Escuela Superior Politécnica del Litoral

Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar

"Análisis de las Modificaciones en las Polblaciones Hemocitarias en camaroneras (Penaeus vannamei) Infectados con WSSV"

TESIS DE GRADO

Previa a la obtención del Título de:

Ingeniero en Acuicultura

Presentado por:

Daniel Andrés Pedrazzoli Morán

GUAYAQUIL - ECUADOR

2008

Recibido 10 Sep del 2008

AGRADECIMIENTO

A Dios..y a los que me observan junto a ti.

A mis Padres, figuras de fortaleza y amor, gracias por sus palabras de apoyo y por siempre creer en mi.

A mi hermana...ñaña gracias..gracias por siempre estar conmigo.

A ESPOL y a mis profesores, por darme las herramientas necesarias para mi formación académica universitaria.

Al CENAIM..mi Segundo hogar y a su director Doctor Sam Stern por permitirme realizar mi tesis.

A la Provincia de Santa Elena, especialmente a mi colegio Rubira, gracias por la formación, ya que estas fueron las bases de mi educación.

A la Doctora Jenny Rodríguez, mi directora de Tesis gracias por permitirme ser su estudiante y formar parte de su equipo de trabajo

A Fabricio por enseñarme las técnicas necesarias para realizar los experimentos de mi tesis.. gracias Fabre

A Bonny por su ayuda y respaldo en la estadística de mi investigación.muchas gracias Bonny

A Lourdes, Ricardo, Mare, Cesar, Irma, Berta, Mariuxy, Fanny, José y Rosa...gracias por siempre estar dispuestos ayudarme y darme concejos durante todo el transcurso de mi tesis,

Al personal de Operaciones. gracias por siempre velar por mi bienestar y preocuparse por mí .

A Gaby, Cecilia, Anita y Néstor gracias por hacer divertida la estadía en la sala de computo

A todas las personas que me conocen desde los inicios del CENAIM, siempre han estado dispuesta a ayudarme y me han visto crecer con el paso del tiempo

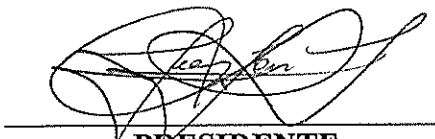
Gracias por todo

DEDICATORIA

A ellos ....que son el infinito manto de estrellas que cubren mis sueños... ...

Dedicada a mis abuelitos....

TRIBUNAL DE GRADUACIÓN



PRESIDENTE

Msc. Jerry Landivar

DIRECTOR

Ph.D. Jenny Rodríguez

VOCAL PRINCIPAL

Ph.D. Marcelo Muñoz

DECLARACIÓN EXPRESA

La responsabilidad del contenido

de esta Tesis de Grado

nos corresponde exclusivamente;

y el patrimonio intelectual de la misma

a la Escuela Superior Politécnica del Litoral.

Daniel Andrés Pedrazzoli Morán

RESUMEN

Se estudió el comportamiento del sistema inmune del camarón *Penaeus vannamei* sometido a desafío con el virus del síndrome de la Mancha Blanca (WSSV). La investigación se focalizó en el análisis de las subpoblaciones de hemocitos circulantes antes y después del evento viral y las modificaciones sufridas por el órgano linfoide (Ol), en los animales sobrevivientes al desafío.

Previamente los animales fueron mantenidos bajo condiciones experimentales muy controladas a fin de asegurar baja prevalencia viral; temperatura estable de 31 □C, buen flujo de aire y alimentación constante. Posteriormente fueron expuestos al WSSV por baño, de manera individual, a fin de cortar la re-infección. Se siguió esta estrategia a fin de favorecer la respuesta inmune del hospedero.

En los animales susceptibles del tiempo cero (T=O), la distribución de los porcentajes de la sub-poblaciones hemocitarias mostró elevados niveles de hemocitos hialinos. Los sobrevivientes mostraron un incremento superior al 50% en el número total de hemocitos (NTH). La distribución porcentual de sus sub-poblaciones fue similar a la

del tiempo cero, sin embargo, se observó un incremento de animales con niveles altos de hemocitos semi-granulosos. Estos animales mostraron además incremento significativo del antígeno α2 Macro-Globulina y de actividad PO en los hemocitos circulantes.

En los análisis histopatológicos se observó pocas lesiones de mancha blanca, una fuerte infiltración de hemocitos y un órgano linfoide saludable.

Los moribundos mostraron porcentajes superiores al 20 % de hemocitos no funcionales (llamados atípicos, altos niveles de lesiones de mancha blanca y desorganización del órgano linfoide, el mismo que presentó picnosis y careorexis además de numerosos cuerpos de inclusión.

