al 1% en agua destilada.
 3. Solución C: Tartrato de Sodio y Potasio al 1% en agua destilada.
- Se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente.
- Se colocó $60\mu\text{l}$ / hoyo de una solución al 10% de Fenol de Ciocalteus (Reactivos de folin).
- Se esperó 10 minutos.
- Se realizó la lectura en el espectrofotómetro a $\lambda=540$ nm.
- Para calcular la concentración de proteinas en el plasma se comparó la Densidad Óptica de las muestras, con la de la curva estándar.

Electroforesis de Proteínas (SDS-PAGE)

Esta prueba permitió observar el perfil de proteínas en el plasma del camarón por medio de una electroforesis en un gel de poliacrylamida, en condiciones desnaturalizantes y de reducción, mediante la técnica SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-poliacrylamide gel electroforesis) (Laemmli, 1970).

Protocolo para Electroforesis de Proteínas (SDS-PAGE)

Preparación de la muestra

- 20 μ l de cada muestra de plasma diluida a 2mg / ml de Solución Salina fue mezclada con 20 μ l de tampón de desnaturación (Tris 50mM pH6,8; SDS electroforesis 2%; Azul de Bromofenol 0,1%; Glicerol 10%; Agua Milli Q. y 10% de β mercaptoetanol).
- Se dejó hervir las muestras a 100°C por 5 minutos.

Preparación de los geles

- El Gel de Resolución de Poliacrylamida 8% se preparó con una solución de: 18,5ml de agua Milli Q.; 10,7ml de Acrylamide al 30%; 10ml de Tris base 1,5M (pH8,8); 0,4ml de sodium dodecyl sulfate 10% (SDS - deterjente iónico).
- La polimerización se realizó con 0,48ml Ammonium persulfate 10% (APS), en presencia de 0,024ml del acelerador tetramethylethyl-enediamine (TEMED).
- Se preparó el Gel Stacking gel superior de alta porosidad al 5% de Acrylamide con la solución; 12,3ml de agua Milli Q.; 3ml de Acrylamide al 30%; 2,25ml de Tris base 1M (pH 6,8); 0,18ml de SDS 10% (deterjente).
- Para la polimerización se añadió; 0,216ml de APS 10%, en presencia de 0,18ml de TEMED.
- Los dos geles se prepararon por separados primeramente; se preparó el Gel de Resolución dejando 30 a 40 minutos hasta que polimerize. Luego sobre este gel se colocó la solución del otro Gel de Stacking, esperandose el mismo tiempo polimerización.
- Los geles se pueden conservar refrigerados por varios días antes de su utilización.

Electroforesis

- El gel se cargó con 20 μ g de proteína por muestra.
- El tampón de electroforesis estuvo compuesto de: 15,1gr de Tris base; 94gr. de Glycine; se adicionó 50ml al 10% de la solución stock SDS y se ajustó a 1000ml con agua Milli Q.
- En el Gel de Stacking se dejó migrar las proteinas a 100 voltios y en el Gel de Resolución a 115-130 voltios.

Coloración al Azul de Coomasie

- Una vez que migraron todas las proteinas de cada una de las muestras se retiró el Gel de la Cámara de Electroforesis.
- Se procedió a hacer el teñido con azul de coomasie (0,05gr de Brilliant bleur-blue de coomasie; 80ml de metanol; 14ml de ácido acético y 106ml de agua destilada). El destañido se realizó con baños sucesivos en las soluciones de destañido # 1: 163ml de metanol; 33ml de ácido acético y 101ml de agua destilada, y la solución # 2: 15ml de metanol; 21ml de ácido acético y 264ml de agua destilada. Se fotografió el Gel.

3. 2. 3. Hemocitos en Microscopía Óptica y Microscopía Electrónica

Preparación de cortes de hemocitos

Protocolo para Frotis de Hemolinfa

- Los hemocitos restantes de las muestras de hemogramas fueron fijados en placas, cargadas positivamente. Los hemocitos se tiñeron con hematoxilina eosina y observados en el microscopio óptico (Olimpus BH2-1.25X).

Inmunodosisificaciones

La disponibilidad de anticuerpos monoclonales que reconocen hemocitos y al WSSV. Han permitido implementar protocolos de inmunohistoquímica.

Protocolo para inmunofluorescencia

- Se prepararon los hemocitos incluyendolos en agarosa. El pellet incluido en agarosa se bañó en plasma en presencia de 20mM de Ca++ para provocar la reticulación del factor de coagulación alrededor del pellet e impedir que se diluya en la parafina.
- Se deshidrató el pellet de los hemocitos con los alcoholes a diferentes concentraciones y se hicieron los bloques de parafina con la muestra y luego los cortes respectivos de hemocitos.
- Se colocaron las placas con sus respectivas muestras en una estufa por 1 hora a 100°C.
- Se dejó enfriar totalmente y se procedió de inmediato al desparafinado de las muestras en los xiroles y etanoles a diferentes grados de concentración (respectivamente), terminando con un lavado en agua destilada por 3 minutos.
- Se aplicó PBS buffer 1X (Tris 100mM; NaCl 150mM, Tween 20 0,1% pH7), por 5, minutos se bañaron completamente las placas y luego se drenaron.
- Se aplicó PBS buffer 1X.
- Se bloqueo con Buffer bloocking (5% de leche en PBS).
- Se aplicó el anticuerpo monoclonal anti - WSSV se deja actuar por una hora a temperatura ambiente en una cámara húmeda.
- Se colocó el segundo anticuerpo conjugado a la fluoresceína por 30 minutos.
- Se lavó la placa con PBS 1X por 10 minutos y se drenó el tampón.
- Se montó la placa con glicerina al 40% en PBS.
- Se observó la placa en un Microscopio de Epifluorescencia (Olimpus BH2-RFCA 1.25X).

Microscopía Electrónica de Transmisión

Protocolo para Microscopía Electrónica

Fijación

- Los hemocitos se fijaron por una hora en Glutaraldehyde 3% en tampón Cacodilato de sodio 100mM, Na Cl 175mM.

- Se realizaron los lavados con el tampón Cacodilato de sodio 200mM y Na Cl 325mM y se centrifugó a 300 rpm por 10 minutos.
- Las células fueron incluidas en agarosa al 1% (Low Melting Point-Sigma) a 50 °C con una breve centrifugación.
- Se dejó solidificar la agarosa por 1 hora a 4 °C.
- Luego de la solidificación, los hemocitos fueron postfijados con ácido órmico y enjuagados con tampón Cacodilato.

Deshidratación

- Los hemocitos de los bloques de agarosa fueron deshidratados con sucesivos baños de alcoholos a diferentes concentraciones: 2 baños de (10 min) en alcohol 70%; 2 baños (15 min) en alcohol 95% y 2 baños (20 min) en alcohol 100%.

Impregnación

- 2 baños de óxido de propileno (15 min), los bloques son impregnados en solución Epón; 50% de óxido de propileno y 50% de Epón 812 (Fluka) por 1 hora; Epón (6,6gr; DDSA 3,1gr; MNA 3,1gr y DMP 30 – 0,15gr). Luego en Epón puro para la polimerización se incubó de 3 a 4 días a 60 °C..

Cortes y teñidos

- Los cortes ultrafinos se realizaron con cuchilla de diamante (60 a 90nm).
- Los cortes se contrastaron con solución Acetato de Urano 5%; en alcohol de 50%. Y se dejó por 10 minutos en la oscuridad.
- Luego se colocó la solución de contraste con Citrato de Plomo en presencia de KOH. (Citrato de Plomo 0,04gr; agua destilada 10ml y NaOH 100μl).
- La observación se realizó en MET Jeol.

3. 2. 4. Técnica de biología molecular

Protocolo para la Preparación y Extracción de ADN para PCR

Las muestras de camarón se procesaron individualmente, utilizando branquias de cada uno de los animales procesadas en etanol 95%.

Extracción del ADN genómico

- El protocolo de extracción empezó con un periodo de incubación de la muestra a 70 °C por 45 minutos, con cetiltrimetilamonio bromuro (CTAB).
- Luego las muestras fueron centrifugadas a 13000 rpm por 5 minutos, y al sobrenadante se le aplicó 250µl de fenol y 250µl de cloroformo-isoamil. Nuevamente se centrifugó a 13000 rpm por 5 minutos, se recuperó el sobrenadante y se agregó 500µl de cloroformo-isoamil. Al líquido sobrenadante recuperado por centrifugación se le adicionó 400µl de isopropanol para precipitar el ADN el cual fue separado por centrifugación.
- El ADN pelletizado fue lavado con etanol frío al 70%, secado al ambiente y resuspendido en 100µl de tampón TE: Tris HCl 10 mM; EDTA 1 mM, pH 8,0. La cuantificación del ADN se realizó por espectrofotometría (Gene Quant, Pharmacia)

Técnica de Reacción de Polimerización en Cadena de doble paso (PCR)

El protocolo de PCR de dos pasos (Lo *et al.*, 1996) fue empleado utilizando los iniciadores.

146F1, 5'-ACT ACT AAC TTC AGC CTA TCT AG-3'; 146R1, 5'-TAA TGC GGG TGT AAT GTT CTT ACG A-3'; 146F2, 5'-GTA ACT GCC CCT TCC ATC TCC A-3'; 146R2, 5'-TAC GGC AGC TGC TGC ACC TTG T-3'; 143F, 5'-TGC CTT ATC AGC TAT CGA TTG TAG-3' y 143R, 5'-TTC AGA TTT GCA ACC ATA CTT CCC-3'. En el primer PCR o primer paso se emplearon los iniciadores 146F1 y 146R1, mientras que en el segundo PCR o segundo paso se utilizaron los iniciadores 146F2 y 146R2. Adicionalmente, en el segundo PCR se incorporaron los iniciadores 143F y 145R, los cuales sirvieron para cuantificar la calidad del ADN extraído, mediante la amplificación de una región altamente conservada de la secuencia del ácido ribonucleico ribosomal (ARNr).

18S de decápodos. De modo general, los productos amplificados obtenidos corresponden a un fragmento de virus de 941 pares de base (pb) y a un fragmento ribosomal de camarón de 848 pb.

Electroforesis

- Se preparó un gel de Agarosa al 2% en TAE pH 8 (Tris acetato).
- Se procedió a correr las muestras en el gel.
- Se fotografió el gel.

3. 3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico de los datos, se utilizó el Software Data Desk 6.1_E.

Aplicando un análisis de correlación entre variables continuas (cálculo de r), a un nivel de significanacia ($p=0,05$).

Los datos cualitativos, arrojados por las variables nominales (color de la hemolinfa, apariencia del animal, nivel de infección por WSSV y estadio de muda), fueron sometidos a un test de χ^2 ($p=0.05$), considerando las frecuencias entre las variables (tablas de contingencia) (Anexos 2).

Para incluir el hemograma dentro de la tabla de contingencia se establecieron rangos de normalidad para cada población hemocitaria. Se procedió de la misma manera para los otros parámetros inmunitarios.

En el caso de las células Semigranulosas (SG): menos del 60% del total de células es bajo, entre 60% y 70% es medio y del 70% en adelante es alto. Para las células Hialinas (H) menos del 15% es bajo, del 15% al 30% es medio, del 30% al 40% es alto y más del 40% es muy alto. Para las células Granulosas (GR) menos del 15% es bajo, del 15 al 25% es medio, del 25% al 40% es alto y del 40% al 50% es muy alto.

En el caso de las células Normales (Nm.): para valores que van desde el 91% al 100% altas, del 70% al 90% medio, del 61% al 69% bajo y rangos menores del 60% fueron

considerados muy bajos. En el caso de las células Anómalas (AM) rangos menores de 9% bajo, del 10% al 30% medio, del 31% al 40% alto y rangos mayores del 40% muy altos.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. ANOMALÍAS EN LOS HEMOCITOS DE CAMARONES AFFECTADOS POR WSSV

Durante los picos de infección con WSSV en piscinas camaroneras, se observan animales de coloración rosada. Una gran parte de estos animales presentan la hemolinfa rosada en lugar del típico color azul verdoso. El hemograma realizado en estos animales ha revelado incremento de células hialinas y hemocitos de morfología anómala (hialinos de gran tamaño, granulosos pequeños, granulosos muy agrandados y residuos celulares). La naturaleza de esas modificaciones se presentan en microscopía óptica (MO) y en observaciones ultraestructurales.

4.1.1. Microscopía óptica

En la figuras 8 A y B, se observan hemocitos de apariencia normal en microscopía de contraste de fases. Los hemocitos granulosos cargados de gránulos refringentes, los hemocitos hialinos de pequeño tamaño no refringentes y los semigranulosos de color celeste algo más pequeños que los granulosos pero más grandes y más refringentes que los hialinos.

En los frotis teñidos (figuras C y D), se observan. Los hemocitos granulosos cargados de gránulos eosinófilos, los hialinos con un delgado citoplasma y los semigranulosos con un citoplasma eosinófilo de mayor tamaño. Los hemocitos de apariencia normal son ovoides, siendo los granulosos los más redondeados

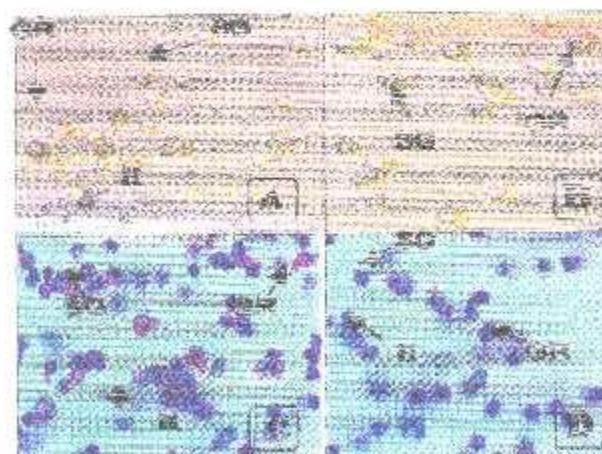


Figura 8 A y B. Hemocitos normales observados en Contraste de Fase (Granulosos: GR; Hialinos: HI y Semigranulosos: SG) y en C y D. Hemocitos observados en frotis teñidos. (GR, HI y SG).

En la Figura 9, se presentan hemocitos anómalos de animales infectados por el WSSV, en microscopía óptica. En A, B y C, se presentan hemocitos anómalos en microscopía de contraste de fases observándose: fantasmas (membranas vacías sin contenido celular), hemocitos granulosos agrandados de color oscuro, hemocitos hialinos de gran tamaño y restos hemocitarios muy pequeños. En D, E y F los hemocitos anómalos teñidos muestran pionosis y caniorexis, células vacuoladas, granulosos de gran tamaño con el núcleo excéntrico y una gran cantidad de hemocitos pionóticos de escaso contenido citoplasmático.

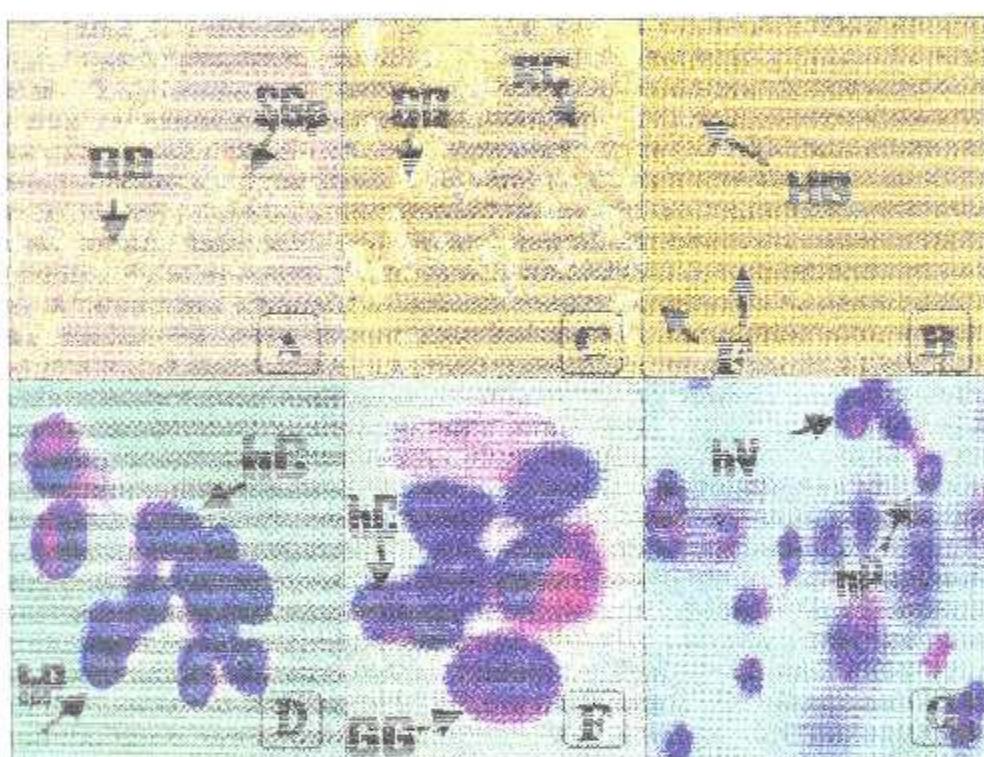


Figura 9. A, B y C. Hemocitos anómalos observados en Contraste de Fase (granulosos grandes: GG; semi-granulosos pequeños: SGp; restos celulares: RC Hialinos grandes: HG y fantasmas: F) y D, E y F. Hemocitos observados en Frotis Teñidos (hemocitos pionóticos: hp; hemocitos caniorrecticos: hc; hemocitos vacuolados: hv y Granulosos grandes: GG).

Los hemocitos que se observaron de gran tamaño y de color café en contraste de fases, probablemente son los mismos hemocitos que en frotis teñidos se observaron de tamaño superior a lo normal. Los pequeños restos celulares granulosos observados en contraste de fases serían hemocitos pionóticos y caniorrecticos y los fantasmas serían las células vacuoladas grandes.

4. 1. 2. Microscopía Electrónica

En la figura 10 se presentan en MET los 3 tipos de hemocitos de *L. vannamei*, en animales libres de WSSV. Como se puede observar hay escasas vacuolas y pseudopodos y la cromatina se presenta uniformemente distribuida en el núcleo.

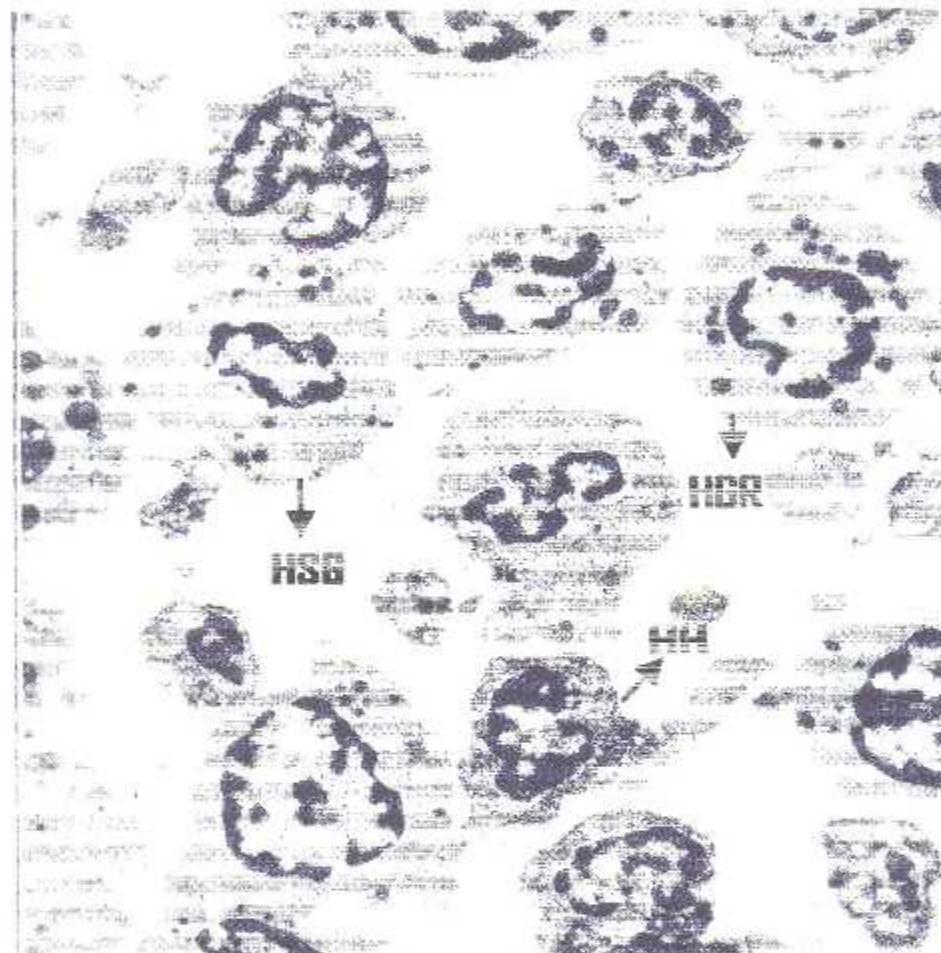


Figura 10. Hemocitos observados en MET. Hemoctos Granulosos: HGR. Hemoctos Semigranulosos: HSG. Hemoctos Hialinos: HH.

En ultraestructura los hemocitos estuvieron muy vacuolados (Figura 11). En el interior de las vacuolas se observaron estructuras semejantes a capsides y membranas, además de estructuras no identificadas.

Las vacuolas se encontraron empujando el núcleo hacia un extremo de la célula. A las células se les observó pseudopodos y prolongaciones citoplasmáticas. Uno de los aspectos más importantes de este estudio fue determinar si las anomalías de los hemocitos eran provocadas por la infección viral, sin embargo no se observó replicación de WSSV en el núcleo de ningún hemocito vacuolizado, ni en aquellos que tuvieron pycnosis. La

ultraestructura de los hemocitos piñónicos no mostró presencia de WSSV o de otro virus infectando el núcleo (figura 11).

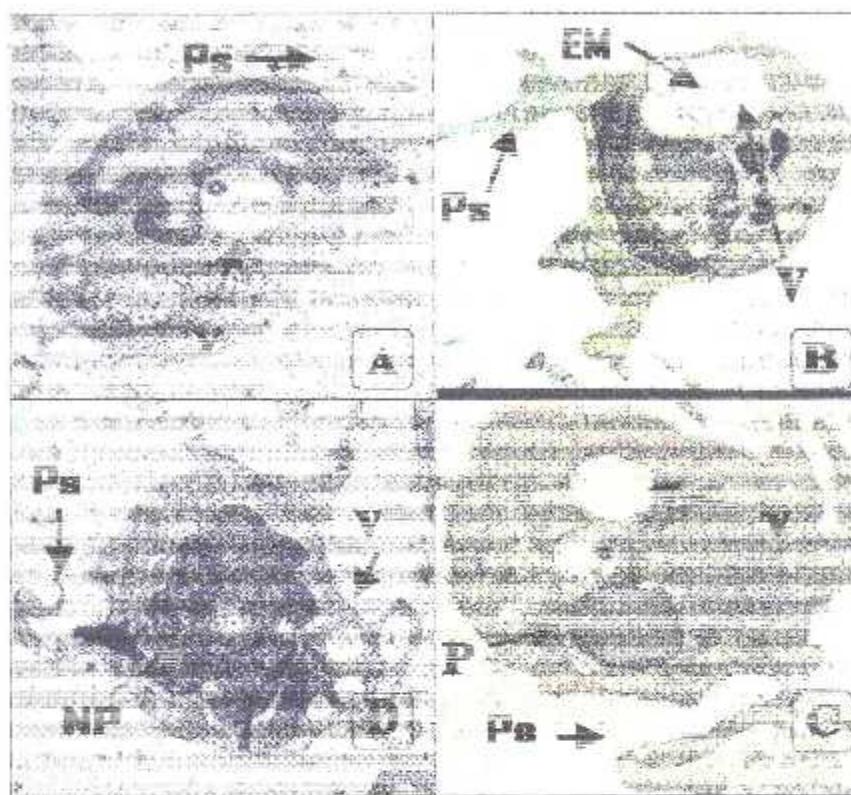


Figura 11 A, B, C y D. Hemocitos Anormales observados en MTC 1 (Pienosis; P, Pseudopodos; Ps, Estructura membranosa; EM, vacuolas; V, núcleo piñónico; NP).

Con la finalidad de determinar si hubo presencia de material viral en los hemocitos, se realizó una inmunofluorescencia. Como se puede observar (Figura 12) los resultados fueron positivos.

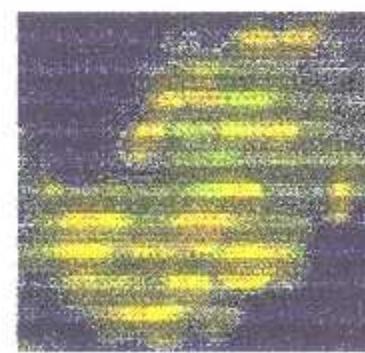


Figura 12. Material viral detectado por inmunofluorescencia en el citoplasma de hemocitos.

Las observaciones realizadas en MET revelaron la presencia de muchos pseudópodos. Esta multiplicación de prolongaciones citoplasmáticas podrían estar relacionadas a la activación de los hemocitos por presencia de antígenos virales en la hemolinfa. Las observaciones indican además que los núcleos de las células no fueron infectados. Sin embargo la inmunofluorescencia reveló presencia viral, por lo tanto estos hemocitos vacuolados se encontrarían fagocitando al virus. Las partículas observadas en dichas vacuolas podría ser material viral degradado y las estructuras membranosas serían restos celulares de tejidos infectados que han sido fagocitados. La fagocitosis de viriones del WSS ha sido también reportada por Durand *et al* (1997). Estos resultados sugieren que las anomalías observadas en microscopía óptica no serían producto de una infección viral, sino de la activación de los hemocitos y de fagocitosis.

4. 2. MUESTREOS EN LA CAMARONERA EXPORFRUTO DURANTE EL EPISODIO DE INFECCIÓN CON WSSV

Durante los días críticos de cultivo (de la tercera a la sexta semana), se muestreó una piscina de la camaronería Exporfruto (Enguriña-Provincia del Guayas). Se analizó el hemograma y otros parámetros inmunológicos (O_2 , Actividad PO, Concentración de Prot. Plasm., Actividad antibacteriana), comparándolos con el grado de infección viral con WSS, diagnosticado mediante PCR y con el estadio de la muda. Se analizó además el perfil electroforético de proteínas plasmáticas.

4. 2. 1. Muestreos de población de la piscina 42 de Exporfruto

En la figura 13 a, se puede observar que los datos de población fueron sesgados por las mareas. El cálculo de regresión a partir de los datos de población promediados fue de ($R^2=0.7$) (Figura 13 b). A partir de los datos de regresión se calculó la mortalidad durante el muestreo, la misma que fue del 4.78% (calculado desde la siembra). El 26 de enero habría muerto el 12% de la población existente el 15 de enero. La supervivencia a la cosecha fue del 25% (datos de la camaronería).

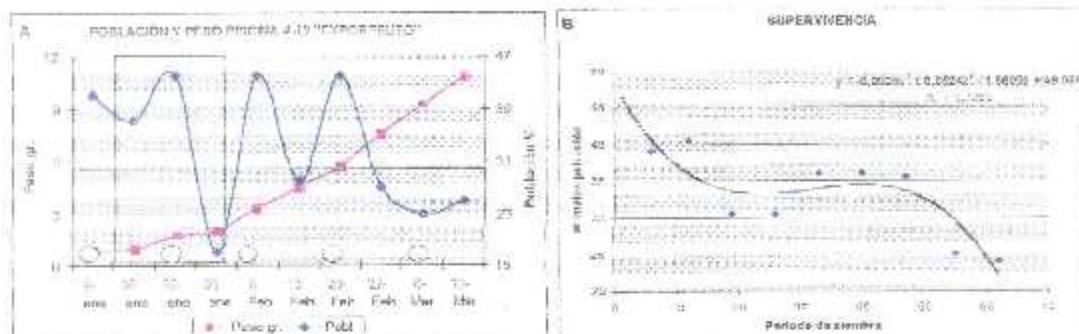


Figura 13. Población y supervivencia en la piscina de “Exportista”. **A.** Movimiento poblacional durante el muestreo, marcas y punto primario. **B.** Supervivencia de la población a lo largo del muestreo. Las rectas claras periodos de luna justo en los días de muestreo (cuadro celeste).

4.2.2. Análisis de WSSV en los animales muestreados mediante PCR

Durante el muestreo se presentaron dos picos de infección por WSSV el 15 y el 22 de enero. La infección declinó hacia el final del muestreo. Se encontró que el nivel de infección determinado por PCR con el Kit IQ2000 tuvo alta correlación ($R^2 = 0.96$) con la prevalencia del virus en la población. Por tal motivo se incluyeron los datos de la prevalencia en los análisis de correlación (Figura 14).

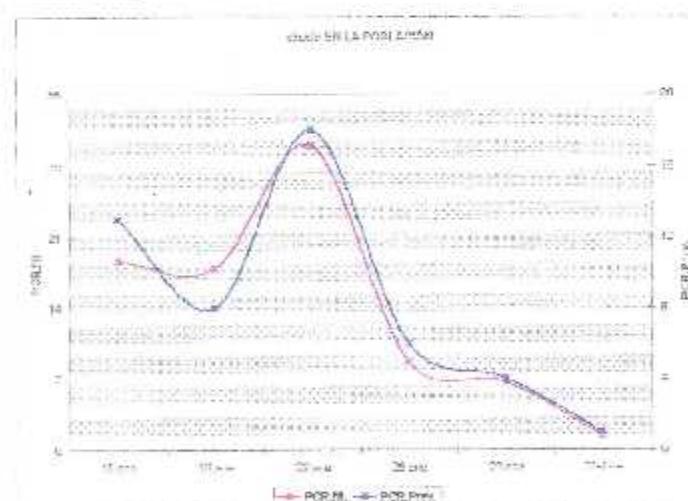


Figura 14. Nivel de infección durante los períodos de muestreo. Intensidad de la infección del WSSV con IQ2000: PCR NI. Prevalencia en porcentaje de animales infectados: Prev.

Se observaron animales de hemolinfa rosada a lo largo de todo el muestreo. Particularmente durante los picos de infección del 15 y el 22 de enero, cuando alrededor del 50% de la población presentó hemolinfa rosada (Figura 15).

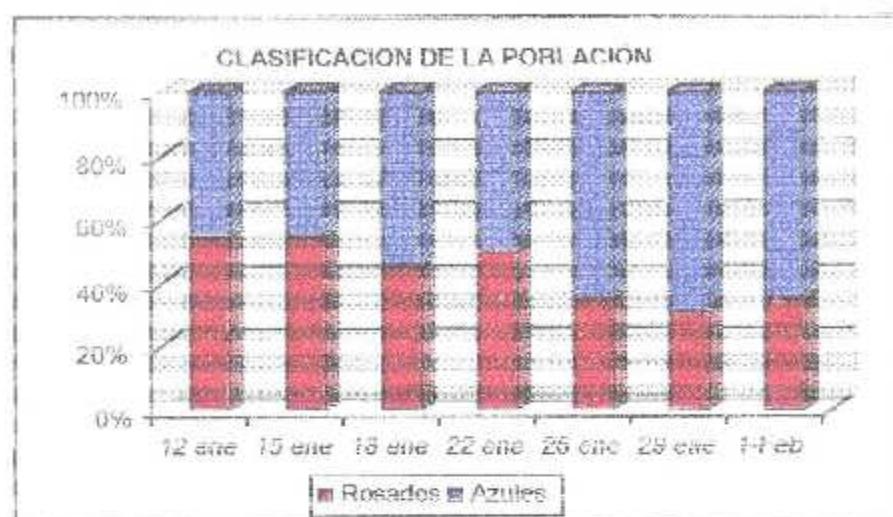


Figura 15. División de la población de animales en los muestreros.

Los animales de hemolinfa rosada tuvieron mayor número de casos positivos al WSSV, siendo todos positivos durante el pico de infección del 22 de enero. (Figura 16 B). Se encontraron además, animales de hemolinfa rosada positivos para WSSV hasta el primero de febrero, mientras que los animales de hemolinfa normal fueron negativos desde el 29 de enero (Figura 16 B). El 15 y el 22 de enero en el grupo de animales rosados se observaron niveles de PCR 3 y 4, en tanto que los animales de hemolinfa azul estuvieron en su mayoría en nivel 1 (Figura 16 A y B). En los animales El análisis de las tablas de contingencia mostró relación directa ($p < 0.05$) entre el color de la hemolinfa y el porcentaje de hemocitos anómalo, es decir este fue mayor en los animales de hemolinfa rosada.

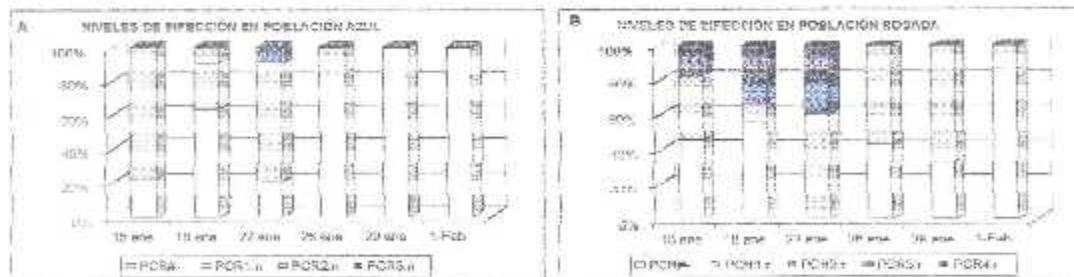


Figura 16 A y B. Niveles de infección durante los muestreros en camarones de hemolinfa azul y rosada. PCR Negativos: PCR-; PCR Positivos Nivel 1, 2, 3 y 4 (Muy leve: 1, Leve: 2, Medio: 3 y Severo: 4).

Para poder manejar mejor los resultados y obtener una clara interpretación de ellos, se clasificaron las muestras, en animales de hemolinfas azules (normales) y animales de hemolinfas rosadas, o animales de bajo y alto nivel de infección respectivamente.

4. 2, 3. Hemogramas versus infección por WSSV

Los datos crudos de los hemogramas que se realizaron durante los ocho muestreos se encuentran en (Anexos 1 A, B, C, D, E, F, G y H).

Hemograma en animales de hemolinfa azul (bajo nivel de infección)

En la figura 10, se observa incremento del NTH durante el periodo de muestreo ($R=0.63$). Este incremento de hemocitos tuvo relación lineal significativa ($p < 0.05$) con el incremento de hemocitos de apariencia Nm ($R=0.77$) y dentro de esta población con los SG ($R=0.72$) y los H ($R=0.44$) (Tabla 1 A). Se encontró correlación entre el nivel de infección con WSSV y modificaciones en la fórmula hemocitaria. Esta relación fue inversa con el número ($R=-0.63$) y el porcentaje de hemocitos Nm ($R=-0.82$), en tanto que fue directa lineal con el número de hemocitos AM ($R=0.91$) y el porcentaje de estos ($R=0.82$) (Figura 17, tabla 1 B).

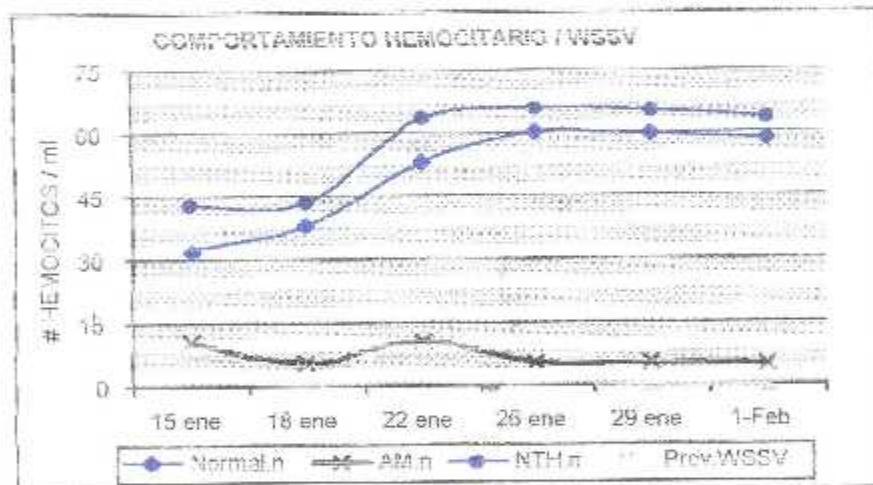


Figura 17. Comportamiento hemocitario y prevalencia de WSSV en los animales de bajo nivel de infección (normales: n). Número de hemocitos normales: Normal.n, Número de hemocitos anormales: AM.n, Número total de hemocitos normales: NTH.n y prevalencia de WSSV.

El número de hemocitos H guardó una relación lineal inversa con los AM ($R=-0.70$) y con el nivel de infección con WSSV ($R=-0.57$) (Figura 18 A). En la figura 18 B, se observa que el porcentaje de AM disminuyó debido al incremento de H ($R=-0.63$) y SG ($R=-0.67$). Sin embargo durante los picos de infección la relación entre hemocitos AM y el porcentaje de hemocitos H y GR fue directa y significativa ($R=1.0$) ($R=0.70$). En ese momento la mayoría de hemocitos circulantes Nm, fueron SG ($R=1.0$).

TABLA 1 A

Time	GR.n	SG.n	ILn	Norm.	AM.n	NTH	GR%	SG%	IL%	M%	O2-n	A.A.	nProt	P.O.	nPCR#	Poss.m	Intm.m	rem.m	Prem.m
1	.9	.15	.8	.32	.11	.43	.23	.28	.20	.72	.28	.1.01	.17	.112	.57	.633	0	.424	.464
2	.7	.20	.10	.38	.6	.43	.18	.47	.18	.83	.17	.1.13	.2	.142	.56	.464	0	.398	.580
3	.6	.37	.9	.53	.11	.64	.10	.55	.18	.83	.17	.1.04	.31	.137	.54	.683	.322	.322	.464
4	.10	.36	.14	.60	.3	.66	.14	.31	.25	.90	.10	.1.04	.26	.146	.47	.322	.322	.398	.464
5	.7	.28	.24	.59	.6	.65	.10	.42	.38	.91	.9	.1.13	.7	.160	0	.000	.226	.000	.685
6	.9	.35	.14	.58	.5	.63	.15	.50	.26	.91	.9	.1.09	.41	.177	.62	.000	0	.322	.464
																			.633

Pearson Product-Moment Correlation
No Se

Time	GR.n	SG.n	ILn	Norm.	AM.n	NTH	GR%	SG%	IL%	M%	O2-n	A.A.	nProt	P.O.	nPCR#	Poss.m	Intm.m	rem.m	Prem.m		
1	GR.n	0.14	1																		
SG.n	0.71	0.60	1																		
ILn	0.70	-0.04	0.25	1																	
Norm.	0.89	0.08	0.89	0.65	1																
AM.n	-0.67	-0.36	-0.29	-0.57	-0.54	1															
NTH	0.81	0.02	0.91	0.57	0.97	-0.33	1														
GR%	-0.64	0.47	-0.79	-0.58	-0.84	0.22	-0.86	1													
SG%	0.51	-0.26	0.85	0.06	0.67	-0.36	0.63	-0.72	1												
H%a	0.68	0.07	0.19	0.98	0.61	-0.50	0.55	-0.58	-0.08	1											
Norm.	0.91	0.05	0.73	0.72	0.91	-0.81	0.79	-0.73	0.67	0.63	1										
AM%	-0.91	-0.05	-0.73	-0.72	-0.91	0.81	-0.79	0.73	-0.67	-0.63	-1.00	1									
O2-n	0.42	-0.41	-0.03	0.59	0.22	-0.64	0.04	-0.33	0.23	0.47	0.56	-0.56	1								
A.A.	0.47	0.34	0.70	-0.21	0.47	0.04	0.54	-0.20	0.43	-0.14	0.24	-0.24	-0.47	1							
Prot	0.95	0.03	0.60	0.61	0.76	-0.77	0.63	-0.57	0.56	0.57	0.91	-0.91	0.63	0.34	1						
P.O.	0.19	-0.17	-0.26	-0.13	-0.27	0.05	-0.30	0.29	-0.24	0.01	-0.14	0.14	0.35	0.19	0.31	1					
nPCR#	-0.88	-0.24	-0.31	-0.83	-0.65	0.80	-0.50	0.36	-0.15	-0.83	-0.80	0.80	-0.62	-0.10	-0.88	-0.33	1				
Poss.m	0.22	-0.18	0.67	0.29	0.64	0.06	0.74	-0.76	0.52	0.23	0.39	-0.39	-0.21	0.16	0.03	-0.79	0.08	1			
Intm.m	-0.64	0.44	-0.32	0.91	-0.63	0.35	-0.59	0.77	-0.22	-0.85	-0.66	0.65	0.20	-0.60	-0.11	0.67	-0.37	1			
Prem.	0.20	-0.06	-0.41	0.72	0.92	-0.55	-0.13	-0.02	-0.33	0.69	-0.30	-0.30	0.76	-0.73	0.29	0.13	-0.60	-0.24	-0.58	1	
Prem.	0.94	-0.67	0.88	0.58	0.94	-0.56	0.89	-0.82	0.75	0.52	0.92	-0.92	0.38	0.51	0.89	0.02	-0.69	0.44	-0.63	0.01	1