En los sobrevivientes la salud del tejido hematopoyético y de los hemocitos preservaría la capacidad filtradora del Ol, manteniendo baja la carga viral de la hemolinfa. Los animales moribundos fracasarían ante el desafío viral debido a la cadena de fallas ocasionada por la destrucción de hemocitos e infección del tejido hematopoyético que conllevan a la desorganización y al colapso del sistema de limpieza de la hemolinfa en el Ol. Finalmente, la inmunohistoquímica sugirió que los hemocitos hialinos y semi-granulosos forman parte de los esferoides, en tanto TUNEL indicó que estos se autodestruyen por apoptosis.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN vii

ÍNDICE GENERAL ix

ABREVIATURAS xii

ÍNDICE DE FIGURAS xiii

ÍNDICE DE GRAFICOS xiv

ÍNDICE DE ANEXOS xv

ÍNDICE DE TABLAS xvi

INTRODUCCIÓN xvii

CAPITULO I. SISTEMA INMUNE 23

1.1. Respuesta Celular 23

1.2. Sistema Inmune de los Vertebrados 25

1.3. Sistema Inmune de los Invertebrados 26

1.4. Características del Sistema Inmune de los Crustáceos 27

1.5. Características Hemocíticas y tipos de hemocitos 27

1.5.1. Hemocitos Hialinos 28

1.5.2. Hemocitos Semigranulosos y Granulosos 29

1.5.3 Hemocitos Atípicos 29

1.6. Mecanismos de Defensa Celular 29

1.6.1 Fagocitosis 29

1.6.2 Encapsulación y Nodulación.- 30

1.6.3 Apoptosis. 31

1.7 Mecanismos de liberación de compuestos celulares. 33

1.7.1 Sistema Fenoloxidasa 33

1.8. Mecanismos Humorales de Defensa.- 34

1.8.1 Coagulación o aglutinación.- 34

1.8.2 Péptidos Antimicrobianos.- 35

1.9. Virus de la Mancha Blanca 36

1.9.1 Enfermedades Virales. 36

1.9.2 WSSV o White Spot Syndrome Virus o WSSV 37

1.9.3 Impacto causado por WSD en el Ecuador.- 37

CAPITULO II. MATERIALES Y MÉTODOS 39

2.1. Material Biológico 39

2.2. Verificación de la virulencia del material infeccioso con WSSV 40

2.2.1 Diseño del Experimento .- 40

2.2.2 Materiales .- 40

2.2.3 Procedimiento .- 41

2.3. Infección experimental con WSSV 41

2.3.1 Estrategia de infección 42

2.3.2 Muestreos 43

2.4. Análisis Inmunitarios 44

2.4. 1 Hemograma 44

2.4.2 Evaluación de actividad de hemocitos hialinos mediante cuantificación del Anión Súper Oxido y ELISA indirecto contra □2 MG. 44

2.4.3 Evaluación de los hemocitos Semi-granulosos y Granuloso mediante detección y estimación de la Actividad Fenoloxidasa 45