Tabla 1 A. Correlación de todos los muestreos en animales de baja carga viral

TABLA 2 A

Time	GR,r	SG,r	H,r	Normal	AM,r	NTH,r	SG%,r	III%,r	Norm%,r	AM%	O2-,r	A,A,r	Prot,r	PO,r	PCrH+	Mud,r	Posm,r	Intmr,r	Intmr,r	Intmr,r	Prem,r
1	.21	.26	.14	.61	.18	.78	.28	.33	.17	.77	.23	.1,02	0	.1,23	.47	.580	0	.322	.322	.580	.322
2	.6	.17	.9	.31	.7	.39	.18	.37	.21	.75	.25	.1,00	.15	.1,48	.47	.464	0	.0,00	.0,226	.633	.322
3	.13	.61	.14	.88	.20	.108	.11	.54	.13	.78	.22	.1,11	.25	.1,63	.47	.785	0	.0,00	.0,222	.464	.464
4	.5	.21	.8	.35	.7	.42	.11	.49	.19	.79	.21	.1,00	.16	.1,09	.54	.464	0	.0,00	.0,222	.398	.322
5	.8	.28	.16	.52	.10	.61	.13	.46	.25	.84	.16	.1,02	.15	.1,23	.54	.464	0	.0,00	0	.464	.322
6	.5	.25	.17	.47	.5	.52	.9	.49	.33	.91	.9	.1,26	.40	.1,54	.63	.226	0,226	.0,00	0	.524	.236

Pearson Product-Moment Correlation
No Selected

Time	1	GR,r	SG,r	H,r	Normal	AM,r	NTH,r	SG%,r	III%,r	Norm%,r	AM%	O2-,r	A,A,r	Prot,r	PO,r	PCrH+	Mud,r	Posm,r	Intmr,r	Intmr,r	Intmr,r	Prem,r
GR,r	-0,69	1																				
SG,r	-0,04	0,35	1																			
H,r	0,44	0,25	0,34	1																		
Normal,r	-0,16	0,62	0,94	0,51	1																	
AM,r	-0,59	0,87	0,74	0,22	0,87	1																
NTH,r	-0,27	0,68	0,92	0,44	0,99	0,92	1															
SG%,r	-0,83	0,78	-0,26	-0,10	0,01	0,44	0,11	1														
GR%,r	0,68	-0,46	0,59	0,19	0,36	-0,05	0,28	-0,91	1													
SG%,r	0,76	-0,57	-0,50	0,47	-0,48	-0,76	-0,56	-0,38	-0,98	1												
H%,r	0,39	-0,41	-0,98	0,70	-0,06	-0,46	-0,16	-0,56	-0,44	0,86	1											
Norm%,r	0,89	0,41	0,08	-0,70	0,06	0,45	0,16	0,56	-0,44	-0,86	-1,00	1										
AM%,r	-0,89	0,41	0,08	-0,70	0,06	0,45	0,16	0,56	-0,44	-0,86	-1,00	1										
O2-,r	0,60	-0,20	0,26	0,65	0,26	-0,16	0,17	-0,49	0,47	0,57	0,79	-0,79	1									
A,A,r	0,77	-0,62	0,23	0,37	0,06	-0,41	-0,05	-0,83	0,72	0,57	0,73	-0,73	0,86	1								
Prot,r	0,07	-0,06	0,54	0,34	0,44	0,17	0,41	-0,29	0,30	0,05	0,15	-0,15	0,63	0,62	1							
PO,r	0,93	-0,58	-0,29	0,40	-0,32	-0,67	-0,42	-0,60	0,42	0,88	0,95	0,75	0,75	0,63	0,62	1						
PCrH+	-0,61	0,61	0,74	-0,15	0,73	0,89	0,79	0,26	0,08	-0,93	-0,70	0,70	-0,41	-0,43	0,14	-0,82	1					
Mud,r	0,66	-0,36	-0,14	0,53	-0,13	-0,48	-0,21	-0,42	0,27	0,79	0,86	-0,86	0,92	0,80	0,40	0,90	-0,73	1				
Posm,r	-0,66	0,88	-0,11	0,13	0,21	0,53	0,28	0,90	-0,71	-0,31	0,31	-0,23	-0,68	-0,32	-0,36	0,22	-0,20	1				
Intmr,r	-0,65	0,28	0,31	-0,72	0,20	0,45	0,28	0,20	0,01	-0,89	-0,81	0,81	-0,46	-0,38	-0,06	-0,75	0,69	-0,61	0,14	1		
Prem,r ¹	-0,53	0,27	-0,33	0,01	-0,20	0,09	-0,15	0,63	-0,78	0,08	-0,26	0,26	-0,03	-0,23	0,35	-0,13	0,08	0,40	-0,12	1		
Prem,r	-0,44	0,38	0,81	-0,17	0,71	0,77	0,75	0,00	0,30	-0,86	-0,61	0,61	-0,32	-0,23	0,26	-0,73	0,96	-0,67	-0,05	0,66	-0,24	

Table 2 A. Correlación de todos los muestreros en animales de alta carga viral

TABLA 1 B

	Time	GR.n	SG.n	H.n	Normal	AM.n	NTH.n	CR%	n	H%	norm%	M%	O2-n	A.A.n	Prot.n	PO.n	PCRn	Pearson	Prema..	Prema..
1	9	1.5	8	32	11	43	23	28	20	72	28	1.61	17	112	57	0.633	0	0.524	0.464	0
2	7	20	10	38	6	43	18	47	18	83	17	1.13	2	142	56	0.464	0	0.598	0.580	0.226
3	6	37	9	53	11	64	10	55	18	83	17	1.64	31	137	54	0.685	0.322	0.322	0.464	0.464

Pearson Product-Moment Correlation
No Se

	Time	GR.n	SG.n	H.n	Normal	AM.n	NTH.n	CR%	n	H%	norm%	M%	O2-n	A.A.n	Prot.n	PO.n	PCRn	Pearson	Prema..	Prema..
Time	1																			
GR.n	-0.98	1																		
SG.n	0.95	-0.88	1																	
H.n	0.50	-0.66	0.22	1																
Normal	0.97	-0.91	1.00	0.28	1															
AM.n	0.60	0.19	0.30	-0.87	0.24	1														
NTH.	0.87	-0.76	0.98	0.70	0.96	0.50	1													
GR%	-0.99	0.95	-0.95	-0.38	-0.99	-0.13	-0.92	1												
SG%	0.97	-1.90	0.86	0.69	0.89	-0.23	0.73	-0.94	1											
H% ^x	-0.87	0.95	-0.68	-0.87	-0.72	0.59	-0.50	0.79	-0.96	1										
Normal	0.87	-0.95	0.68	0.87	0.72	-0.50	0.50	-0.79	0.96	-1.00	1									
AMP%	-0.87	0.95	-0.68	-0.87	-0.72	0.50	-0.50	0.79	-0.96	1.00	-1.00	1								
O2-n	0.24	-0.42	-0.06	0.96	0.00	-0.97	-0.28	-0.11	0.46	-0.69	0.69	-0.69	1							
A.A. ^r	0.48	-0.31	0.72	-0.52	0.68	0.88	0.86	-0.59	0.27	0.02	-0.02	0.02	-0.73	1						
Prot.r	0.78	-0.88	0.55	0.91	0.60	-0.63	0.36	-0.69	0.90	-0.99	0.99	-0.99	0.80	-0.18	1					
PO.n	-0.98	0.93	-0.99	-0.33	-1.00	-0.19	-0.95	1.00	-0.91	0.76	-0.76	0.76	-0.95	-0.64	-0.65	1				
PCRn	0.23	-0.04	0.51	-0.73	0.45	0.97	0.68	-0.35	0.00	0.29	-0.29	0.29	-0.89	0.96	-0.44	-0.41	1			
Posm	0.87	-0.76	0.98	0.00	0.96	0.50	1.96	-0.92	0.73	-0.50	0.50	-0.50	-0.23	0.86	0.36	-0.95	0.68	1		
Inm	-0.99	1.00	-0.90	-0.62	-0.93	0.14	-0.79	0.96	-1.00	0.93	-0.93	0.93	-0.38	-0.35	-0.86	0.95	-0.09	-0.79	1	
Prem	-0.55	0.38	-0.78	0.45	-0.73	-0.84	-0.89	0.66	-0.34	0.06	-0.06	0.06	-1.00	0.10	-0.94	-0.89	0.43	1		
Prem.	1.00	-0.98	0.96	0.49	0.97	0.62	0.87	-0.99	0.97	-0.86	0.86	-0.86	0.50	0.77	-0.99	0.24	0.87	-0.99	1	

Tabla 1 A. Correlación de los picos de infección durante los períodos de infección en animales de baja carga viral

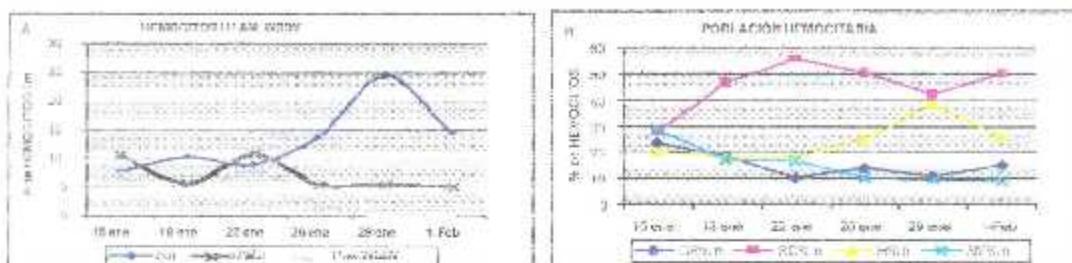
TABLA 2 B

Time	GR,r	SG,r	H,r	normal	AM,r	NTU,r	GR%,SG%	H%,r	norm%AM%	O2-r	A,Af	ProLr	PoLr	PCR#	Mud,r	Poss,r	Intra,r	resu,rT	Prem,r
1	.21	.25	.14	.61	.18	.78	.28	.33	.17	.77	.23	.1,02	0	.123	.47	.580	0	.0,222	.0,226
2	.6	.17	.9	.31	.7	.39	.18	.37	.21	.75	.25	.1,00	.1,5	.48	.47	.464	0	.0,090	.0,226
3	.13	.61	.14	.88	.20	.108	.11	.54	.13	.78	.23	.1,11	.25	.163	.47	.785	0	.0,000	.0,322

Pearson Product-Moment Correlation
Nº Series

Time	GR,r	SG,r	H,r	normal	AM,r	NTU,r	GR%,SG%	H%,r	norm%AM%	O2-r	A,Af	ProLr	PoLr	PCR#	Mud,r	Poss,r	Intra,r	resu,rT	Prem,r
GR,r	-0,53	1																	
SG,r	0,75	0,16	1																
H,r	0,00	0,85	0,66	1															
Normal	0,47	0,49	0,94	0,88	1														
AM,r	0,14	0,76	0,76	0,93	0,94	1													
NTU,r	0,43	0,53	0,92	0,90	1,00	0,95	1												
GR%,r	-1,00	0,62	-0,68	0,10	-0,38	-0,04	-0,34	1											
SG%,r	0,94	-0,22	0,93	0,34	0,74	0,47	0,71	-0,99	1										
H%,r	-0,50	-0,47	-0,95	-0,87	-1,00	-0,93	-1,00	0,41	-0,76	1									
Norm%	0,33	0,63	0,87	0,95	0,99	0,98	0,99	-0,23	0,63	-0,98	1								
AM%,r	-0,33	-0,63	-0,87	-0,95	-0,99	-0,98	-0,99	0,23	-0,63	0,98	-1,00	1							
O2-r	0,77	0,13	1,00	0,64	0,93	0,74	0,91	-0,70	0,94	-0,94	0,86	-0,86	1						
A,Af	0,99	-0,63	0,67	-0,12	0,37	0,03	0,33	-1,09	0,90	-0,40	0,22	-0,22	0,69	1					
ProLr	0,99	-0,65	0,65	-0,14	0,34	0,00	0,30	-1,00	0,88	-0,37	0,19	-0,19	0,67	1,00	1				
PCR#	0,63	0,32	0,99	0,78	0,98	0,86	0,97	-0,55	0,86	-0,99	0,94	-0,94	0,98	0,54	0,51	1			
Poss,r	-0,87	0,89	-0,32	0,50	0,03	0,37	0,08	0,91	-0,65	0,60	0,19	-0,19	-0,35	-0,92	-0,93	-0,16	1		
Intra,r	0,87	-0,04	0,98	0,50	0,85	0,62	0,83	0,81	0,98	-0,87	0,76	-0,76	0,99	0,80	0,79	0,93	-0,50	1	
Prem,r	0,87	-0,04	0,98	0,50	0,85	0,62	0,83	0,81	0,98	-0,87	0,76	-0,76	0,99	0,80	0,79	0,93	-0,50	1,06	-0,95

Tabla 2 B. Correlación de los picos de infección durante los muestreos, en animales de alta carga viral



Figuras 18 A Y B: Población hemocitaria frente a la infección viral. **A**. Hemocitos Anómalos en población normal: AM.n. Hemocitos Hialinos: H.n y Prevalencia de WSSV. **B**. Porcentaje de Hemocitos Granulosos en población normal: GR% n. de Semigranulosos SG% n. de Hialinos: H% n. y de anómalos: AM% n.

Estos resultados sugieren que, la infección induciría a los animales a incrementar las 3 poblaciones hemocitarias. Este incremento que fue particularmente alto en los hemocitos SG, fue menos claro en las otras dos poblaciones, debido probablemente a la intervención de estas en la generación de hemocitos AM en particular durante los picos de infección. Los hemocitos anómalos reflejaron el grado de infección y serían originados en gran parte por los hemocitos GR y los hemocitos H. Siendo estos últimos quienes guardaron mayor relación con los AM, situación que se ve reflejada en la correlación altamente significativa entre el descenso de AM y el descenso de hemocitos H en los picos de infección. Cuando finalmente la infección fue controlada se observó un incremento significativo de hemocitos H. Luego de cada pico de infección viral se observó una inflexión en la curva ascendente de los SG. Esto pudo deberse a la intervención de estos hemocitos en otros procesos inmunitarios (infiltración en tejidos, encapsulación).

Hemograma en animales de hemolinfa rasada (alto nivel de infección)

En estos animales muy infectados con WSSV la relación entre el nivel de infección también se mantuvo directa con los hemocitos AM ($R=0.90$). Ante la infección se observó generación del NTH con todos los grupos hemocitarios (Figura 19). Esto fue particularmente claro durante los picos de infección ($R=0.70$), siendo los hemocitos SG el grupo más generado ($R=0.82$) (Figura 20 A). El NTH con todas sus poblaciones tuvieron una correlación alta con los hemocitos AM, en particular los hemocitos a gránulos SG ($R=0.84$) y GR ($R=0.65$) (Tabla 2B). Luego de los picos de infección se observaron fuertes caídas en todas las subpoblaciones hemocitarias (Figura 20 A). En particular en las GR y SG. La pérdida de H fue menor, lo que resultaría más en términos de riqueza sanguínea.

que esta subpoblación se incrementara coincidiendo con cada caída de los hemocitos a gránulos (SG, GR). Se observó además una relación lineal inversa significativa entre el porcentaje de H y la infección por WSSV en particular durante los picos de infección ($R=0.98$) (Figura 20 B). Por otra parte hubo pérdida de la población de hemocitos GR correlacionada al nivel de infección en particular durante los picos de infección ($R=0.58$).

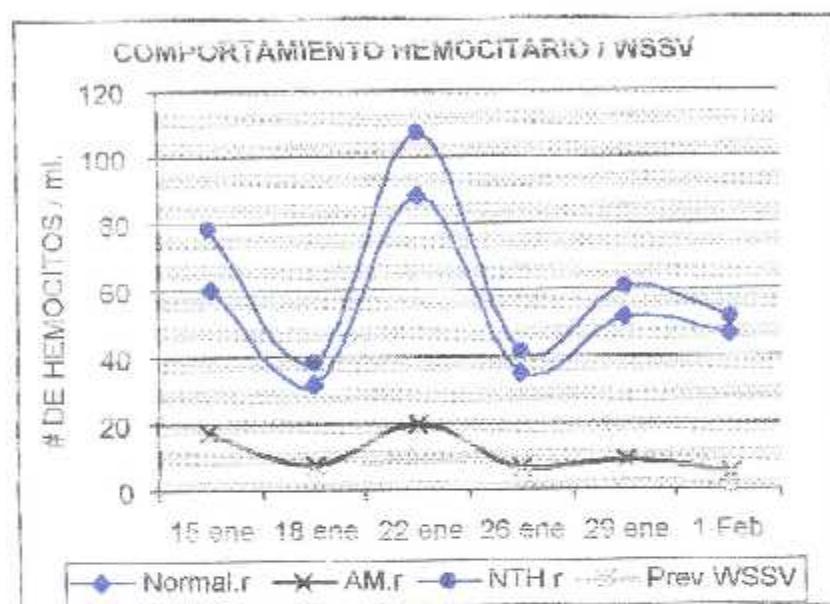


Figura 19. Comportamiento hemocitario y prevalencia de WSSV en los animales de alto nivel de infección. Número de Hemocitos normales en población rosada: Normal.r; Hemocitos anómalos: AM.r; Número total de hemocitos: NTH.r y Prevalencia de WSSV.

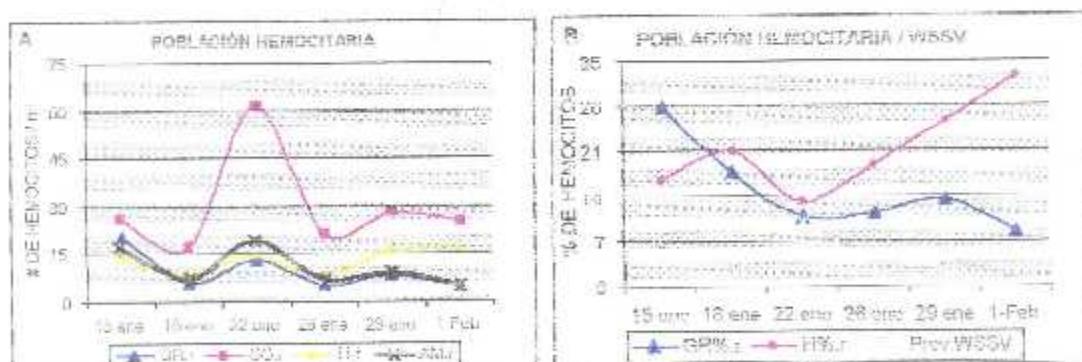


Figura 20 A y B. Población hemocitaria frente a la infección viral. A. Número Hemocitos Granulosos en población rosada: GR.r; Semicranelos: SG.r; Hialinos: H.r y Anómalos: AM.r. B. Porcentaje de Hemocitos Granulosos: GR% r; Porcentaje de Hialinos: H% r y prevalencia de WSSV.

En los animales de alto nivel de infección hubo una fuerte estimulación en la generación de hemocitos (hiperrespuesta), en especial los hemocitos SG. Sin embargo a diferencia de lo observado en los de baja infección, los hemocitos cayeron bruscamente luego de cada pico de infección viral. La pérdida de hemocitos H circulantes fue menos drástica que de los hemocitos a gránulos. Los hemocitos H tuvieron una tendencia ascendente incluso luego de los picos, en tanto que en términos porcentuales como absolutos la caída de hemocitos granulosos fue muy fuerte. Es probable que el origen de la melanización del plasma se deba a la caída de hemocitos con gránulos luego de las hiperrespuestas.