2.4.4 PCR para detección de WSSV 45

2.4.5 Histo-patología 45

2.4.6. Tinción DAPI - 4',6-Diamidino-2-fenilindol di clorhidrato para detección de Apoptosis. 47

2.4.7 Análisis estadístico. 48

CAPITULO III. ANÁLISIS DE SITUACIÓN ACTUAL 49

3.1. Ensayo de virulencia del material infeccioso 49

3.2. Ensayo de infección con WSSV 50

3.2.1 Eficacia de la infección 50

3.2.2 Animales Moribundos – (M) 51

3.2.3 Animales que sobrevivieron a la exposición a WSSV (SPV) 55

CAPITULO IV. DISCUSIÓN 66

CONCLUSIONES 78

RECOMENDACIONES 81

ANEXOS 83

BIBLIOGRAFÍA 103

ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribunocleico
ANOVA: Análisis de Varianza
BCIP: 5-bromo-4-cloro-3-indolyfosfato en dimetylformamida
BSA: Bovine Serum Albumine
Cac: Cacodilato de Sodio
CLNa: Cloruro de Sodio
CLK: Cloruro de Potasio
ClMg: Cloruro de Magnesio
CTAB: Cetiltrimetilamonio Bromuro
DMSO: DImethylsulfoxide
EDTA : Ácido Etilenodiaminotetracético
HCL: Ácido Clorhídrico
HH: Hemocito Hialino
L-Dopa: L-3.4-dihidroxifenil-alanina
M: moribundos
.mM: Mili-molar
NTH: Número total de hemocitos
O-2: Anión Súper oxido
Ol: Órgano Linfoide
PBS: Phosphate buffer solution
PCR: Reacción en cadena de Polimerasa
PMA: Phorbol 12, Myristate 13-Acetate
PO: Fenoloxidasa
PreSPV: pre superivivientes
RPM: Revoluciones por minuto
SG : Semi granulosos
SPV150h: Supervivientes 150 horas post infección
SPV 96h: pre supervivientes 96 horas post infección
T=O: Tiempo Cero
TBS: Tris Base Saline
TE: Tris/Acido Etilenodiaminotetracético
TWEEN: Polyoxyethylene-sorbitan monolaurate
WSSV : Síndrome del virus de la mancha blanca
YHV: Virus de la cabeza amarilla

ÍNDICE DE FIGURAS

Fígura # 1. Tinción DAPI: Marcado de hemocitos atípicos en proceso de apoptósis, las áreas más brillantes corresponden a material genético condensado. (Barra: 10 µm) 53

Fígura # 2. Histología e Inmunohistoquímica para WSSV. lesiones y presencia de células infectadas en los camarones moribundos, tejido analizado OL 54

Fígura # 3. Histología: Presencia de esferoides en el OL de los grupos T=0, M, SPV 96h, SPV 150h. Marcado TUNEL para apoptósis en los esferoides presentes en el OL de los sobrevivientes (Recuadro inferior central) (Barra=10µm)..... 60

Fígura # 4. Histología: esferoides ectópicos ubicados en las glándulas tegumentales y tejido conectivo. Inmunohistoquímica para hemocitos hialinos con marcado positivo (Color azul) (Barra= 10µm)..... 63

Fígura # 5. Inmunohistoquímica positiva para hemocitos hialinos. Tejidos analizados sobrevivientes y tiempo cero. (Barra = 10 µm)..... 64

Fígura # 6. Histología: Presencia de grandes áreas vacuolizadas, posiblemente un nuevo tipo de muerte celular (Barra = 10 µm) 74

ÍNDICE DE GRAFICOS

Gráfico # 1. Curva de Supervivencia de los animales del blanco vs. Los animales infectados 50

Gráfico # 2. Indice y Prevalencia para WSSV (PCR) en los grupos de estudio...51

Gráfico # 3. Estrategia empleada de estudio seguido en este trabajo, Hemocitos hialinos, semi-granulosos, granulosos, PO reacción Fenoloxidasa. 68

ÍNDICE DE ANEXOS

ANALISIS 84

HOMOGENEIDAD DE VARIANZAS DE LOS ANALISIS REALIZADOS.....97

SOLUCIONES.....101

BIBLIOGRAFIA.....103

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla # 1. Clasificación taxonómica del camarón *P. vannamei* 39

Tabla # 2. Tiempo de post-infección e intervalos de revisión. 42

Tabla # 3. Distribución de cortes histológicos 47

Tabla # 4. Categorización de sub-poblaciones hemocitarias 48

Tabla # 5. Datos hematológicos correspondientes a los animales moribundos . 52

Tabla # 6. Distribución porcentual de las sub.-poblaciones hemocitarias 55

Tabla # 7. Tabla de Contingencia mostrando la redistribución en frecuencias de los rangos de los hemocitos hialinos en los SPV 150h 56

Tabla # 8. Tabla de Contingencia hemocitos de semi-granulosos entre individuos susceptibles del T=O vs. Individuos sobrevivientes SPV 150h 57

Tabla # 9. Indicadores de hemocitos hialinos y semi-granulosos - SPV vs. TO 58

Tabla # 10. Infiltración de hemocitos en los tejidos..... 59

Tabla # 11. Distribución de los esferoides..... 61

INTRODUCCIÓN

Casi una década atrás el país sufrió una de las crisis más grandes en el campo acuícola. El virus de la Mancha Blanca o WSSV (por sus siglas en inglés), posiblemente introducido desde Asia (1), ocasionó altos niveles de mortalidad en las piscinas de producción de camarón de la costa ecuatoriana.

El impacto social provocado por la mancha blanca se hizo presente además en las comunidades de pescadores de la costa, ya que a causa de la rápida propagación del WSSV la Subsecretaria de Recursos Pesqueros a través del Acuerdo Ministerial No. 106 emitido en el 2002, prohibió la captura de larvas silvestres en todo el territorio de la costa ecuatoriana. Con la desaparición de los larveros y la prohibición de uso de larvas salvaje, el suministro de estas paso a manos de los laboratorios.

En la actualidad las principales limitantes de la industria acuícola son las enfermedades infecciosas y no infecciosas (2). El eje fundamental del cultivo radica en los organismos. Para una especie que se ha cultivado durante mucho tiempo a gran escala y fuera de su ambiente natural, es necesario tomar en cuenta las diversas variables que influyen en la susceptibilidad a las enfermedades y por tanto en la supervivencia como por ejemplo; alimentación, temperatura, salinidad, oxígeno, etc. En los sistemas de cultivo se trata de simular en un espacio confinado, una piscina

camaronera en este caso, las condiciones del ambiente natural. Al recrear estas condiciones y aumentar la densidad de organismos en un ambiente cerrado, la probabilidad de una infección a causa de un patógeno, es muy alta. Así, se deben tomar medidas para evitar que una infección focalizada se convierta en un brote masivo. Entre las causas por las cuales un patógeno llega a producir una epidemia en un sistema de cultivo podemos mencionar:

Prácticas de Manejo.- Malas prácticas de manejo provocan estrés aumentando el riesgo de producir brotes epidémicos, luego de la mancha blanca se han ido implementado, poco a poco, buenas prácticas de cultivo. Además estrictas medidas de control en todos las fases del cultivo son necesarias y requeridas por las exigencias de exportación a los países europeos y norteamericanos.

La densidad.- Tratar de cultivar el mayor número de animales en el menor espacio posible, provoca que una breve infección focalizada en un individuo se pueda transmitir con mayor facilidad horizontalmente a los otros. En la actualidad el sector camaronero ha optado por bajar densidades de siembra y estas no superan los 10 animales /m^2.

El estrés.- Las variaciones en los parámetros ambientales, confinamiento, cambios bruscos en los niveles de oxígeno y especialmente fluctuaciones de la temperatura provocan estrés en los organismo, disminuyendo sus defensas y favoreciendo los brotes de enfermedad.

Inmuno deficiencias.- El estrés provocado por la variaciones ambientales afectan el sistema inmune permitiendo de esta forma el ingreso e infección de múltiples patógenos.

Portales.- El WSSV utiliza diferentes tipos de tejido para su ingreso como: epitelios, branquias, glándula antenal y glándulas tegumentales. Existe además una gran variedad de organismos que actúan como reservorios y vectores. En el caso del WSSV tenemos larvas de insectos, otros camarones y diversidad de crustáceos (3).

Actualmente existen pocos estudios sobre la capacidad inmune que posee el camarón blanco *P. vannamei* ante ataques virales. Varios estudios han demostrado que esta especie posee una respuesta eficaz ante agentes bacterianos y micóticos (4) utilizando reacciones enzimáticos como el Sistema fenoloxidasa (PO.) o la liberación de radicales de oxígeno durante la fagocitosis por parte de los hemocitos hialinos (4; 5), así como la generación y liberación de moléculas microbicidas, tales como la Peneidinas.

Durante eventos de Mancha Blanca (WSD, por sus siglas en inglés), los análisis realizados en estudios observacionales, mostraron que los camarones sobrevivientes presentaban un incremento significativo en el porcentaje de hemocitos hialinos y semi-granulosos, mientras que los granulosos no mostraban modificaciones o su número se encontraba reducido (6). Esta variación fue considerada como un indicador

de supervivencia, ya que los hemocitos granulosos son muy susceptibles a la infección por WSSV (7). Un alto porcentaje de hemocitos no funcionales (atípicos) fue considerado como indicador de infección y letalidad.

Entre los signos patológicos más observados en infecciones virales es la apoptosis, existe gran controversia en cuanto se refiere al rol de la apoptosis durante infecciones en el camarón. Algunos autores sugieren que la apoptosis no debe ser considerada como parte importante de la resistencia viral (8). Khanobdee et al,(9) indican que durante una infección con YHV, los animales moribundos presentan deterioro en tejidos importantes como: hemocitos, branquias, corazón y órgano Linfoide (LO). Otros autores sugieren que la apoptosis es un medio para frenar la replicación viral ya que las células que han sido infectadas por ADN viral se suicidan evitando así la replicación de viriones (10).

Este estudio tuvo como objetivo determinar si la variación en la fórmula hemocitaria así como también el comportamiento de los hemocitos circulantes e infiltrantes (actividad PO, formación de esferoides) deben ser considerados parámetros de supervivencia en el P. vannamei ante un evento de WSSV. Además se estudió la apoptosis como proceso de muerte celular en los hemocitos de animales infectados y en los esferoides.