Comparación de la fórmula hemocitaria entre los dos grupos de animales

En la figura 21 A, B, C y D, se representa el comportamiento de los hemocitos en términos absolutos en los dos grupos de animales, durante el muestreo. Como se puede observar en los animales de fuerte carga viral, hubo mayor estimulación en la generación de hemocitos. En los animales rosados la caída de los hemocitos SG fue más fuerte luego de cada pico de infección (Figura 21 A). En los animales menos infectados la caída de hemocitos GR se mantuvo hasta que la presencia viral fue controlada el 22 de enero. En los animales rosados en los cuales la infección perduró hasta el final de los muestreos los GR continuaron declinando (Figura 21 B).

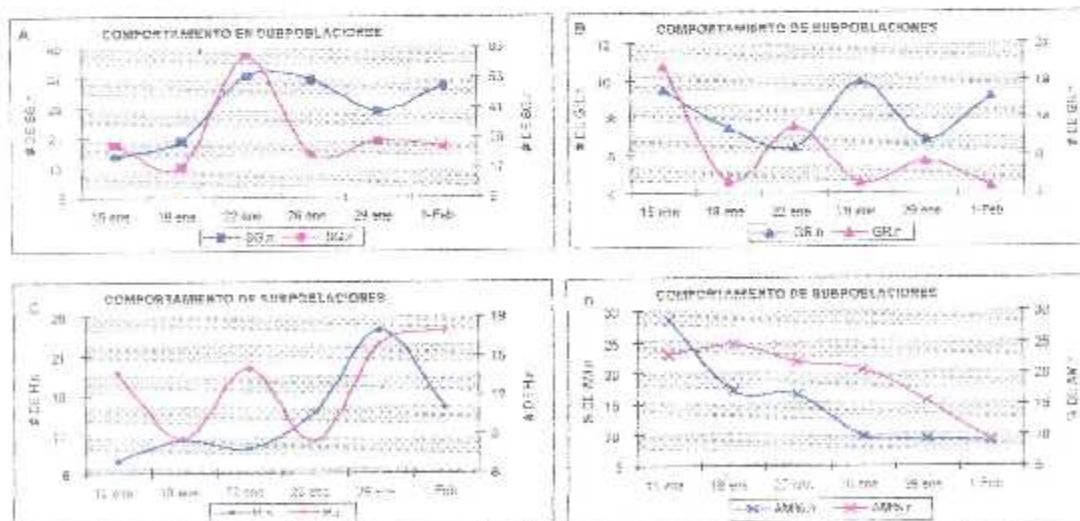


Figura 21 A, B, C y D. Comparación del comportamiento de las subpoblaciones hemocitarias frente a la infección viral en todos los animales de hemolinfa azul y hemolinfa rosada. Número de Semigranulosos normales y rosados; SG.n y SG.r, Giromiosas GR.n y GR.r, Heminas H.n y H.r y porcentaje de Anómalos: %AM.n y %AME.

En los animales de menor carga viral el número de hemocitos H fue menor durante los picos que en los de mayor carga viral. No se debe descartar que en los primeros hemocitos hayan sido eficazmente utilizados para combatir el virus en esos momentos de fuerte infección (Figura 21 C).

Si bien en los dos grupos de animales el porcentaje de hemocitos AM declinó con el tiempo, este fue mayor en los animales de hemolinfa rosada (Figura 21 D).

4. 2. 4. Otros parámetros inmunitarios

Anión Superóxido

En los animales de baja infección, los hemocitos H serían los principales productores de O_2^- teniendo así una relación directa de ($R=0.59$) (Figura 22 A), en particular durante los picos de infección ($R=0.96$). En los animales de hemolinfa rosada los hemocitos SG también estuvieron correlacionados con la generación del anión superóxido en particular durante los picos de infección donde hubo una correlación lineal de ($R=1.0$) (Figura 22 B).

Durante los picos de infección en los animales de hemolinfa azul la generación del anión superóxido fue lineal inversa ($R=-0.89$) con la prevalencia del WSSV (Figura 22 C). En los animales de hemolinfa rosada durante los picos de infección la relación fue directa y altamente significativa ($R=0.99$) (Figura 22 D).

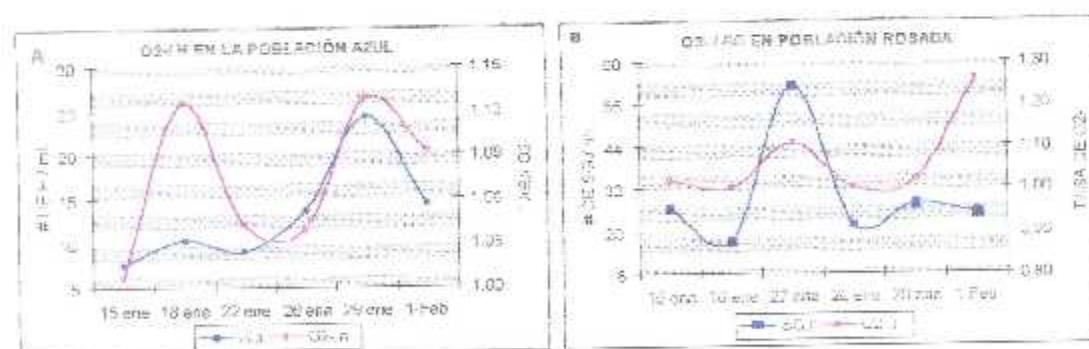
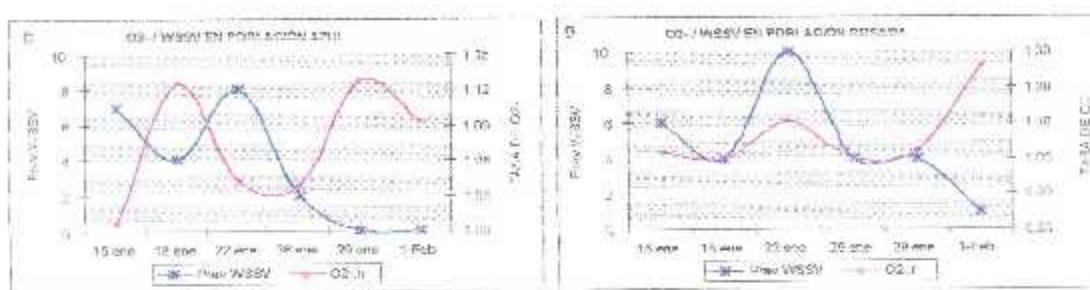


Figura 22. A y B. Respuesta celular oxidativa en la población de animales de hemolinfa azul y rosada. A. Número de Hemocitos Hialinos normales: H.n. con respuesta oxidativa: O₂• y B. Número de Hemocitos Semigranulosos rosados: SG - en respuesta oxidativa: O₂•.



Figuras 22. C y D. Respuesta celular oxidativa en la población de animales de hemolinfa azul y rosada frente al nivel de infeción ocasionado por el WSSV. **C y D.** Prevalencia del WSSV en las dos poblaciones frente a la respuesta oxidativa O_2^- de las dos poblaciones.

En los animales de hemolinfa azul, el superóxido estuvo correlacionado a los hemocitos H y los dos tuvieron relación con la prevalencia del WSSV. En el caso de los animales de hemolinfa rosada, en los cuales se dio una hipertrespuesta, los SG intervinieron también en la generación de superóxido, siendo ellos los responsables de los picos O_2^- , que coincidieron con los picos de infección por WSSV. Estos resultados sugieren que la fagocitosis y los radicales de oxígeno serían una de las principales armas en la estrategia antiviral de los camarones.

Actividad Fenoloxidasa

Durante los picos de infección, en los animales de hemolinfa azul, la actividad PO cayó de manera directa con la caída de hemocitos GR ($R=0.93$), llegando a su punto más bajo el 26 de enero (Figura 23 B).

Este descenso estuvo probablemente relacionado al incremento de hemocitos H en esa fecha. La actividad PO fue muy baja en los animales de hemolinfa rosada durante los picos de infección, recuperándose tan solo al final del muestreo. En estos animales la actividad PO fue anormalmente alta en el plasma.

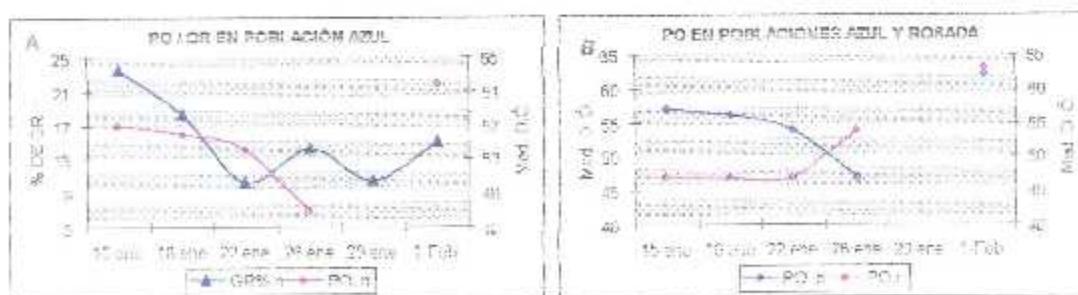


Figura 23 A. Actividad PO en hemocitos GR en poblaciones de hemolinfa normal: PO% en GR% y **B.** Comparación de la Actividad PO en animales de hemolinfa azul y rosada.

Actividad Antibacteriana

En los animales de hemolinfa azul se encontró relación directa lineal entre la actividad antibacteriana y los SG ($R=0.70$) (Figura 24 A), en los de alta carga viral esta relación también se dio en porcentaje con los hemocitos H ($R=0.57$). En los dos grupos de animales se encontró una correlación positiva entre la actividad antibacteriana y la concentración de proteínas en el plasma, esto fue particularmente claro en los animales rosados durante los picos de infección donde la correlación fue de ($R=1.0$) (Figura 24 B). El plasma de los crustáceos posee moléculas con características microbicidas, como la pacifistina (Söderhäll, 1990) que podrían ser también responsables de la correlación observada entre concentración de proteínas plasmáticas y la actividad antibacteriana.

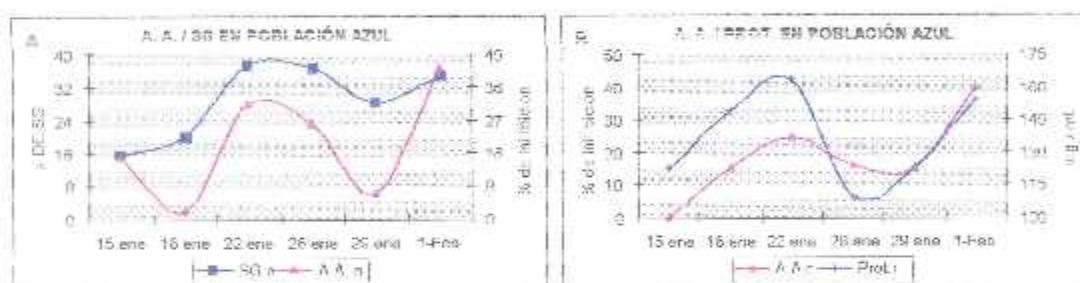


Figura 24 A. La actividad antibacteriana: A. A. en los hemocitos SG durante los muestrazos. B. Relación de Actividad Antibacteriana con la Concentración de Próteinas Plasmáticas. Prot. en la población rosada.

Concentración de Proteínas Plasmáticas

En los animales de hemolinfa azul, se encontró una relación directa lineal entre proteínas y hemocitos H ($R=0.63$) (Figura 25 A) y SG ($R=0.60$). En tanto que en los animales de hemolinfa rosada esta relación se dio solamente con los hemocitos SG ($R=0.54$) (Figura 25 B).

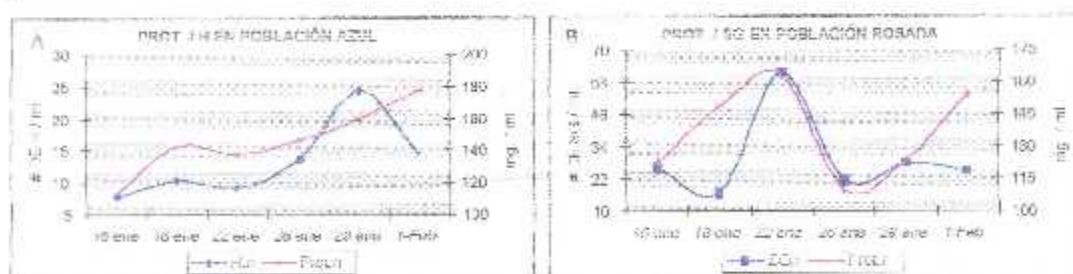


Figura 25 A y B. Concentración de Prot. en la población hemocitaria durante los muestrazos. A. Prot. En hemocitos H de población normal y B. Prot. En hemocitos SG de la población rosada.

Curiosamente en las dos poblaciones la concentración de proteínas plasmáticas tuvo relación directa significativa con el superóxido (Figuras 26 A y B, tabla 1 y 2).

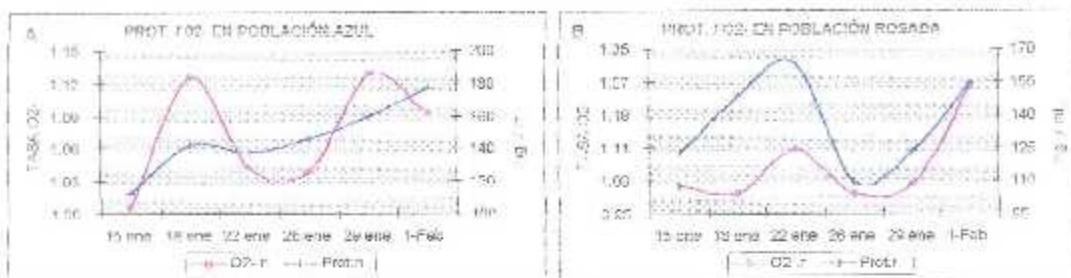


Figura 26 A y B. Relación de Concentración de Proteínas Plasmáticas con la saturación de O₂ en las poblaciones de animales de hemolinfa normal (A) y rosada (B).

En los animales de hemolinfas rosadas los hemocitos SG aparentemente asumen funciones de H, particularmente durante los picos de infección. Sin embargo no se puede descartar errores en el hemograma de los primeros, ocasionados por hemocitos H que ganen refringencia y tamaño por procesos de fagocitosis y sean cuantificados como SG.

4. 2. 5. Ciclo de Muda en relación a parámetros inmunitarios y grado de infección con WSSV

La fórmula hemocitaria se modificó a lo largo del ciclo de muda. En los animales de hemolinfa azul los hemocitos SG estuvieron presentes en postmuda ($R=0.70$) y premuda tardía ($R=0.83$). En tanto que los H fueron más abundantes a lo largo de la premuda temprana ($R=0.75$) y tardía premuda ($R=0.57$). Siendo su concentración más baja en el periodo de intermuda ($R=0.82$). Durante los picos de infección se incrementaron en intermuda las GR ($R=1.0$) y el porcentaje de hemocitos H. Los hemocitos SG estuvieron presentes en tardía premuda ($R=1.0$) y postmuda ($R=0.98$) (Tabla 3).

Las funciones inmunitarias también se modificaron según el estadio de muda. Encontrándose las correlaciones más fuertes y significativas entre la actividad PO y células GR en intermuda, anión superóxido y células H en temprana premuda. Actividad Antibacteriana y células SG en postmuda y tardía premuda.

En los animales de hemolinfa rosada la fórmula hemocitaria fue diferente encontrándose el mayor número de hemocitos granulosos en postmuda ($R=0.88$). Sin embargo durante los picos de infección la mayor concentración de hemocitos SG se mantuvo en premuda tardía.

($R=0.84$), y el mayor porcentaje de H en temprana premuda ($R=0.98$)

Tanto en los animales de hemolinfa azul como en los rosados hubo una correlación directa entre el WSSV y la intermuda, las relaciones fueron siempre inversas con la temprana premuda, particularmente durante los picos de infección Nm ($R=-0.96$) y rosadas ($R=-1.0$) (Figura 27).

En los picos de infección las correlaciones entre animales en temprana premuda y WSSV fue más alta en los de hemolinfa rosada ($R=-0.96$) y ($R=-0.95$), que en los de hemolinfa azul ($R=-0.5$).



Figura 27. Porcentajes de animales en los diferentes estadios de muda, durante el muestreo.

Se observó el menor número de animales infectados en temprana premuda especialmente en D0. En D1 se incrementó la intensidad de la infección aunque no el número de animales infectados. El mayor número de animales infectados se encontraron en C y D2. (Tabla 3) En el estadio C existieron muchos animales infectados en su mayoría en nivel 1 de PCR.

	D	C	D0	D1	D2	D3	E
PCR-	4	9	12	24	13	6	1
PCR+1	3	12	7	5	11	1	0
PCR+2	0	0	0	1	3	0	0
PCR+3	0	0	0	1	0	0	0
PCR+4	0	1	1	4	0	0	0
% PCR-	57	41	62	69	48	56	100
% PCR+	43	59	38	31	52	44	0

Tabla 3. Nivel de infección por PCR en los estadios de muda.

La infección en el estadio C podría estar relacionada con el apetito de los animales y sus hábitos caníbales. En intermida los animales ingieren mucho alimento, por otra parte los animales de hemolinfa rosadas fueron de mayor talla que los de hemolinfa azul (a pesar de que las diferencias de peso no fueron significativas). Los animales de rápido crecimiento podrían ser también los de mayor apetito y los más caníbales por lo tanto los de más fuerte infección. Los resultados de muda confirman que los H₂ y la generación del O₂ son elementos claves en la estrategia antiviral, y se relacionan fuertemente con los animales de hemolinfa normal en temprana premuda.

4. 2. 6. Perfil Electroforético de Proteínas Plasmáticas

Como se puede observar en la figura 28 en los animales de hemolinfa rosada hubo mayor concentración de hemocianina.

Estos resultados coinciden con los reportados por Kim *et al.* (1999) en *Penaeus chinensis* infectado con WSSV. El WSSV ataca agresivamente el epitelio branquial no podría descartarse que se inicie un proceso de anoxia que estimule en los animales infectados a la generación de hemocianina.

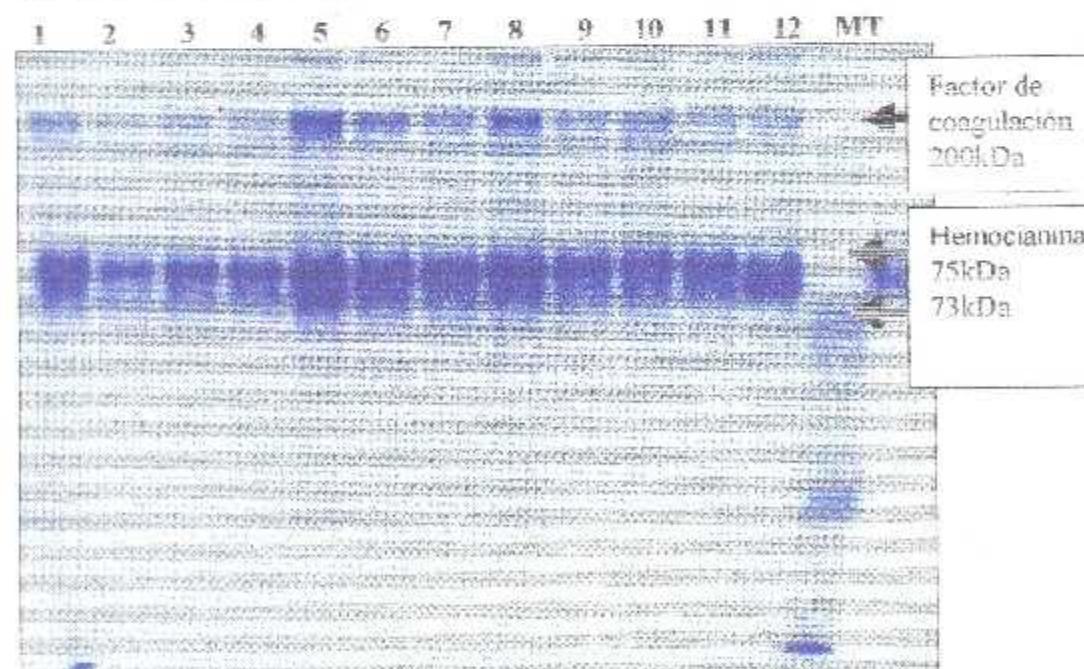


Figura 28. Perfil de proteína plasmática de animales infectados con WSSV. Líneas 1, 2 y 3 animales de hemolinfa azul con menor concentración de hemocianina. Líneas 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 11 animales de hemolinfa rosada, con alta concentración de hemocianina. 12 animales no infectados (control). Muestra de talla: MT.