La evolución ha sido trazada en gran medida por el sistema inmune de los organismos. En el caso de los crustáceos su sistema inmune está basado en respuesta humoral y celular la misma que radica en la identificación, detección y eliminación de partículas foráneas en el camarón. (11). Este sin embargo se ve afectado por factores como una pobre calidad del agua, enfermedades y presencia de toxinas (12)

Múltiples tipos de organismos tienen la capacidad de causar estragos en la salud de los individuos, sean estos vertebrados o invertebrados. La capacidad de supervivencia de estos últimos radica en su sistema inmune y la capacidad de reacción del mismo. Existen barreras de defensa internas como externas, desde epitelios generales a tejidos específicos como también la capacidad de secreción de distintos tipos de sustancias, moléculas y reacciones químicas y enzimáticos que le permiten erradicar o suprimir al patógeno.

Distintos tipos de microorganismos son los que afectan a la salud de los crustáceos. Gérmenes, bacterias, hongos, virus son capaces de atravesar las barreras del sistema inmune. Uno de las primeros medios de defensa que poseen los crustáceos es el exoesqueleto, este separa el delicado interior del animal del medio externo. De acuerdo a Supammattaya, et al.,(12) el exoesqueleto posee una especie de mucus que es producido por las glándulas tegumentales que se encuentra debajo del epitelio sub-

cuticular. Este mucus es capaz de evitar el crecimiento de hongos en el exoesqueleto, Hasson et al, (13) ha reportado la formación de esferoides ectópicos asociados con las glándulas tegumentales en camarones infectados con Síndrome de Taura (TSV).

En el caso de que esta barrera no funcione, el sistema interno de defensa se activa y procede a actuar. Entre los mecanismos de defensa se encuentran los de carácter humoral y celular.

CAPITULO I. SISTEMA INMUNE

1.1. Respuesta Celular

Al igual que los organismos complejos, los crustáceos poseen un grupo de células especializadas para evitar la proliferación de patógenos, y estas a su vez realizan distintas acciones. Los hemocitos son las células encargadas de la detección y eliminación de las partículas extranjeras a través de procesos de fagocitosis, encapsulación y nodulación, estos se clasifican por su morfología de la siguiente forma:

- Hialinos: intervienen en procesos fagocíticos y en coagulación (14)
- Semi-granulosos, realizan además de la fagocitosis, encapsulación y sistema proPO, responsables de la melanización. Además de responder ante infecciones

ocasionadas por bacterias a través de la liberación de moléculas microbicidas tales como las peneidinas (15).

- Granulosos, intervienen en el almacenamiento de enzimas que forman parte del sistema de PO pero en mayor porcentaje que los semi- granulosos, además de actuar como reservorio de sustancias microbicidas llamadas Peneidinas (15).

Durante un evento infeccioso natural con WSS (6) existen variaciones en las poblaciones hemocitarias del organismo, el número de hemocitos hialinos y semi-granulosos aumenta en los camarones sobrevivientes, mientras que en los moribundos se observó la presencia de hemocitos atípicos o apoptóticos. Este fenómeno también se ha presentado en *P. monodon* en donde los cambios en la fórmula hemocitaria son producidos ya sean por una infección viral o bacteriana o también por variaciones en los parámetros medio ambientales como, concentración de oxígeno en el agua (12),

El aumento de la sub-población de hemocitos hialinos y su actividad fagocítica debido a infecciones virales ha sido determinado en especies como *P. vannamei* (6), *P. monodon* (12), como también la disminución de los hemocitos Semi-granulosos.
En conjunto con los hemocitos, los fagocitos fijos desempeñan un rol importante en el combate contra partículas foráneas dentro del camarón blanco *P. vannamei*. Por otra parte Supammattaya et al, (12), establece que los fagocitos fijos realizan un proceso de fagocitosis en el órganos Linfoide, branquias y corazón del *P. monodon*. Hasson et al.,(13) comparó el órgano linfoide (OL) con un filtro ya que este tiene la

capacidad de retener partículas virales a fin de que sean fagocitadas por los fagocitos fijos y hemocitos infiltrados en los espacios hemales del Ol.

1.2.Sistema Inmune de los Vertebrados

El sistema adaptativo de defensa de los vertebrados desciende del sistema inmune que poseen los invertebrados, un sistema básico y algunas veces considerado primitivo y poco evolucionado. La inmunidad de los vertebrados radica en la respuesta antígeno-anticuerpo, en el reconocimiento específico y eliminación de un patógeno a cargo de moléculas especializadas conocidas como los anticuerpos. (16).

El máximo logro alcanzado por los vertebrados fue el desarrollo de una memoria inmune que le permite recocer a un patógeno que ha infectado o ingresado con anterioridad al huésped.

Su respuesta puede ser clasificada de dos maneras:

- Respuesta Pasiva o de Memoria Corta
- Respuesta Activa o de Memoria de larga duración, esta es obtenida luego de una infección o a través de vacunas.

Las moléculas en las que se basa la especificidad, las inmunoglobulinas forman parte de la respuesta adaptativas, estas son producidas por los linfocitos.

1.3.Sistema Inmune de los Invertebrados

Siendo el grupo más numeroso de animales en la faz de la Tierra, los invertebrados fueron las primeras criaturas que se enfrentaron a un ecosistema en formación en una Tierra virgen y salvaje. En la actualidad son los organismos con mayor adaptabilidad para sobrevivir en cualquier medio, desde parajes desérticos como el Valle de la Muerte, California hasta las mismas entrañas de la tierra, en cavernas profundas.
Estos organismos poseen un sistema no adaptativo y no especifico. Es un sistema basado en respuestas humorales y celulares. Se ha identificado receptores (PRRs) que poseen la capacidad de detectar agentes infecciosos de origen bacteriano, micótico y viral. Li Shi Yang., et al.(17), determinó la presencia de estos receptores en múltiples tejidos del camarón blanco *P. vannamei*, como branquias, hemocitos, corazón, músculo, nervio, etc.

Siendo un poco radicales y en base a algunos argumentos establecidos por Flegel, (18), se sugiere que la supuesta memoria del sistema inmune de los crustáceos no radica en los efectores fagocitadores u otros mecanismos de defensa celular. La memoria radica en el virus, debido a los repetidos procesos infeccioso correspondiente al mismo agente viral. Esto le proporcionaría al individuo una respuesta en cierto grado específica.

La capacidad que posee el organismo de eliminar células que contengan información viral mediante apoptosis (19), es uno de los métodos más controversiales, ya que

algunas veces puede ocurrir en tejidos muy importantes y ejercen un efecto devastador en la salud del animal.

Algunos tipos de virus como el Adenovirus, Baculovirus, Myxomavirus poseen la capacidad de suprimir esta muerte celular a través de la producción de un tipo de proteína que bloquea la Apoptosis (19).

1.4.Características del Sistema Inmune de los Crustáceos

Su sistema inmune basado en respuestas celulares y humorales le permite al camarón determinar cuales son microorganismos patogénicos y cuales son beneficiosos (2) ya que ciertos microorganismos habitan como simbiontes beneficiosos dentro de estos invertebrados.

1.5.Características Hemocíticas y tipos de hemocitos

Tanto en crustáceos como bivalvos la hemolinfa es la encargada del transporte interno de oxígeno, a través de la hemocianina, y otros componentes alrededor de todo el hemocele (20, 21). Al Igual que la sangre en los vertebrados, la hemolinfa constituye un tejido de defensa de alta calidad. En ella circulan hemocitos de variados tipos con distintas funciones como: el reconocimiento de partículas extranjeras, secreción de ciertas proteínas (22), fagocitosis (23), generación del sistema profenoloxidasa responsable de la melanización (24), encapsulación y nodulación (25) y moléculas de comunicación celular (26), y la producción de péptidos antibacterianos (27) así como también la hemoaglutinación (28).

Según algunos autores (29, 30 y 31) los hemocitos se clasifica de la siguiente manera:

- Hialinos
- Semi-granuloso
- Granulosos
- Atípicos o Amorfos

El número total de hemocitos (NTH) tiende a variar durante procesos de infección a causa de patógenos, el número de estos como también la naturaleza de sus sub-poblaciones tienden a disminuir durante un proceso de infección viral, como la Mancha Blanca (32, 33, 34).

1.5.1. Hemocitos Hialinos

Los hemocitos hialinos son esféricos, pequeños y grandes. Su coloración es azul opaca y clara, sin brillo al ser observados en el microscopio óptico de contraste de fases. Actúan en los procesos de coagulación (2, 26) y el proceso de fagocitosis de partículas extranjeras en conjunto con los hemocitos fijos que se encuentran distribuidos en distintos tipos de tejidos (35).

Según Montesdeoca et al., (6), los hemocitos hialinos pueden ser esenciales en los mecanismos de defensa ante infecciones virales como es el caso de WSSV, la población de hemocitos hialinos aumenta cuando la infección viral es controlada.

1.5.2. Hemocitos Semigranulosos y Granulosos

Intervienen en el proceso de liberación de proteínas del sistema profenoloxidasa (36), además de fagocitar, nodular, encapsular y liberar peneidinas través de sus gránulos. (26).