El periodo de muestreo coincidió con dos picos de infección de WSSV, sin embargo la mortalidad no fue excesiva en ese momento (5% de la población inicial). En el análisis de estos datos de población hay que considerar que el muestreo ocurrió en la estación más calurosa (enero), situación que sin duda contribuyó a incrementar la supervivencia. Por otra parte fue muy interesante la alta correlación entre prevalencia y el nivel de infección. La cual indicaría que la proporción del virus debe estar acompañada de animales severamente infectados.

Sin descartar que los hemocitos puedan ser infectados por el virus como lo señalan varios autores, nuestros resultados en ultraestructura no revelaron replicación viral en los hemocitos anómalos, ellos aparentaron ser células activadas, en proceso de muerte celular (hemocitos pionoticos), o en fagocitosis.

Kobayashi y Söderhal (1990) demostraron en el cangrejo de agua dulce que la presencia de hongos parásitos con infección subletal activa los hemocitos de *Pacifastacus lenfusculus* y esta activación provoca alteraciones en el perfil de fijación de la superficie de los hemocitos. Nuestros resultados mostraron muchas vacuolas en los hemocitos, las cuales encerraron material particular no identificado y membranas. Esta vacuolización es tomada como fagocitosis de partículas virales degradadas y/o de restos de células infectadas. Durand *et al.* (1996) demostraron la capacidad de fagocitosis del WSSV por parte de los hemocitos de camarón.

Las imágenes de microscopía óptica y la ultraestructura sugieren que los hemocitos en pionosis y cariorrexis, podrían tratarse de cuerpos apoptóticos. Sahtout *et al.* (2001) reportaron además fragmentación del ADN (indicador de anóptosis) en las células intersticiales del hepatopáncreas de animales infectados por WSSV, la ubicación de estas células las señala como hemocitos. La apoptosis es un mecanismo que puede ser empleado como una estrategia antiviral, células infectadas entran en apoptosis, proceso que no solo destruye el ADN propio sino también el viral, el material celular permanece encerrado por la membrana citoplasmática en tanto que envía señales de no propio al sistema inmune, el mismo que responde fagocitando. Por otra parte en los vertebrados la apoptosis es también un mecanismo de eliminación de las células inmunitarias senescentes, las cuales son fagocitadas sin liberar su peligroso contenido y por lo tanto sin desencadenar inflamación, las

células fagocitadoras tampoco liberarían mediadores de la inflamación como las cytokinas (Savill *et al.*, 1993). Los hemocitos desgastados en el proceso de defensa contra el WSSV, podrían ser eliminados mediante este mecanismo. Esto ha sido sugerido por observaciones realizadas en el CENAIM que muestran encapsulaciones de células infectadas o pionóticas sin señales de melanización. La respuesta celular sería proporcional al grado de infección; por lo tanto la infección por WSSV se refleja en el hemograma con la aparición de hemocitos anómalos. Los hemocitos anómalos serían generados principalmente por los hemocitos hialinos y los hemocitos granulosos.

Si bien el número de hemocitos anómalos reflejaron el nivel de respuesta celular, nuestros resultados sugieren que en términos de porcentajes, este debe mantenerse bajo, cuando se incrementó, la hemolinfa se tornó rosada a causa de una inadecuada actividad PO plasmática. Altos porcentajes de hemocitos anómalos implicarían por una parte baja capacidad de reemplazo de hemocitos frescos y por otra, libre circulación de células inmunitarias desgastadas o apoptóticas, las cuales al no ser eliminadas liberarían peligrosamente su contenido en la circulación (sistema proPO), como ocurre con las células inmunitarias de los vertebrados (Savill *et al.*, 1993). El mecanismo para evitar esto en los camarones sería generar nuevos hemocitos. En microscopía óptica se ha observado células pionóticas encapsuladas hasta por 8 hemocitos en promedio (datos no publicados).

Los hemocitos SG son los que más se incrementaron, tanto en animales de hemolinfa azul como en los de hemolinfa rosada. Guardando en todos los casos relación directa con las células Nm y el NTH. Podría decirse que ellos mantienen el balance celular en la hemolinfa. Cada caída como las observadas en los animales de fuerte carga viral, representaría animales desarmados para eliminar de circulación, partículas virales, células infectadas, o hemocitos desgastados. Momoyama *et al.* (1994) observaron en camarones afectados por WSSV células infectadas encapsuladas. Segundo Tsing (1881) y Persson (1987) los hemocitos semigranulosos están implicados en los procesos de encapsulación.

Los hemocitos SG estarían involucrados en las actividades antibacterianas y guardaron relación con la concentración de proteínas plasmáticas. Los hemocitos SG producen y liberan peneidinas (Destourieux *et al.*, 2000), estos péptidos podrían ser en parte los responsables de la actividad antibacteriana. En los animales de fuerte carga viral ellos están

relacionados también a la generación de superóxido. La caída de hemocitos SG hace caer también la actividad antibacteriana, lo cual favorecería la aparición de infecciones secundarias. En los animales de baja carga viral durante el periodo de infeción nunca se observó declinación en la concentración de hemocitos. Ante la infección los animales respondieron generando hemocitos, mientras más aguda fue la infección mayor fue el número de hemocitos generados. Esta generación de hemocitos sugiere la capacidad en el camarón de reconocer al WSSV como no propio y de actuar contra él de manera análoga a la observada en animales infectados con hongos cuando se inyectan bacterias, en otros artrópodos. En la cucaracha el descenso provocado por la inyección de *Enterobacter cloacae*, es seguido de la proliferación de hemocitos. En *M. japonicus* la infección con *Fusarium solani* provoca el incremento de hasta 6 veces de hemocitos circulantes (Sequeira et al., 1996).

En base a estos resultados proponemos el siguiente modelo de respuesta celular:



Figura 29. Activación celular en el camarón *T. vannamei*.

Por otra parte los datos sugieren que la concentración de hemocitos hialinos así como la fagocitosis y la generación de radicales de oxígeno serían piezas claves de la estrategia antiviral. Por una parte la generación de hemocitos hialinos fue fuertemente estimulada, al punto de observarse incremento en el porcentaje de hemocitos hialinos entre los picos de infección de los animales de alta carga viral. Este incremento en el porcentaje de hemocitos hialinos ya fue observada por Henning et al. (1999) en *Fenneropenaeus chinensis* infectado por WSSV. Además en los animales fuertemente infectados los hemocitos SG, al parecer incrementan su capacidad oxidativa. La conducta de los hemocitos GR, guardó relación con los hemocitos AM y disminuyó en porcentaje hasta prácticamente no detectar su presencia.

en la hemolinfa, en relación directa a los hemocitos AM, este grupo celular sería el menos generado en número, o el más utilizado, en efecto en *M. japonicus* este sería el principal grupo hemocitario implicado en la encapsulación (Tsing, 1987).

En base a los resultados obtenidos, proponemos el siguiente modelo de infección en los estanques. El detonante de las mortalidades sería el canibalismo. Sin embargo no todos los animales se infectan en el mismo grado. Soto *et al.* (2001), encontraron que los animales que ingieren céfalo torax tienen una tasa de mortalidad de 0.75 en tanto que los que ingieren abdomen tuvieron una tasa de mortalidad de 0.40.

Infección en el estanque

CANIBALISMO

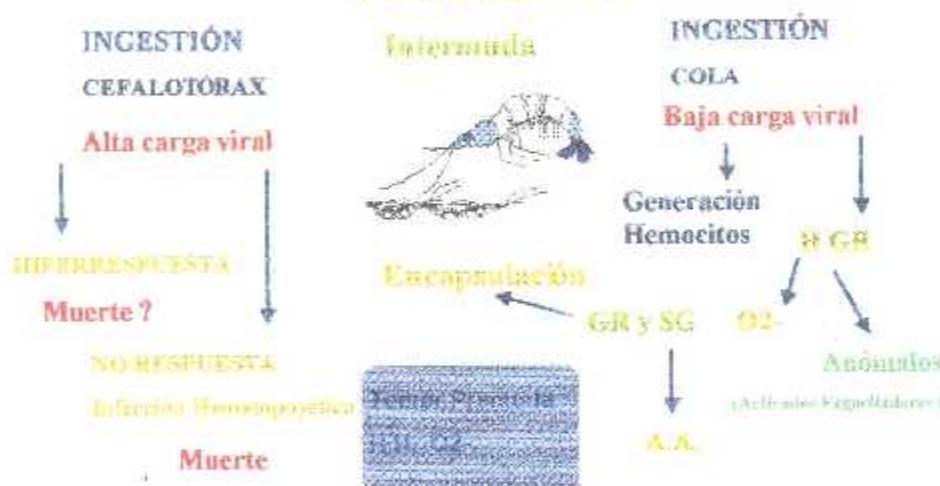


Figura 30. Infección por canibalismo en un estanque.

Posiblemente el primer encuentro de los animales de hemolinfa azul (baja carga viral) con el virus fue poco intenso y este actuó como inmunostimulante, los camarones responderían desplegando mecanismos de defensa que fueron desde el incremento del número de hemocitos hasta la intervención de estos en fagocitosis y/o infiltraciones en los tejidos con encapsulación de células infectadas o hemocitos desgastados. Un sistema immune activo reduciría las posibilidades de reinfección y la presencia prolongada de los antígenos virales provenientes de animales de alta carga incrementaría las defensas del huésped en función del tiempo.

En los animales de hemolinfa rosada tal vez la primera infección fue muy agresiva, desencadenando una hiperrespuesta que desgasta el sistema immune del animal haciéndolo

más susceptible a reinfecciones, cada reinfección provocaría una consiguiente caída de los hemocitos. Situación que se observa como incrementos y descensos bruscos tanto de la infección como de las poblaciones hemocitarias en función del tiempo. El descenso del NTH en camarones infectados por WSSV ha sido reportada por Kim *et al.* (1999) y por Henning *et al.* (1998). Es muy interesante el hecho de que existen animales de hemolinfa rosada negativos al WSSV por PCR, evidenciando que la hiperrrespuesta puede ser muy eficaz para eliminar al virus. Probablemente la mortalidad se da posiblemente en aquellos animales que aún empleándola no logran controlar la carga viral el virus infecta el tejido hematopoyético afectando la capacidad de respuesta del animal. Los datos de mortalidad en ese periodo (12%) sugieren fuertemente que no todos los animales de hemolinfa rosada mueren, ellos llegaron a constituir el 50% de los animales muestrados durante los picos de infección del 15 y el 22 de enero.

Los resultados sugieren además que en temprana premuda se decide la suerte del camarón, muchos animales eliminarían al virus en ese momento y esa eliminación estaría relacionada a los hemocitos hialinos y a la generación de superóxido, los que no logran eliminar el virus pasan con fuerte infección a tardía premuda muriendo en la muda. Otero (2000) encontró que el 97% de los animales infectados experimentalmente mueren en postmuda (estadios A y B).

Sin embargo a pesar de los mecanismos de defensa desplegados, los camarones pierden en la mayoría de casos y las supervivencias en piscina son extremadamente bajas, en particular durante la estación fría. Para comprender esto hay que considerar dos cosas. La primera, la densidad de la población. Las condiciones estresantes de las piscinas permitiría que los animales más débiles desarrollen la enfermedad, siendo los primeros en morir. Los hábitos caníbales de los camarones, provocarían un agresivo ataque viral desencadenando grandes mortalidades en el estuario. Estos resultados son corroborados por el hecho de que el mayor número de animales infectados se encontró en intermuda cuando es mayor la ingestión de alimento, en efecto Molina *et al.* (2000) encontraron que el consumo de alimento en estadios B, C, D0 fue 18 % más alto que en tardía prenuda.

La segunda, la velocidad de replicación viral. Tang & Lighner, 2000, utilizando una PCR competitiva para cuantificar el genoma de WSSV luego de una infección por inyección,

determinaron que a 35 horas de infección la cantidad de génomas en la hemolinfa fue 49 veces menor al número de génomas en los tejidos del cefalotorax. En la hemolinfa el WSSV se incrementó 6 veces de 24 a 35 horas; en el mismo lapso la cantidad de WSSV se incrementó 140 veces en los tejidos. Si el incremento de WSSV en la hemolinfa está dado principalmente por fagocitosis, obviamente el virus actúa más rápido que las defensas del animal. La infección sería irreversible cuando el tejido hematopoyético es infectado.

En términos prácticos, el hemograma se ha revelado muy útil para comprender e incluso diagnosticar la infección. Es poco probable que un hemograma revele el grado de infección causado por el WSSV, pero si puede alertar sobre la existencia de alguna anomalía causada por algún agente patógeno y ayudar a evaluar las estrategias de manejo empleadas para combatir los efectos del WSSV.

Por otra parte, la apariencia en los animales ayuda a definir la presencia de algún patógeno en los camarones. La condición normal de un animal está establecida mientras este no presenta síntomas externos. En el caso de camarones con problemas de infección, ocasionado por el WSSV, los animales presentaron apariencia rosada o anormal. Animales de apariencia alterada presentaron una relación directamente proporcional al grado de infección.

CONCLUSIONES

La prevalencia del WSSV estuvo correlacionada al nivel de infección.

Los animales negativos al virus son aquellos capaces de eliminar el virus y de generar nuevas poblaciones hemocitarias. La infección viral estimuló la generación de las tres poblaciones hemocitarias (hialinas, granulosas y semigranulosas). En los animales con baja carga viral, durante el periodo de infección nunca se observó declinación en la concentración de hemocitos.

La concentración de hemocitos anómalos guardó relación directa con el nivel de infección por White Spot Syndrome Virus (WSSV). Los hemocitos anómalos serían hemocitos activados, fagocitadores o apoptóticos, y serían originados por los hemocitos granulosos y los hemocitos hialinos.

Los hemocitos hialinos y la generación de anión superóxido tuvieron correlación inversa con los hemocitos anómalos, la proteína y el nivel de infección dada por el WSSV.

Los animales se infectaron en intermuda (C) debido al alto consumo de alimento. En temprana premuda hubo mayor producción de hemocitos hialinos y anión superóxido hecho que sin duda ayudaría a la eliminación viral. Y los que no logran eliminar el virus, en temprana premuda (D0 y D1) desarrollan la viremia, encontrándose los casos más severos en tardía premuda (D2 y D3).

Los hemocitos semigranulosos, por su alto incremento mantienen bajo el porcentaje de hemocitos anómalos y son por lo tanto los encargados del equilibrio en la hemolinfa. La disminución de los hemocitos semigranulosos hace caer también la actividad antibacteriana, lo cual favorece la aparición de infecciones secundarias en los animales durante el periodo infeccioso.

Las células desgastadas no eliminadas que se incrementan en la circulación terminarían liberando sistema proPO

El hemograma reflejó el estado de salud del camarón, según el porcentaje de hemocitos anómalos encontrados en circulación.

Hubo mayor concentración de hemocianina en animales de mayor carga viral.

Tanto el color de la hemolinfa como apariencia alterada de los animales se correlacionó con el nivel de infección por el WSSV.

RECOMENDACIONES

- Realizar muestreos rutinarios en las piscinas camaroneras, donde se tomen en consideración parámetros como: hemogramas, para un mejor control del estado de salud de los organismos, observando además la apariencia del animal, y la presencia de signos clínicos.
- Controlar estadios de muda, para prevenir los momentos de riesgo (tardía premuda) y / o aprovechar la postmuda y la intermuda para aplicar medidas profilácticas que atenúen los efectos del canibalismo, el cual sería más fuerte en intermuda.
- Estudiar los efectos de moléculas como: inmunoestimulantes, vitaminas o probióticos, que incrementan el número total de hemocitos, así como la concentración de células hialinas y su capacidad oxidativa, para reforzar la respuesta celular en las piscinas infectadas por WSSV.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alday, V., 1999. Diagnóstico y prevención de la enfermedad del punto blanco. Mundo acuícola. 5 (1): 3-6.
- Alday, V., 2000. Factores que detonan una epidemia. El virus de la Mancha Blanca no es nuevo en el Ecuador. Mundo acuícola. 6 (1): 8-10.
- Amirante, A., 1986. Cellular immunoresponses in crustaceans. In: Gupta, A. P. (Editor) Hemocytic and Humoral Immunity in Arthropods. John Wiley and Sons, Inc, Chichester: 61-77.
- Anderson, R. S., 1994. Hemocyte – derived reactive oxygen intermediate production in four bivalve mollusks. Dev. Comp. Immunol. 18, 89-96.
- Anggraeni, M.S. and Owens, L., 2000. The haemocytic origin of lymphoid organ spheroid cell in the penaeid prawn *Penaeus monodon*, Dis. Aquat. Org. 40N 85-92.
- Ashida, M. and Brey, T., 1995. Role of the Integument in Insect Defense: Pro-phenoloxidase Cascade in the Cuticular Matrix. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 92. Invertebrate Immunology. Cap. 16 pp, 355-374.
- Apud, F., Primavera, H and Torres, Jr. 1983. Farming of prawns and shrimp. Southeast Asian Fisheries Development Center. Extension Manual (5): 1 – 67.
- Aquacop., 1977. Observation sur la maturation et la reproduction en captivité des crevettes penaeides en milieu tropical. Actes de Colloques du ONEXO 4: 157- 178 (in French with English abstract).
- Aquacop., 1979. Penaeid reared broodstock: closing the cycle of *Penaeus monodon*. *P. stylirostris* and *P. vannamei*. Proceedings of the World Mariculture Society 10: 445 – 452.
- Bachére, E., Miahle, E., Noël, T., Boulo, V., Morvan, A., Rodriguez, J., 1995a. Knowledge and Research prospects in marine mollusks and crustacean immunology. Aquaculture, 132, pp. 17-32.
- Bachére, E., Miahle, E., Rodríguez, J., 1995b. Identification of defense effectors in the haemolymph of Crustaceans with particular reference to the shrimp *P. japonicus* (Bate). prospects and applications. Fish & Shellfish Immunology 5, 597-612.

- Bell, T. and Lightner D., 1988. A handbook of normal penaeid shrimp histology. World Aquaculture Society, Baton Rouge, L. A
- Brostoff, Humpreyst, T., Reinherz, L., 1997. Immunología. Cuarta edición (en español).
- Browdy, C., Samocha, M., 1985. The effect of cyststalk ablation on spawning, molting and mating of *Penaeus semiculatus*. De Haan. Aquaculture 49: 19 – 29.
- Cedeño, R., 1998. Evaluación clínica de ensayos inmunitarios en camarón *Penaeus vannamei*. Tesis de Acuicultura. Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar. Escuela Superior Politécnica del Litoral-Ecuador.
- Chaga, O., et al., 1995. The hematopoietic cell of the freshwater crayfish, *Pacifastacus leniusculus*. Anim. Biol. 4,59-70. Aquaculture 191: 45-52.
- Chang, P.S., Lo, C.F., Wang, Y.C., Kou, G.H., 1996. Identification of white spot syndrome associated baculovirus (WSBV) target organs in the shrimp *Penaeus monodon* by in situ hybridization. Diseases of Aquatic Organisms. 27: 131-139. Aquatic No. 8, 1999.
- Chisholm, J. and Smith, V., 1992. Antibacterial Activity in the Haemocytes of Shore Crab, *Carcinus maenas*. J. Mar. Biol. Assoc, U. K. 74: 979-982
- Chou, H., Huang, C.Y., Wang, C.H., Chiang, C.H., Lo, C.F., 1995. Pathogenicity of baculovirus infection causing white spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Taiwan. Diseases of Aquatic Organisms. 23: 165-173.
- Chou, H., Huang, Y., Wang, C.H., 1998. Studies on transmission of white spot syndrome associated baculovirus (WSBV) in *Penaeus monodon* and *P. japonicus* via waterborne contact and oral ingestion. Aquaculture. 164: 263-276.
- Christensen, and Nappy, 1988. Immune Responses of Arthropods. Animal and Plant Sciences
- Cociancich, S., Dupot, A., Hegy, G., Lanot, R., Holder, F., Hetru, C., Hoffmann, J., Bulet, P., 1994. Novel inducible antibacterial peptides from a hemipteran insect, the sap-sucking bug, *Pyrrhocoris apterus*. Biochem. J. 300, 567 – 575.

- Crocos, J., kerr, D., 1983. Maturation and spawning of the banana prawn *P. merguiensis* de Man (Crustacea: Penaeidae) in the Gulf of Carpentaria Australia. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 69: 37 – 59.
- Destoumieux, D., Bulet, P., Loew, D., Van Dorsselaer, A., Rodriguez J., Bachére, E., 1997. Penaeidins, a new family of antimicrobial peptides isolated from the shrimp *Penaeus vannamei* (Decapoda). J Biol. Chem. Journal of Cell Science 113, 461-469 (2000).
- Destoumieux, D., Bulet, P., Loew, D., Van, Dorsselaer, A., 1999. Recombinant expression and range of activity of penaeidins, antimicrobial peptides from penaeid shrimp. Eur. J. Biochem. Journal of Cell Science 113, 461-469 (2000).
- Destoumieux, D., Muñoz, M., Cosseau, C., Rodriguez. J., Bilet, P., Comps, M., Bachére, E., 2000. Peneids, antimicrobial peptides with chitin-binding activity, are produced and stored in shrimp granulocytes and released after microbial challenge. Journal of Cell Science, 113: 461-469.
- Durand, S., Lightner, D.V., Nunan, L.M., Redman, R.M., Mari, J., Bonami, R., 1996. Application of gene probes as diagnostic tools for White Spot Baculovirus (WSBV) of penaeid shrimp. Dis. Aquat. Org. 27: 59-66.
- Durand, S., Lightner, D.V., Redman, R.M., Bonami, R., 1997. Ultrastructure and morphogenesis of White Spot Syndrome Baculovirus (WSSV). Dis. Aquat. Org. 29: 205-211.
- Echeverría, R.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.
- Fernández – Luna, I., 1998. Encimes digestives, croissance et aquaculture des crevettes *Penaeus Schmitti* et *Penaeus notialis*. These de Docteur du museum national d'histoire naturelle. France 187 pp.
- Flegel, T.W., 1997. Special topic review, major viral diseases of the black tiger prawn *P. monodon* in Thailand. World J. Microbiol. Biotechnol. 13, 433-442.

- Fraser, A. and Owens, L., 1996. Spawner-isolated mortality viruses from Australian *P. monodon*. Dis. Aquat. Org. 27: 141-148.
- Ghiretti-Magaldi, A., 1977. Hematopoiesis in crustaceans decapoda: origin and evolution of hemocytes and cyanocytes of *Carcinus maenas*. Cell Differ. 6, 167-186. Aquaculture 191: 45-52.
- Hasson, K.W., Lightner, D.V., Poulos, B.T., Redman, R.M., White, B.L., Brock, J.A., Bonami, J. R., 1995. Taura syndrome in *P. vannamei*: demonstration of a viral a etiology. Dis. Aquat. Org. 23: 115-126.
- Hasson, K.W., 1998. Taura syndrome in marine penaeid shrimp: discovery of the viral agent and disease characterization studies. PhD dissertation. University of Arizona, Tucson.
- Hasson, K.W., Lightner, D.V., Monney, L.L., Redman, R.M., White, B.L., 1999. Role of lymphoid organ spheroids in chronic Taura Syndrome Virus (TSV) infections in *Penaeus vannamei*. Dis. Aquat. Org. 38: 93 – 105.
- Hasson, K.W., Lightner, D.V., Monney, L.L., Redman, R.M., Poulos, B.T., White, B.L., 1999b. Taura syndrome Virus (TSV) lesion development and the disease cycle in the Pacific white shrimp *P. vannamei*. Dis. Aquat. Org. 36: 81-93.
- Henning, O., Itami, T., Maeda, M., Kondo, M., Natsukari, Y. and Takahashi, Y., 1998. Analyses of Hemolymph Immunoparameters in Kuruma Shrimp Infected with Penaeid Rod-shaped DNA virus. Fish Pathology, 33: 4, 389-393.
- Hose, J. E., Martin, G.G., Tiu, S., McKrell, N., 1992. Haematological and Phenoloxidase Activity Changes in the Shrimp *Penaeus stylirostris* in Relation with the Moult Cycle: Protection against Vibriosis. Fish & Shellfish Immunology. 7, 227-234.
- Hose, J.E., Martin, G.G., Tiu, S., McKrell, N., 1992. Patterns of hemocyte production and release throughout the moult cycle in the penaeid shrimp *Sycionia ingents*. Biol. Bull. 183, 185-189. Aquaculture 191, 45-52.
- Hsu, L., et al., 1995. Development of an *in vitro* subculture system for the organ (lymphoid tissue) of *Penaeus monodon*. Aquaculture 136: 43-55.

- Huang, C., Zhang, L., Zhang, J., Xiao, L., Wu, Q., Chen, D., Li, J., 2001. Purification and characterization of White Spot Syndrome Virus (WSSV) produced in an alternate host: crayfish, *Cambarus clarkii*. *Virus Research*. 76: 115-125.
- Humpreys, T. and Reinherz, L., 1994. Invertebrate immune recognition, natural immunity and the evolution of positive selection. *Immunol Today* 15: 316-320.
- Inouye, K., Miwa, S., Oseko, N., Nakano, H., Kimura, T., 1994. Mass mortalities of cultured kuruma shrimp *Penaeus japonicus*, in Japan in 1993: Epizootiological survey an infection trials. *Fish Pathol.*, 29,135-139. Acuacultura del Ecuador. Vol 33.
- Inouye, K., Yamano, K., Ikeda, N., Kimura, T., Nakano, H., Momoyama, K., Kobayashi, J., Miyajima, S., 1996. The penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV), which causes penaeid acute viremia (PAP). *Fish Pathol.*, 31, 39-45. Acuacultura del Ecuador. Vol 33.
- Johansson, W. and Söderhäll, K., 1985. Exocytosis of the prophenoloxidase activating system from crayfish haemocytes. *J Comp Physiol* 156B: 175 – 181.
- Johansson, W. and Söderhäll, K., 1989. Cellular Immune in Crustaceans and the proPO System. *Parasitology Today*. 5: 6, 171-176.
- Kanchanaphum, P., Wonteerasupaya, C., Sitidilokratana, N., Boonsaeng, V., Panyim, S., Tassanakajon, A., Withyachumnarnkul, B., Flegel, T., 1998. Experimental transmission of White Spot Syndrome Virus (WSSV) from crabs to shrimp *Penaeus monodon*. *Dis. Aquat. Org.* 34: 1 – 7.
- Kasornchandra, J. and Boonyaratpalin, S., 1998. Primary shrimp cell culture: Application for studying white spot syndrome virus (WSSV). In: Flegel, T. W. (ed) Advances in shrimp biotechnology. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok, p 273-276.
- Khoo, L., at al., 1999. Callinectin, an antibacterial peptide from blue crab, *Callinectes sapidus*, hemocytes Mar. Biotechnol. *Journal of Cell Science* 113, 461-469. (2000).
- Kim, W., Abele, L. G., 1999. Cambios in *P. chinensis* haemocytes during white spot baculovirus (WSBV) infections. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 19 (5) 213.

- Klein, 1982. Immunology: The science of self-non-self discrimination, A Wiley-Interscience Publication John Wiley & Sons, pp. 424-428.
- Kobayashi, M. and Söderhäll, K., 1990. Comparison of concanavalin a reactive determinants on isolated haemocytes of parasite infected and non-infected fresh water crayfish. *Dis. Aquat. Org.* 9, 141-147.
- Kondo, M., Itami, T., Takahashi, Y., Fuji, R., Tomonga, S., 1994. Structure and function of the lymphoid organ in the kuruma prawn. *Dev. Comp. Immunol.* 18 (Suppl 1) 1: 1-109.
- Le-Moullac, G., 1977. Studies on Haemocyanin and Haemolymph Protein Levels of *Penaeus japonicus* Based on Sex, Size and Moulting Cycle. *Comp. Biochem Physiol.* 106 B. No. 2, 293-296.
- Le-Moullac, G., Le Groumellec, M., Ansquer, D., Frossard, S., Levy, P., Aquacop., 1997. Haematological and phenoloxidase activity changes in the shrimp *Penaeus stylirostris* in relation with the moult cycle: protection against vibriosis. *Fish Shellfish Immunol* 7, 227 – 232.
- Ligthner, D.V., Hedrick, R.P., Fryer, J.L., Chen, S.N., Liao, I.C., Kou, G.H., 1987. A survey of cultured penaeid shrimp in Taiwan for viral and other important disease. *Fish Pathol.* 22 (3): 127-140.
- Ligthner, D.V., (ed) 1996. A handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures for diseases of cultured penaeid shrimp. World Aquaculture Society, Baton Rouge.
- Lo, C.F., Leu, J.H., Ho, C.H., Chen, C.H., Peng, S.E., Chen, Y.T., Chou, C.M., Yen, P.Y., Huang, C.J., Chou, H.Y., Wang, C.H., Kou, G.H., 1996a. Detection of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) in penaeid shrimp, using polymerase chain reaction. *Diseases of Acuatic Organisms.* 25: 133-141.
- Lo, C.F., Ho, C.H., Peng, S.E., Chen, C.H., Hsu, H.C., Chiu, Y.L., Chang, C.F., Liu, F.K., Su, M.S., Wang, C.H., Kou, G.H., 1996b. White spot syndrome baculovirus (WSBV) detected in cultured and captured shrimp, crabs and other arthropods. *Diseases of Acuatic Organisms.* 27: 215-225.

- Lo, C.F., Ho, C.H., Chen, C.H., Liu, F.K., Chiu, Y.L., Yen, P.Y., Peng, S.E., Hsu, H.C., Liu, H.C., Chang, C.F., Su, M.S., Wang, C.H., Kou, G.H., 1997. Detection and tissue distribution of white spot syndrome baculovirus (WSBV) in captured brooders of *Penaeus monodon* with a special emphasis on reproductive organs. *Dis Aquat Org* 30: 53-72.
- Lo, C.F., Chen, C.H., Liu, F.K., Chiu, Y.L., Yen, P.Y., Peng, S.E., Hsu, H.C., Liu, H.C., Chang, C.F., 1997a. White spot syndrome (WSS): pathology, hosts and prevalence in captured shrimp and crabs in Taiwan. In Y. Inui (ed) New approaches to viral diseases of aquatic animals. NRIA International Workshop proceedings. National Research Institute of Aquaculture, Nansei, Watarai, Mie. 516-01, Japan.p. 206-217
- Loh, P.C., Chiu, Y.L., Yen, P.Y., Peng, S.E., 1997. Quantal assay of shrimp viruses in primary shrimp lymphoid cell cultures. In: Maramorosch, K., & Mitsuhashi, J., (eds) Invertebrate cell cultures. Science Publishers Inc, Enfield, NH. 253-259.
- Lorenzo, S., 1999. Effects of LPS injection on circulating haemocytes in crustaceans *in vivo*. *Fish Shell Immunol*. 9, 31-50. *Aquaculture* 191: 45-52.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Lu, Y., Tapay, L.M., Nadala, E.C., Brock, J.A., Loh, P.C., 1995a. Distribution of yellow-head virus in selected tissues and organs of penaeid shrimp *Penaeus vannamei*. *Dis Aquat Org*. 23: 67-70.
- Lu, Y., Nadala, E.C., Brock, J.A., Loh, P.C., 1995b. Development of a quantal assay in primary cell culture for yellow head virus (YBV) of penaeid shrimp. *Virnet*. 52: 231-236.
- Martin, G.G., Poole, D., Hose, J.E., Arias, M., Reinolds, L., 1991. Localization y roles of coagulogen and transglutaminase in hemolymph coagulation in decapods crustaceans. *Comp. Biochem. Physiol*. Vol. 100 B, No. 3, pp. 517-522.
- Martin, G.G. and Hose, J., 1992. Vascular elements and blood (hemolymph). *Microscop. Anat. Inv* 10: 117-146. *INTERCIENCIA*. Vol. 23 No. 6.

- Martin, G., Poole, D., Poole, C., Hose, J.E., Arias, M., Reinolds, L., McKrell, N., Whang, A., 1993. Organization of hematopoietic tissue in the intermoult lobster *Homarus americanus*. *J. Morphol.* 216, 65-78. *Aquaculture*. 191: 45-52.
- Martin, G.G., Hose, J., Minka, G., Rosenberg, S., 1996. Clearance of bacteria injected into the hemolymph of the ridgeback prawn, *Sicyonia ingentis* (Crustacea: Decapoda) role of the hematophoretic tissue. *J Morphol* 227: 227 – 233.
- Molina, C. Cadena, E., 2000. Alimentación de los camarones en relación a la actividad enzimática como una respuesta natural al ritmo circadiano y el ciclo de muda. V Simposium Internacional de Nutrición Acuicola 19-22.
- Momoyama, K., Miraoka, M., Nakano, H., Koube, H., Inouye, K., Oseko, N., 1994. Mass Mortality of Cultured Kuruma Shrimp *Penaeus japonicus*, in Japan in 1993: Histopathological study. Electron microscope evidence of the causative virus. *Fish Pathol.*, 29, 149-158. *Acuacultura del Ecuador*. 33: 26-29.
- Muñoz, 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.
- Murphy, F.A., Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Jarvis, A.W., Ghabrial, S.A., Summers, M.D., Martelli, G.P., Bishop, D.H.L., 1995. Virus taxonomy 6th report of the international committee on taxonomy of viruses. *Arch. Virol. Supplementum* 10, 1-586. *Acuacultura del Ecuador Vol. 33*.
- Nappi, J., 1977. Comparative ultrastructural studies of cellular immune reactions and tumorigenesis in *Drosophila*, pp, 155-188. In L. A. Bulla, Jr., and T. C. Cheng (eds). *Comparative Pathology*. 3. Plenum Press, New York.
- Oka, M., 1996. Studies of penaeus orientalis Kishinouye. VIII structure of the newly found lymphoid organ. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 35 (3): 245-250.
- Omori, S.A., Martin, G.G., Hose, J.E., 1989. Morphology, hemocyte lysis and clotting in the ridgeback prawn, *Sicyonia ingentis*. *Cell Tissue Research*. 255, 117-223.

- Owens, L., De Beer, S., Smith, J., 1991. Lymphoidal parvoviru-like particles in Australian penaeid prawns. *Dis. Aquat. Org.* 11: 129-134.
- Owens, L., Anderson, I.G., Kenway, M., Trott, L., Benzie, J.A., 1992. Infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus (IHHNV) in a hybrid penaeid prawn from tropical Australia. *Dis. Aquat. Org.* 14: 219-228.
- Peng., 1998. The transition from pre-patent to patent infection of white spot syndrome virus (WSSV) in *Penaeus monodon* triggered by pereiopod excision. *Fish Pathology*, 33: 395-400. Aquatic, No. 8.
- Persson, M., Cerenius, L., Söderhäll, K., 1987b. The influence of the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus* Dana, to the parasitic fungus *Aphanomyces astaci*. *J. Fish Dis.* 10, 471-477. *Aquaculture* 191: 45-52.
- Pipe, R.K., 1992. Generation of Reactive Oxygen Metabolites by the Hemocytes of the Mussel *Mytilus edulis*. *Developmental and Comparative Immunology*. 16, 111-122.
- Read, G., 1977. Aspects of lipid metabolism in *Penaeus indicus* Milne Edwards. Masters thesis. University of Natal, Natal. Sounth Africa.
- Rodriguez, J., 2000. El síndrome del virus de la mancha blanca. Puede el sistema inmune del camarón enfrentar al virus agresor?. *Mundo Acuícola*. 6: 1, 11-13.
- Robertson, L., Bray, W., Trujillo, J., Lawrence, A., 1987. Practical molt staging of *Penaeus setiferus* and *Penaeus stylirostris*. *J World Aquacult Soc.* 18: 180 – 185.
- Salt, G., 1963. The defense reactions of insects of metazoan parasites. *Parasitology* 53: 527-642.
- Sahtout, A., Hassan, M.D., Shariff, M., 2001. DNA fragmentation, an indicator of apoptosis, in cultured black tiger shrimp *Penaeus monodon* infected with white spot syndrome virus (WSSV). *Dis. Aquat. Org.* 44: 155-159.
- Savill, J., Fadok, V., Henson, P., and Haslett, C., 1993. Phagocyte recognition of cell undergoing apoptosis. *Immunology Today*. 14: 3, 131-136.
- Schafer, H., 1968. The determination of some stages of the molting cycle of *Penaeus duorarum*, by microscopic examination of the setae of the endopodites of pleopods. *FAO Fisheries Report* 57: 381 – 391.

- Sequeira, T., Tavarest, D., and Arala-Chaves, M., 1996. Evidence for circulating hemocyte proliferation in the shrimp *P. japonicus*. *Devel. and Comp. Imm.* 20: 2, 97-104.
- Sequeira, T., Arala-Chaves, M., Vilanova, M., Lobo-Da-Cunha, A., Baldaia, L., 1995. Flow cytometric analysis of molt-related changes in haemocytes types in male and female *Penaeus japonicus*. *Biol. Bull.* 189, 376 - 380.
- Schnapp, D., Kemp, G. D., Smith, V. J., 1996. Purification and characterization of a proline-rich antibacterial peptide, with sequence similarity to bactenecin-7, from the haemocytes of the shore crab, *Carcinus maenas*. *Eur. J. Biochem. Journal of Cell Science* 113, 461-469.
- Smith, V. and Söderhäll, K., 1983a. Separation of the hemocyte populations of *Carcinus maenas* and other marine decapods and prophenoloxidase distribution. *Developmental and Comparative Immunology*. 7: 229-239.
- Smith, V. and Söderhäll, K., 1984. β -1,3- glucan induced cellular defense reactions in the shore crab, *Carcinus maenas*. *Comp. Biochem. Physiol., Part A: Mol. Integr. Physiol.* 77, 635-639. *Aquaculture* 191; 45-52.
- Smith, V. and Dall, W., 1985. Molt staging the tiger prawn *Penaeus esculentus*. Pages 85 – 93 in P. C. Rothlisberg, B. Hill and D. J. Staples editors. Second Australian National Prawn Seminar. NPS2. Cleveland Australia.
- Smith, V. and Söderhäll, K., 1986. Cellular Immune Mechanisms in the Crustacean. *Symposia of the zoological Society of London*, No. 56, pp. 59-79.
- Söderhäll, K. and Smith, V., 1983. The prophenoloxidase activating system the biochemistry of its activation and role in arthropod cellular immunity, with special reference to crustaceans. In: "Immunity in invertebrates", M. Bréhelin (ed), Springer, Berlin. 208-223.
- Söderhäll, K. and Cerenius, L., 1992. Crustacean Immunity. *Annual Review of fish Diseases*. 3-23.
- Söderhäll, K., Cerenius, L., Johansson, M.W., 1996. The prophenoloxidase activating system in: invertebrates. In *New directions in invertebrate immunology*.

Söderhall, K., Iwanaga, S., and Vasta, G., Editors., SOS. Publications, Fair Have, pp. 229-253.

- Söderhäll, K. and Cerenius, L., 1998. Role of the prophenoloxidase system in invertebrate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 10, 23-28.
- Soto, M.A., Shervette, V.R., Lotz, J.M., 2001. Transmission of white Spot Syndrome Virus (WSSV) to *Litopenaeus vannamei* from infected cephalothorax, abdomen, or whole shrimp cadaver. *Dis. Aquat. Org.* 45: 81-87.
- Supamattaya, K., Hoffman, R., Boonyaratpalin, S., Kanchanaphum, P., 1998. Experimental transmission of white spot syndrome virus (WSSV) from black tiger shrimp *P. monodon* to the sand crab *Portunus Pelagicus*, mud crab *Scylla serrata* and Krill *Acetes* sp. *Dis. Aquat. Org.* 32 (2), 79 – 86.
- Takahashi, Y., Itami, T., Kondom, M., Maeda, M., Fujii, R., Tomonaga, S., Supamattaya, K., Boonyaratpalin, S., 1994. Electron Microscope evidence of bacilliform virus infection in kuruma shrimp (*Penaeus japonicus*). *Fish Pathol.*, 29, 121-125. Acuacultura del Ecuador No. 33 (1999).
- Tang, K. and Lightner, D., 2000. Quantification of White Spot Syndrome Virus DNA through a competitive polymerase chain reaction. *Aquaculture* 189, 11-21.
- Tapay, L.M., Lu, Y., Gose, R.B., Nadala, E.C., Brock, J.A., Loh, P.C., 1997. Development of an *in vitro* quantal assay in primary cell culture for a non-occluded baculo-like virus of penaei shrimp. *Vir Met.* 64: 37-41.
- Tapia, L., 1997. Optimización de ensayos antibacterianos y estudios sobre la inducción de la actividad antibacteriana en la hemolinfa del camarón *Penaeus vannamei*. Tesis de Acuicultura. Facultad de Ingeniería Marina y Ciencias del Mar. Escuela Superior Politécnica del Litoral-Ecuador.
- Tsai, M.F., Kou-G.H., Liu, H.C., Liu, K.F., Chang, C.F., Peng, S.E., Hsu, H.C., Wang, C.H., Lo, C.F., 1999. Long-term presence of White Spot Syndrome Virus (WSSV) in a cultivated shrimp population without disease outbreaks. *Dis. Aquat. Org.* 38: 107-114.