1.5.3 Hemocitos Atípicos

Estos cuerpos se encuentran presentes en la hemolinfa de camarones moribundos. Algunos autores sostienen que son el producto de un proceso de infección a las células hialinas que fueron consumidas por el proceso de replicación viral (6). Estas células se encuentran en mayor número en los camarones moribundos y presentan una forma grande, oscura y esférica.

1.6. Mecanismos de Defensa Celular

1.6.1 Fagocitosis

Considerado como uno de los procesos más comunes y eficaces en la batalla contra los patógenos presentes en los organismos vertebrados como invertebrados. Es un respuesta celular ante un proceso de reconocimiento de una partícula extranjera.

En los camarones y otros crustáceos, este mecanismos de defensa puede ser realizado por los hemocitos hialinos, semi-granulosos y algunas veces por los granulosos. Los crustáceos poseen ademas fagocitos fijos ubicados alrededor de los sinus hemales

(37), branquias, órgano linfoide, corazón y otros tipos de tejido de carácter conectivo (38) capturan y encierran en vacuolas a pequeñas partículas ajenas al camarón.

En la fagocitosis y el choque respiratorio y otras actividades realizadas por la célula, se liberan intermediarios reactivos de oxígeno (ROIs – Reactive Oxygen Intermediates) como peróxido, súper óxido, oxígeno y radicales hidroxilo (4, 38).

Durante el choque respiratorio se liberan enzimas en el fagosoma durante el proceso de eliminación de partículas fagocitadas (39). Los ROIs son considerados sustancias microbicidas (5).

1.6.2 Encapsulación y Nodulación.-

La Encapsulación y nodulación son procesos de defensa celular realizados por los hemocitos granulosos y semi- granulosos (38). La nodulación es un proceso en el cual actúan varias capas de hemocitos, estos tratan de atrapar a la partícula extraña. Durante este proceso, el microorganismo es fagocitado por varios hemocitos y posteriormente es melanizado a través del sistema proPO. De manera similar ocurre con la encapsulación donde la partícula a eliminar es muy grande y múltiples capas de hemocitos la cubren para posteriormente melanizarla.

1.6.3 Apoptosis.

Defensa inmune o destrucción celular? La apoptosis es un mecanismos en el cual la célula se destruye o se suicida debido a múltiples razones o estímulos (19). Este mecanismo ha sobrevivido a la evolución y se ha mantenido desde los básicos nemátodos hasta el hombre actual (40).

La necrosis y la apoptosis son dos procesos de muerte celular con distintos efectos pero que poseen similares receptores, señales de transducción y mecanismos de cito-toxicidad (41). La muerte de las células luego de un proceso apoptótico no produce una respuesta inflamatoria y sus desechos son rápidamente dispuestos por acciones como la fagocitosis.

En la necrosis existe una rápida pérdida de la membrana celular (42), fallas en la regulación interna como en los lípidos que conforman la membrana y liberación de sustancias de la célula colapsada que pueden ocasionar daños a los tejidos y células circundantes.

Según Obrien,et al (19) algunos tipos de virus poseen cierto tipo de proteínas que les permite suprimir o bloquear la apoptosis para de esta manera poder replicarse sin ningún problema en el interior de la célula, ejemplos de ellos tenemos a los Herpes virus, al virus de la Hepatitis y al Papillomavirus (43).

La apoptosis se presenta a nivel celular con cambios en la membrana, la formación de blebbing o burbujas con material genético del núcleo, condensación de la cromatina y la fragmentación total de la célula para su posterior eliminación a través de fagocitosis (19).

Múltiples son los tipos de estímulos que provocan la apoptosis: reacciones químicas, cambios en el medio ambiente, infecciones virales o bacterianas, son algunos de los estímulos capaces de inducir al suicidio celular.

Algunos autores sugieren que la muerte de la mayoría de los camarones moribundos infectados con enfermedades virales como WSSV o YHV se debe a la apoptosis presente en los tejidos (44, 9). Esto podría significar que durante el proceso de muerte celular tanto el tejido infectado como el tejido sano serían afectados por la apoptosis, provocando un desbalance en el funcionamiento interno del animal.

Esta capacidad que poseen los organismos de evitar la propagación de patógenos de una manera drástica y eficaz y algunas veces mortal tanto para el patógeno como para el huésped, puede ser considerada como una manera de salvaguardar la integridad del organismo. Este proceso se ha observado en bacterias infectadas por un bacteriófago evitando de esta manera una infección masiva en toda la colonia, según Vaux et al(40), se considera en este caso a la colonia de bacterias como un solo organismo. "El sacrificio de pocos es necesario para el bienestar de muchos ".