- Tsing, A., 1987. Recherche sur les hécocytes et l'inmunité chez le crustacé *Penaeus japonicus* (Bate, 1881). Thèse Doctorat, Université des Science et Techniques du Languedoc, Option Sciences Biologiques "Immunologie et Hematologie". Montpellier, pp 250.
- Tsing, A., Arciere, J.M., Brehelin, M., 1989. Hemocytes of penaeid and palaemonid shrimps morphology, cytochemistry and hemogrens. Journal of Invertebrate Pathology. 53: 64-67.
- Van Hulsen, M.C.W., Tsai, M.F., Schipper, C.A., Lo, C.F., Kou, G.H., Vlak, J.M., 2000. Analysis of genomic segment of white spot syndrome virus of shrimp containing ribonucleotide reductase genes and repeat regions. J. Gen. Virol. 81, 307-316.
- Vargas, F. and Plascencia, G., 1999. Shrimp Immunity. Res. Trends In pres.
- Vázquez, A., (1997a). Participation of a sialic acid specific lectin from the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* hemocytes, in the recognition of non-self cell. J. Exp. Zoologi. 259, 265-272. INTERCIENCIA 23: 6 (1998).
- Vega, F., Soria, H., Cerecedo, R., Valdés, R., Suarez, M., 2000. Alternativa para la alimentación del camarón en cultivo: el manejo de la muda. V Simposium Internacional de Nutricional Acuicola. 313 – 320.
- Wang, C.S., Tang, F.J., Kou, G.H., Chen, S.N., 1997b. Detection of white spot disease virus infection in wild-caught greasy back shrimp, *Metapenaeus ensis* (de Haan) in Taiwan. 32: 35-41. Aquatic. 8, 1999.
- Wongteerasupaya, C., Vickers, J.E., Sriurairatana, S., Nash, G.L., Akarajamorn, A., Boonsaeng, V., Panyim, S., Tassanakajon, A., Withyachumnarnkul, B., Flegel, T.W., 1995. A non-occluded, systemic baculovirus that occurs in cell of ectodermal and mesodermal origin and causes high mortality in the black tiger prawn *Penaeus monodon*. Dis. Aquat. Organisms. 21, 69-77.
- Zhang, X., Xu, X., Hew, C.L., 2001. The structure and function of a gene encoding a basic peptide from prawn white spot syndrome virus. Virus Research. 79, 137-144.

ANEXOS

ANEXOS 1A

HEMOGRAMAS
PRIMER MUESTREO

#de cam GR SG H AM T GR% SG% H% AM% NTH PCR [PESO] T/ml PCR [PESO] TAILLA ESTADIOS

1	17	27	3	30	77	22	35	4	33	154000000	-	X	X	B
2	7	5	3	11	26	27	19	12	42	52000000	-	X	X	B
3	42	31	2	10	83	49	36	2	12	173000000	-	X	X	B
4	17	20	2	8	47	36	43	4	17	94050000	-	X	X	D3
5	13	52	6	20	91	14	57	7	22	182060000	-	X	X	D2
6	3	13	3	9	30	17	43	10	30	60050000	-	X	X	B
7	10	19	3	11	43	23	44	7	25	86090000	-	X	X	C
8	8	19	12	14	53	15	36	23	26	105000000	-	X	X	D2
9	1	14	13	9	37	3	38	35	24	74000000	-	X	X	D1
10	17	60	28	9	14	15	53	25	8	228000000	-	X	X	D2
11	1	1	2	2	6	17	17	33	33	12000000	-	X	X	D1
12	5	14	7	13	39	13	36	18	33	78000000	-	X	X	D2
13	12	20	10	10	52	23	38	19	19	104000000	-	X	X	B
14	16	48	16	8	88	18	55	18	9	176000000	-	X	X	C
15	7	4	3	6	20	35	20	15	30	40000000	-	X	X	D1
16	22	18	11	8	59	37	31	19	14	118000000	-	X	X	C
17	13	34	8	12	67	19	51	12	18	134000000	-	X	X	B
18	17	8	6	6	37	46	22	16	16	74000000	-	X	X	D0
19	11	3	6	14	34	32	9	18	41	68000000	-	X	X	D1
20	4	14	6	7	31	13	45	19	23	62000000	-	X	X	C
TOTAL	245	424	150	217	1036	24	41	14	21	2,07E+08				

Tabla 1 A. Parámetros tomados para los análisis por individuos. Número de animales por muestreo: # de cam; Número y porcentajes de Hemocitos Granulosos (GR), Semigranulosos (SG), Hialinos (H), Amorfos (AM) y Número Total de Hemocitos (NTH). PCR, Peso, Talla y Estadios de muerte.

Anexos 1 B

SEGUNDO MUESTREO

#de cam	GR	SG	H	AM	T	GR%	SG%	H%	AM%	NHT	T/ml	APAR	HEM	PCR	PESO(T)	ESTADIOS
1	31	11	9	16	67	46	15	13	24	134000000	Normal	Café	-	1,5	6,5	D0
2	22	4	6	18	50	44	8	12	36	106000000	Rojío	Normal	-	1,2	6,0	C
3	12	6	8	8	26	46	46	23	31	52000000	Normal	"	-	1,2	6,0	D1
4	14	8	2	1	25	56	32	8	4	35000000	"	Café	-	1,1	6,0	B
5	20	5	6	5	36	56	14	17	14	72000000	"	Café	-	1,7	6,5	D2
6	5	4	5	0	14	36	29	36	0	28000000	"	Normal	-	1,3	6,5	D9
7	11	3	2	4	20	55	15	10	20	40000000	"	"	-	1,5	6,5	D2
8	11	14	6	10	41	27	34	15	24	82000000	"	Café	-	1,1	6,3	C
9	18	16	10	2	46	39	35	22	4	92000000	Rojío	Normal	-	1,1	6,0	D1
10	8	2	6	6	22	36	9	27	27	44000000	Normal	"	-	0,8	6,5	D9
11	40	102	16	12	170	24	60	9	7	34000000	"	Café	-	1,5	6,5	D0
12	22	19	8	20	69	32	28	12	29	13800000	"	"	-	1,2	6,2	D1
13	29	12	8	9	58	30	21	14	16	11600000	"	"	-	1,1	6,0	C
14	17	13	6	6	42	40	31	14	14	34000000	"	"	-	1,1	6,0	D2
15	16	6	1	1	24	67	25	4	4	48000000	Rojío	Café/Rojo	-	1,1	5,5	D1
16	33	3	29	12	77	43	4	38	16	15400000	Normal	Normal	-	1,0	5,0	D0
17	15	6	4	8	33	45	18	12	24	64000000	Turbio	"	-	0,8	6,0	C
18	11	3	2	1	17	65	18	12	6	34000000	Normal	"	-	0,9	5,5	C
19	4	1	8	0	13	31	8	62	0	26000000	"	"	-	0,8	5,5	D1
20	18	11	1	0	30	60	37	3	0	6000000	Turbio	Café	-	0,8	5,4	B
TOTAL																
1357																
249																
143																
139																
880																
41																
28																
16																
1765+418																
1,1																
6,1																

Tabla 1 B. Parámetros tomados para los análisis por individuos. Número de animales por muestreo: # de cam; Número y porcentajes de Hemocitos Granulosos (GR), Semigranulosos (SG), Hialinos (H), Amorfos (AM) y Número Total de Hemocitos (NTH). PCR, Peso, Talla y Estadios de muerte

TOTAL **1357** **249** **143** **139** **880** **41** **28** **16** **1765+418**

1,1 **6,1**

Anexos 1 C

TERCER MUESTREO

Nº de camp GR SG H AM T GR% SG% H% AM% NHT. T/ml APAR. HEM. PCR PESO/TALLA/ESTADIOS

1	15	2	3	11	31	48	6	10	35	62000000	Normal	Café	-	0,9	5,5	B
2	49	16	5	52	122	40	13	4	43	24400000	"	S+	0,9	5,5	D1	
3	16	21	3	20	60	27	35	5	33	12000000	"	ML+	1,3	6,0	C	
4	2	3	1	12	18	11	17	6	67	36000000	"	ML+	0,9	5,5	C	
5	9	4	3	16	32	28	13	9	50	64800000	Rosado	Rosado	ML+	1,0	5,5	B
6	19	18	9	7	53	36	34	17	13	10600000	"	"	-	2,4	7,7	D1
7	8	12	1	12	33	24	36	3	36	66000000	Normal	Normal	ML+	1,2	6,6	C
8	39	28	8	12	87	45	32	9	14	17400000	Rosado	Café	ML+	1,4	6,0	D1
9	9	30	18	10	67	13	45	27	15	13400000	Normal	Normal	-	1,2	6,0	C
10	21	32	39	35	127	17	25	31	28	24400000	"	Rosado	ML+	1,2	5,0	D2
11	22	36	12	4	74	30	49	16	5	14800000	"	Normal	ML+	1,3	5,5	D0
12	7	1	13	2	25	28	4	60	8	5000000	"	"	-	1,1	5,7	D1
13	6	1	3	4	14	43	7	21	29	2800000	"	"	ML+	1,0	5,5	D0
14	6	3	11	8	28	21	11	39	29	5600000	"	"	ML+	1,0	5,6	C
15	4	18	9	26	57	7	32	16	46	11400000	"	Rosado	S+	1,4	6,0	C
16	36	75	36	30	177	20	42	20	17	35400000	Turbio	"	ML+	2,0	7,0	D2
17	9	31	4	23	67	13	46	6	34	13400000	Normal	Normal	ML+	1,4	6,3	D1
18	12	27	12	4	55	22	49	22	7	11000000	Turbio	Café	-	1,1	5,5	D0
19	14	36	16	0	66	21	55	24	0	13200000	Normal	Café	-	1,0	5,5	D1
20	12	31	10	0	53	23	58	19	0	10600000	"	Café	-	0,9	5,0	D1
TOTAL	315	425	218	288	1246	25	34	17	23	2,49E+08				1	6	

Tabla 1 C. Parámetros tomados para los análisis por individuos. Número de animales por muestra; # de camp; Número y porcentajes de Hemocitos Granulosos (GR), Semigranulosos (SG), Hialinos (H), Amorfos (AM) y Número Total de Hemocitos (NTH). PCR, Peso, Talla y Estadíos de muda

Anexos 1 D

CUARTO MUESTREO

#de cam CR SG H AM T GR% SC% H% AMP% NTH, T/ml APAR. HEM. PCR PESO TALLA ESTADIOS

	#de cam	CR	SG	H	AM	T	GR%	SC%	H%	AMP%	NTH, T/ml	APAR.	HEM.	PCR	PESO	TALLA	ESTADIOS
1	6	26	6	5	43	14	60	14	12	8600000	Normal	Normal	-	0.8	5.0	D0	
2	16	29	8	17	79	23	47	11	24	14000000	"	"	-	1.5	6.0	D0	
3	3	1	1	5	10	30	10	10	50	2000000	Rosado	Rosado	M+	1.1	5.5	D2	
4	6	7	5	10	28	21	25	18	36	5600000	Normal	Normal	ML+	0.8	5.3	C	
5	2	6	1	7	16	13	38	6	44	3200000	"	"	ML+	0.9	5.4	D0	
6	5	13	10	10	38	13	34	26	26	7600000	Turbio	Café	-	0.8	5.0	D0	
7	3	2	4	1	10	30	20	40	10	2000000	Hep. blan	"	-	1.0	5.5	D1	
8	7	5	2	11	25	28	20	8	44	5000000	Rosado	Rosado	ML+	1.2	6.0	D2	
9	17	24	62	10	113	15	21	55	9	22600000	Hep. blan	Normal	L+	1.2	5.5	D1	
10	1	8	1	6	16	6	50	6	38	3200000	Normal	"	ML+	0.9	5.0	C	
11	10	42	29	2	83	12	51	35	2	16600000	"	Café	-	0.8	5.5	D2	
12	9	32	13	2	56	16	57	23	4	11200000	Hep. blan	"	-	0.7	5.5	D1	
13	12	32	12	2	58	21	55	21	3	11600000	Normal	Normal	-	0.8	5.0	D0	
14	4	16	7	16	43	9	37	16	37	3600000	Hep. blan	"	S+	1.5	6.0	D1	
15	7	25	10	0	42	17	60	24	9	8400000	Turbio	"	-	1.0	5.0	D1	
16	3	1	2	1	7	43	14	29	14	1400000	Hep. blan	"	-	0.8	5.0	D1	
17	4	25	1	2	32	13	78	3	6	6400000	"	"	-	0.8	5.0	C	
18	3	12	6	12	33	9	36	18	36	6600000	Turbio	"	S+	1.0	5.5	D1	
19	6	31	6	6	49	12	63	12	12	9800000	"	Rosado	-	1.0	5.6	C	
20	8	36	4	2	50	16	72	8	4	1000000	Normal	Normal	-	1.0	5.5	D1	
TOTALES																	
0.98																	

Tabla 1 D. Parámetros tomados para los análisis por individuo. Número de animales por muestreo: # de cam; Número y porcentajes de Hemocitos Granulosos (GR), Semigranulosos (SG), Hielinos (H), Amorfos (AM) y Número Total de Hemocitos (NTH). PCR, Peso, Talla y Estadios de muda

Anexos 1 E

QUINTO MUESTREO

Nº de camp. GR SG H AM T %GR %SG %H %AM %NTH T/m³ APAR. HEM. PCR PESO/TALLA ESTADIOS

1	5	68	14	22	109	5	62	13	20	218000000	Rosada	M+	2,0	7,0	D2					
2	3	8	14	20	45	7	18	31	44	90000000	"	S+	2,0	7,0	D0					
3	6	39	7	12	64	9	61	11	19	128000000	"	Normal	ML+	2,1	7,0	D2				
4	20	74	8	18	120	17	62	7	15	240000000	"	Rosada	ML+	2,0	7,0	C				
5	11	90	21	10	132	8	68	16	8	264000000	"	"	ML+	2,9	7,6	D2				
6	1	29	1	16	47	2	62	2	34	94000000	"	"	S+	1,3	6,0	D1				
7	4	44	10	32	90	4	49	11	36	180000000	"	Normal	ML-	1,9	6,5	D0				
8	28	78	15	34	155	18	50	10	22	310000000	"	Rosada	ML-	3,2	7,8	D2				
9	16	82	8	22	128	13	64	6	17	236000000	"	"	ML+	2,3	7,0	D2				
10	15	65	5	8	93	16	70	5	9	185000000	"	Normal	ML+	1,8	6,7	C				
11	3	6	3	4	21	14	29	38	19	42000000	"	"	ML+	1,9	7,0	D2				
12	7	45	11	10	73	10	62	15	14	146000000	"	"	M+	1,7	6,5	D2				
13	8	44	18	4	74	11	55	24	5	148000000	"	"	ML+	2,4	7,5	D3				
14	21	81	30	18	150	14	54	20	12	310000000	"	Rosada	ML+	1,9	7,0	D1				
15	5	39	8	22	74	7	53	11	30	148000000	"	Normal	ML+	1,7	6,5	D0				
16	5	30	3	24	62	8	48	5	39	124000000	"	Rosada	M+	1,9	6,7	D1				
17	8	49	9	8	74	11	66	12	11	148000000	"	Normal	-	1,7	6,5	B				
18	19	72	27	12	130	15	55	21	9	260000000	"	Rosada	ML+	1,8	7,0	C				
19	7	37	9	6	59	12	63	15	10	118000000	"	Normal	ML+	1,1	3,5	B				
20	1	6	5	2	14	7	43	36	14	28000000	"	"	-	1,2	6,0	C				
TOTAL		193	986	364	304	1787	11	35	17	17	3.57E+08			2	7					

Tabla 1 E. Parámetros tomados para los análisis por individuos. Número de animales por muestra: # de camp; Número y porcentajes de Hemocitos Granulosos (GR), Semigranulosos (SG), Histiocitos (H), Amorfo (AM) y Número Total de Hemocitos (NTH). PCR, Peso, Talla y Estadios de muda

Anexos 1 F

SEXTO MUESTREO

Anexo 1 F
SEXTO MUESTREO

#de cam	GR	SG	II	AM	T	G% (SG%)	H% (AM%)	NTH, U/ml	APAR	HEM	PCR	PESOTALLA ESTADIOS
1	2	5	16	6	29	7	17	55	21	580/0000 Normal	2,1	7,2
2	33	65	24	10	132	25	49	18	8	2640/0000 " "	2,4	7,2
3	2	12	3	14	31	6	39	10	45	620/0000 " Rosado	1,5	6,5
4	4	11	1	7	23	17	48	4	30	460/0000 Esp. blan "	2,2	7,5
5	5	22	6	2	35	14	63	17	6	700/0000 Normal	-	7,2
6	7	55	18	10	90	8	61	20	11	1800/0000 "	-	7,0
7	8	26	23	12	69	12	38	13	17	1800/0000 " Rosado	1,7	7,0
8	16	56	11	8	91	18	62	12	9	1820/0000 Normal	-	7,5
9	8	26	19	6	59	14	44	32	13	1180/0000 "	-	7,0
10	5	16	27	8	56	9	29	48	14	1120/0000 "	-	6,7
11	14	76	21	5	116	12	66	18	4	2320/0000 " Rosado	-	7,5
12	16	75	16	4	111	14	68	14	4	2220/0000 Normal	-	7,2
13	1	5	4	2	12	8	42	33	17	2400/0000 " Rosado	-	6,6
14	3	3	4	3	13	23	23	31	23	2600/0000 Normal	-	6,4
15	8	15	6	3	34	24	44	18	15	6380/0000 " Rosado	1,3	6,9
16	0	4	1	1	6	0	67	17	17	1200/0000 "	-	6,3
17	7	39	5	2	53	13	74	9	4	1060/0000 Normal	-	6,8
18	9	33	12	8	62	5	53	19	13	1240/0000 Turbido	-	7,0
19	15	65	9	1	90	17	72	10	1	1300/0000 Normal	-	6,5
20	3	14	12	2	31	10	45	39	6	620/0000 "	-	6,0
TOTAL												
	166	623	354	116	1259	13	49	28	9	2.52E+08	2	7

Tabla 1 F. Parámetros tomados para los análisis por individuos. Número de animales por muestreo; # de cam; Número y porcentajes de Hemocitos Granulosos (GR), Semigranulosos (SG), Hialinos (H), Amorfos (AM) y Número Total de Hemocitos (NTH). PCR, Peso, Talla y Estadios de muda

Anexos 1 G

SEPTIMO MUESTREO

#de canti	GR	SG	H	AM	T	GR%	SG%	H%	AM%	T%	NIT	Tml	APAR.	HEM.	PCR	PESO	TALLA	ESTADIOS
1	6	41	6	3	36	11	73	11	5	112000000	Normal	Normal	-	3,0	8,0	D2		
2	5	14	10	10	29	17	48	34	34	58000000	"	Rosado	ML+	2,7	7,8	D1		
3	4	20	8	3	32	13	63	25	9	64000000	Hsp,blan	"	-	3,2	8,5	D0		
4	15	21	13	7	49	31	43	27	14	98000000	Turbio	"	ML+	3,7	9,0	D0		
5	10	27	53	5	90	11	30	59	6	180000000	Normal	Normal	-	2,9	8,0	D1		
6	9	37	27	7	73	12	51	37	10	146500000	Turbio	"	-	2,9	8,0	D0		
7	11	49	25	6	85	13	58	29	7	170000000	"	"	-	3,5	9,0	D1		
8	3	7	13	3	23	13	30	57	13	46000000	Jep,antra	Normal	-	1,9	6,5	D3		
9	7	11	43	0	61	11	18	70	0	122000000	Turbio	"	-	2,8	8,0	D2		
10	13	42	8	18	63	21	67	13	29	126000000	Jep,blan	"	-	2,5	7,8	D1		
11	2	15	13	7	30	7	50	43	23	6000000	Jep,antra	"	ML+	2,5	7,8	D2		
12	4	13	19	5	36	11	36	53	14	72000000	Normal	Rosado	-	3,5	8,5	D1		
13	12	42	41	24	95	13	44	43	25	190000000	Normal	Rosado	VI+	3,1	8,5	D2		
14	8	27	29	6	64	13	42	45	9	128000000	Turbio	Normal	-	2,9	8,0	D2		
15	11	54	10	6	75	15	72	13	8	150000000	Normal	Rosado	-	2,6	8,0	D1		
16	10	60	25	2	95	11	63	26	2	190000000	Turbio	"	-	3,1	8,5	D1		
17	1	5	8	3	14	7	36	57	21	28000000	"	"	-	2,1	7,1	D2		
18	4	16	6	4	26	15	62	23	15	52000000	"	"	-	2,5	8,0	B		
19	2	25	39	5	66	3	38	59	8	132000000	Normal	"	-	2,5	7,5	D1		
20	8	34	39	10	81	10	42	48	12	162000000	"	Normal	-	2,5	7,6	D1		
TOTAL	145	560	435	134	1274	11	44	34	11	2548000000				3	8			

Tabla 1 G. Parámetros tomados para los análisis por individuos. Número de animales por muestra; # de canti; Número y porcentajes de Hemocitos Granulosos (GR), Semigranulosos (SG), Hialinos (H), Amorfa (AM) y Número Total de Hemocitos (NTT). PCR, Peso, Talla y Estadios de mida

Anexos 1 H

OCTAVO MUESTREO

	Hd de cam	GR	SG	H	AM	T	GR%	SG%	H%	AM% UNIT.	T/m	APAR.	HEM.	PCR	PUSC	ALI.	ESTADIOS
1	11	28	10	5	54	20	52	19	9	108000000	Turbio	Normal	-	2,5	8,5	D9	
2	26	110	21	9	166	16	66	13	5	332000000	Normal	"	-	2,4	7,5	D3	
3	7	31	23	4	65	11	48	35	6	136000000	"	Rosado	-	2,7	8,3	D1	
4	2	34	26	4	66	3	52	39	6	132000000	Cep. blau	"	-	3,3	8,6	D9	
5	7	29	20	6	62	11	47	32	10	124000000	Normal	"	-	3,4	8,6	D3	
6	7	34	23	13	79	9	43	32	16	158000000	"	"	-	1,8	6,5	D2	
7	3	5	6	1	15	20	33	40	7	300000000	"	Normal	-	2,3	7,5	D3	
8	9	35	7	3	54	17	65	13	6	108000000	"	Rosado	-	2,6	8,0	D1	
9	11	39	23	15	88	13	44	26	17	176000000	Alarma	"	ML+	3,7	8,6	D1	
10	8	8	7	6	29	28	28	24	21	58000000	Normal	Normal	-	2,4	7,6	D2	
11	1	10	8	1	20	5	50	40	5	40000000	"	Cef+99	-	3,0	8,5	D1	
12	3	22	14	5	44	7	50	32	11	88000000	"	Rosado	-	3,2	8,5	E	
13	14	40	13	1	68	21	59	19	1	136000000	"	Rosado	-	3,0	8,3	D1	
14	6	18	8	2	34	18	53	24	6	6800000	"	Normal	-	3,0	8,0	D3	
15	8	21	20	3	52	15	40	38	6	104000000	"	Rosado	-	3,1	8,5	D2	
16	4	32	22	6	64	6	50	34	9	128000000	"	Normal	-	3,1	8,0	D2	
17	15	64	13	2	94	16	68	14	2	188000000	"	Normal	-	2,7	7,7	C	
18	2	18	5	4	29	7	62	17	14	5800000	Turbio	Rosado	-	5,0	10	D9	
19	1	12	20	7	40	3	30	50	18	88000000	Normal	Normal	-	2,6	8,0	D1	
20	8	36	14	5	63	13	57	22	8	126000000	"	Rosado	-	2,7	7,7	C	
TOTAL		153	626	305	102	1186	13	53	26	9	2,37E+08				3	8	

Tabla 1 H. Parámetros tomados para los análisis por individuos. Número de anuales por muestreo. # de cam, Número y porcentajes de Hemocitos Granulosos (GR), Semigranulosos (SG), Hialinos (H), Amorfos (AM) y Número Total de Hemocitos (NTH). PCR, Peso, Talla y Estadios de muda

ANEXOS 2

TABLA DE CONTINGENCIA GENERAL

PCR.	GR	SG	II	AM	Viables	APAR.	HEMOL.	EST.	Muda
1	muy alta	bajo	bajo	alto	bajo	normal	rosada	B	postmuda
1	alta	bajo	bajo	medio	medio	rara	rosada	D1	Prem. Tpm.
1	medio	bajo	medio	bajo	alto	rara	rosada	D0	Prem. Tpm.
1	medio	bajo	medio	bajo	alto	normal	rosada	D1	Prem. Tpm.
1	medio	medio	medio	bajo	alto	normal	rosada	D1	Prem. Tpm.
2	medio	bajo	bajo	muy alto	muy bajo	rara	rosada	B	postmuda
2	alta	bajo	bajo	medio	medio	rara	rosada	D1	Prem. Tpm.
2	medio	bajo	alto	medio	medio	normal	rosada	D2	premuda
2	medio	bajo	medio	medio	medio	rara	rosada	D2	premuda
5	alta	bajo	bajo	muy alto	muy bajo	normal	rosada	D1	Prem. Tpm.
5	bajo	bajo	medio	muy alto	muy bajo	normal	rosada	C	internuda
1	medio	bajo	alto	medio	medio	rara	rosada	D0	Prem. Tpm.
1	alta	bajo	alto	medio	medio	rara	rosada	D1	Prem. Tpm.
1	bajo	bajo	alto	bajo	alto	normal	rosada	D2	premuda
1	medio	bajo	medio	bajo	alto	rara	rosada	D1	Prem. Tpm.
1	bajo	medio	bajo	medio	medio	normal	rosada	C	internuda
1	medio	bajo	bajo	muy alto	muy bajo	normal	normal	D0	Prem. Tpm.
2	alta	bajo	bajo	muy alto	muy bajo	rara	rosada	D2	premuda
3	medio	bajo	muy alto	bajo	alto	rara	normal	D1	Prem. Tpm.
5	bajo	bajo	medio	alto	bajo	rara	normal	D1	Prem. Tpm.
5	bajo	bajo	medio	alto	bajo	rara	normal	D1	Prem. Tpm.
2	medio	medio	bajo	medio	medio	rara	rosada	C	internuda
2	bajo	medio	medio	bajo	alto	rara	rosada	D2	premuda
2	medio	bajo	bajo	medio	medio	rara	rosada	D2	premuda
2	bajo	bajo	medio	medio	medio	rara	rosada	D1	Prem. Tpm.
2	medio	bajo	medio	bajo	alto	rara	rosada	C	internuda
4	bajo	medio	medio	medio	medio	rara	rosada	D2	premuda
4	bajo	bajo	bajo	alto	bajo	rara	rosada	D1	Prem. Tpm.
5	bajo	bajo	alto	muy alto	muy bajo	rara	rosada	D0	Prem. Tpm.
5	bajo	medio	bajo	alto	bajo	rara	rosada	D1	Prem. Tpm.
1	bajo	medio	medio	bajo	alto	normal	rosada	D2	premuda
1	bajo	bajo	alto	medio	medio	normal	rosada	D1	Prem. Tpm.
1	bajo	medio	medio	medio	medio	normal	normal	D1	Prem. Tpm.
2	medio	bajo	bajo	medio	medio	rara	rosada	C	internuda
2	bajo	bajo	alto	medio	medio	normal	rosada	D0	Prem. Tpm.
2	alto	bajo	medio	medio	medio	rara	rosada	C	internuda
3	bajo	bajo	bajo	muy alto	muy bajo	normal	rosada	D2	premuda
1	bajo	medio	medio	bajo	alto	rara	rosada	D0	Prem. Tpm.
1	medio	alto	bajo	bajo	alto	normal	rosada	D1	Prem. Tpm.
2	medio	bajo	alto	alto	bajo	normal	rosada	D1	Prem. Tpm.
2	alto	bajo	medio	medio	medio	rara	rosada	D0	Prem. Tpm.
2	bajo	bajo	muy alto	medio	medio	normal	rosada	D2	premuda
1	bajo	bajo	alto	bajo	alto	normal	rosada	D1	Prem. Tpm.
1	bajo	bajo	alto	bajo	alto	rara	rosada	D0	Prem. Tpm.
1	bajo	bajo	alto	bajo	alto	normal	rosada	D0	Prem. Tpm.
1	bajo	bajo	alto	medio	medio	normal	rosada	E	muda
1	medio	bajo	alto	bajo	alto	normal	rosada	D2	premuda
1	bajo	medio	medio	medio	alto	rara	rosada	D0	Prem. Tpm.
2	bajo	bajo	medio	medio	medio	rara	rosada	D1	Prem. Tpm.
1	bajo	bajo	alto	medio	medio	normal	normal	C	internuda
1	alta	bajo	muy alto	bajo	alto	normal	normal	D1	Prem. Tpm.
2	medio	bajo	bajo	alto	bajo	normal	rosada	C	internuda
2	bajo	bajo	bajo	muy alto	muy bajo	normal	rosada	C	internuda
2	medio	bajo	bajo	alto	bajo	normal	normal	C	internuda
2	alto	medio	medio	bajo	alto	normal	normal	D0	Prem. Tpm.
2	muy alta	bajo	medio	medio	medio	normal	normal	D0	Prem. Tpm.

Tablas 2. Contingencia (variables cualitativas) de todos los muestreos incluyendo animales de baja y alta carga viral. Hemogramas, Color de la hemolinfa, Nivel de infección detectado por PCR, Apariencia alterada de los animales y Estadios de muda

2	medio	bajo	alto	medio	medio	normal	normal	C	internuda
2	bajo	bajo	bajo	alto	bajo	normal	normal	D1	Prem. Tpma.
1	medio	medio	medio	medio	medio	normal	normal	D0	Prem. Tpma.
1	medio	bajo	bajo	medio	medio	normal	normal	D0	Prem. Tpma.
1	medio	bajo	medio	bajo	alto	normal	normal	D0	Prem. Tpma.
1	medio	medio	medio	bajo	alto	rara	normal	D1	Prem. Tpma.
1	muy alto	bajo	alto	medio	medio	rara	normal	D1	Prem. Tpma.
1	medio	alto	bajo	bajo	alto	rara	normal	C	internuda
1	medio	alto	bajo	bajo	alto	normal	normal	D1	Prem. Tpma.
2	medio	bajo	medio	alto	bajo	normal	normal	C	internuda
2	bajo	medio	bajo	alto	bajo	normal	normal	C	internuda
4	alto	bajo	bajo	muy alto	muy bajo	rara	rosada	D2	premuda
1	bajo	medio	bajo	medio	medio	rara	normal	B	postmuda
1	bajo	bajo	alto	medio	medio	rara	normal	C	internuda
2	bajo	medio	bajo	medio	medio	rara	normal	D2	premuda
2	bajo	bajo	bajo	alto	bajo	rara	normal	D0	Prem. Tpma.
3	medio	medio	bajo	bajo	alto	rara	normal	C	internuda
2	medio	bajo	alto	medio	medio	rara	normal	D2	premuda
2	bajo	medio	medio	bajo	alto	rara	normal	D3	premuda
2	bajo	bajo	bajo	medio	medio	rara	normal	D0	Prem. Tpma.
2	bajo	medio	medio	medio	medio	rara	normal	B	postmuda
4	bajo	medio	medio	medio	medio	rara	normal	D2	premuda
1	bajo	bajo	muy alto	medio	medio	normal	normal	D1	Prem. Tpma.
1	medio	medio	medio	bajo	alto	normal	normal	C	internuda
1	bajo	medio	medio	medio	medio	normal	normal	B	postmuda
1	medio	medio	medio	bajo	alto	normal	normal	C	internuda
1	medio	bajo	alto	medio	medio	normal	normal	C	internuda
1	medio	medio	medio	bajo	alto	normal	normal	D0	Prem. Tpma.
1	alto	bajo	alto	medio	medio	normal	normal	D2	premuda
1	medio	alto	bajo	bajo	alto	normal	normal	D3	premuda
1	medio	bajo	medio	medio	medio	rara	normal	D2	premuda
1	medio	alto	bajo	bajo	alto	normal	normal	D0	Prem. Tpma.
1	bajo	bajo	alto	bajo	alto	normal	normal	D2	premuda
2	alto	bajo	medio	bajo	alto	normal	normal	B	postmuda
2	bajo	bajo	muy alto	medio	medio	normal	normal	D0	Prem. Tpma.
1	bajo	alto	bajo	bajo	alto	normal	normal	D2	premuda
1	bajo	bajo	muy alto	bajo	alto	normal	normal	D1	Prem. Tpma.
1	bajo	bajo	muy alto	bajo	alto	rara	normal	D2	premuda
1	bajo	bajo	muy alto	bajo	alto	rara	normal	D0	Prem. Tpma.
1	medio	medio	bajo	medio	medio	rara	normal	D1	Prem. Tpma.
1	bajo	bajo	muy alto	medio	medio	rara	rosada	D1	Prem. Tpma.
1	bajo	bajo	muy alto	medio	medio	rara	normal	D2	premuda
1	bajo	medio	medio	bajo	alto	rara	rosada	D1	Prem. Tpma.
1	bajo	bajo	muy alto	medio	medio	rara	rosada	D2	premuda
1	medio	medio	medio	medio	medio	rara	rosada	B	postmuda
1	bajo	bajo	muy alto	bajo	alto	normal	rosada	D1	Prem. Tpma.
1	bajo	bajo	muy alto	medio	medio	normal	normal	D1	Prem. Tpma.
1	medio	bajo	medio	bajo	alto	rara	normal	D0	Prem. Tpma.
1	medio	medio	bajo	bajo	alto	normal	normal	D3	premuda
1	bajo	bajo	alto	medio	medio	normal	rosada	D3	premuda
1	bajo	bajo	alto	medio	medio	normal	rosada	D2	premuda
1	bajo	bajo	alto	medio	medio	normal	rosada	D1	Prem. Tpma.
1	bajo	bajo	alto	bajo	alto	normal	normal	D3	premuda
1	bajo	bajo	alto	bajo	alto	normal	normal	D2	premuda
1	medio	medio	bajo	bajo	alto	normal	normal	C	internuda
1	bajo	bajo	muy alto	medio	medio	normal	normal	D1	Prem. Tpma.
1	bajo	bajo	medio	bajo	alto	normal	rosada	C	internuda

Tablas 2. Contingencia (variables cualitativas) de todos los muestreos incluyendo animales de baja y alta carga viral

ANEXOS 2 A

Rows b		Nor.		Rows a		A.M		Rows : SG		
Column		EMOL.		Column		Nar.		Column AM		
No Selc	normal	rosada	total	No Sele	alto	bajo	medio	muy bajo	total	No Sel
alto	32	23	55	alto	0	13	0	0	13	alto
bajo	8	5	13	bajo	53	0	0	0	53	bajo
medio	32	31	63	medio	2	0	63	0	65	medio
muy b	1	8	9	muy alt	0	0	0	9	9	muy alt
total	73	67	140	total	55	13	63	9	140	total
table contents:										table contents:
Count				Count						Count
Chi-sq	7,382	with	3	Chi-sq	410,8	with	9	df	6	Chi-sq 16,46 with 6 df p = 0,0001 p = 0,0115

Tablas de resultados de Contingencia por medio del chi-square. Con un nivel de confianza de ($\alpha=0,05$)

ANEXOS 2 B

		Rows a AM Column EMOL. No Selk		Rows a H Column AM No Sele		Rows : SG Colum Nor. No Sel										
		normal	rosada	total		alto	bajo	medio muy alto	total	alto	bajo	medio muy baj	total			
alto	8	5	13		alto	1	9	18	1	29	alto	6	0	0	0	6
bajo	31	22	53		bajo	9	15	20	7	51	bajo	32	11	50	9	102
medio	33	32	65		medio	3	23	17	1	44	medio	17	2	13	0	32
muy alt	1	8	9		muy alt	0	6	10	0	16	total	55	13	63	9	140
total	73	67	140		total	13	33	65	9	140	table contents:					
table contents:					Count						Count					
Count					Chi-sq						Chi-sq					
Chi-sq	7,437				with						16.49					
p	0,0592				df						p = 0,0135					
												6				
													df			

Tables de resultados de Contingencia por medio del chi-square. Con un nivel de confianza de (p=0.05)

ANEXOS 2 C

	B	C	D0	D1	D2	D3	E	total
alto	0	4	2	5	8	2	1	29
bajo	5	15	7	12	10	2	9	51
medio	4	7	10	14	7	2	0	44
muy ab	0	0	1	9	5	1	0	16
total	9	26	27	40	30	7	1	140

table contents:

Count	Chi-sq 27,95	with df
	p = 0.0628	

	Rows a H			Column EST.			Rows a H			Column Muda			No Sel		
	B	C	D0	D1	D2	D3	E	total		interm.	muda postm.	reTp	prem.	total	
alto	0	4	2	5	8	2	1	29	alto	4	1	0	14	10	29
bajo	5	15	7	12	10	2	9	51	bajo	15	0	5	19	12	51
medio	4	7	10	14	7	2	0	44	medio	7	0	4	24	9	44
muy ab	0	0	1	9	5	1	0	16	muy ab	0	0	0	10	6	16
total	9	26	27	40	30	7	1	140	total	26	1	9	67	37	140

Tablas de resultados de Contingencia por medio del chi-square. Con un nivel de confianza de ($p=0.05$)

ANEXOS 2 D

Rows a Colami No Sek			GR SG			Rows a! Column No Sel			GR H			Rows : Column No Sel				
alto	bajo	medio	alto	bajo	total	alto	bajo	medio	muy alto	total	alto	bajo	medio	nuy alt	total	
alto	0	17	1	18	alto	4	6	6	2	18	alto	0	6	9	3	18
bajo	1	41	17	59	bajo	15	13	18	13	59	bajo	7	17	31	4	59
medio	3	28	14	47	medio	8	20	18	1	47	medio	4	26	15	2	47
muy alt	0	16	0	16	muy alt	2	12	2	0	16	muy alt	2	4	10	0	16
total	6	102	32	140	total	29	51	44	16	140	total	13	53	65	9	140
table contents: Count			table contents: Count			table contents: Count			table contents: Count			table contents: Count				
Chi-sq 18,72 p = 0.0047	with	6	df	Chi-sq 25,66 p = 0.0023	with	9	df	Chi-sq 16,03 p = 0.0663	with	9	df	Chi-sq 16,03 p = 0.0663	with	9	df	

Tablas de resultados de Contingencia por medio del chi-square. Con un nivel de confianza de (p=0.05)

ANEXOS 2 E

Rows PCR Column AM No Se	Rows in PCR. Column Nor. No Sel	Rows in PCR. Column Nor. No Sel						Rows in PCR. Column Nor. No Sel					
		alto	bajo	medio	nuy alt	total	alto	bajn	medionuy bajc	total	normal	rara	total
1	2	46	42	0	90	1	48	2	40	0	90	1	90
2	7	6	21	4	38	2	6	7	21	4	38	2	38
3	0	1	0	1	2	3	1	0	0	1	2	3	1
4	1	0	2	1	4	4	0	1	2	1	4	4	4
5	3	0	0	3	6	5	0	3	0	3	6	5	6
total	13	53	65	9	140	total	55	13	63	9	140	Total	59
table contents:		table contents: Count											
Chi-sq	70,05	with	12	df		Chi-sq 71,13 p ≤ 0,0001	with	12	df	Chi-sq 13,34 p = 0,0097	with	4	
													df

Tables de resultados de Contingencia por medio del chi-square. Con un nivel de confianza de (p=0,05)

ANEXOS 2 F

	H				
	Column Nº	Nº	Row Nº	Row Nº	
	alto	bajo	medio	muy baj.	total
alto	9	1	18	1	29
bajo	15	9	20	7	51
medio	24	3	16	1	44
muy alt	7	0	9	0	16
total	55	13	63	9	140

table contents:

Count	Chi-sq	35,68	with	6	df
Chi-sq	21,41	with	9	df	
p = 0,0110					

	SG				
	Column Nº	Nº	Row Nº	Row Nº	
	alto	bajo	medio	muy alt	total
alto	0	6	0	0	6
bajo	29	32	25	16	102
medio	0	13	19	0	32
total	29	51	44	16	140

table contents:

Count	Chi-sq	35,68	with	6	df
Chi-sq	21,41	with	9	df	
p ≤ 0,0001					

Tablas de resultados de Contingencia por medio del chi-cuadrado. Con un nivel de confianza de (p<0,05)