Como parte del sistema de control de la apoptosis, Potchanapond G, et al.,(45), determinaron la presencia de una proteína conocida como Fortilin o TCTP (translationally controlled tumor protein) en el *P. monodon*. Esta proteína también esta presente en los vertebrados y vegetales, que los protege de la muerte celular durante eventos de estrés. Estos autores reportaron grandes cantidades de Fortilin en la hemolinfa durante los primeras etapas de la infección con WSSV, pero la expresión de esta decayó rápidamente en los animales moribundos.

1.7 Mecanismos de liberación de compuestos celulares.

1.7.1 Sistema Fenoloxidasa

Este sistema de defensa común en los artrópodos está basado en las reacciones químicas de la cascada profenoloxidasa (proPO) (11). Supamattaya et al., (38), estableció que este sistema actúa basado en el reconocimiento de lipopolisacaridos presentes en la membrana de las bacterias y los betaglucanos presentes en los hongos.

Los hemocitos que poseen granulos liberan el sistema proPo durante la invasión de patógenos (38). La cascada de proPO es responsable de la producción de sustancias microbicidas como (26) las quinonas que dan origen a la melanina, esta junto a sus intermediaros han demostrado ser fungistáticos (46).

Bachére, (22) menciona que la activación de la coagulación de la hemolinfa se encuentra ligada al sistema de proPo, esto también es mencionado por Nagai y Kawataba, (47) Al establecer que durante el proceso de coagulación en el cangrejo herradura, la enzima de coagulación transforma a la hemocianina transportadora de el oxígeno en fenoloxidasa.

1.8. Mecanismos Humorales de Defensa.-

1.8.1 Coagulación o aglutinación.-

Esto proceso esta a cargo de las proteínas conocidas como las lectinas, son muy importantes en el sistema inmune de los animales ya sean vertebrados como invertebrados.

En los crustáceos las lectinas o aglutininas (38) son capaces de crear redes o mallas entre las proteínas presentes en las paredes celulares de los cuerpos extraños como el caso de las bacterias, de esta forma se crea un efecto de aglutinación.

Múltiples son los estímulos que influyen en la coagulación, entre los cuales están los lipopolisacaridos presentes en las paredes celulares de las bacterias. Debido a su capacidad de poder detectar o reconocer un cuerpo extraño, son consideradas como activadores del sistema inmune (48).

Supamattaya,(12), establece que la lectina presente en el *P. monodon*, es una proteína con la capacidad de hacer las veces de barrera o pared contra un gran número de patógenos, causando lo que se conoce como aglutinación, esta actividad también fue determinada por Rodríguez, T (28) en el *P. schimitti*, donde la aglutinación se ve afectada por factores como el pH y variaciones en la temperatura.

Como mencionamos la coagulación es un proceso básico en la defensa ante partículas consideradas foráneas para el organismo como también en el control de la pérdida del fluido vital. Esto se debe a que los crustáceos poseen un sistema de circulación abierta y ante una herida mínima podría ocurrir una perdida masiva de hemolinfa si esta no tendría la capacidad de coagularse con rapidez.

1.8.2 Péptidos Antimicrobianos.-

Los PAMs (Péptidos/Polipéptidos anti-microbianos) son la respuesta ante la transcripción de un gran número de genes que se activan ante un evento producido por algún patógeno. Son liberados en la hemolinfa y poseen una acción devastadora en las partículas dañinas (22).Este proceso de cascadas químicas no es exclusivo de los camarones, los PAMs son una excelente línea de defensa del sistema inmune del reino animal y vegetal (38).

Supamattaya, menciona que estas proteínas incrementan el K^+ dentro de las bacterias, de esta forma se ve alterado el metabolismo de la misma, dirigiéndola a una muerte segura, otras péptidos tienen la capacidad de atacar la capacidad de replicación de las

bacterias. Destoumieux et al.,(27) Supamattaya et al.,(38) y Bachére (22) mencionan la presencia de tres tipos de péptidos presentes en el *P. vannamei* que poseen la capacidad de inhibir tanto bacterias como hongos, estas fueron llamadas Penaeidines (27).

1.9. Virus de la Mancha Blanca

1.9.1 Enfermedades Virales.

Cuando cultivamos una especie ya sea vertebrado o no, tratamos de replicar las condiciones que encontraría en su medio ambiente para desarrollarse, refiriéndonos a su alimento y entorno, pero al referirnos a cultivo o cría, estamos hablando de grandes densidades de producción y de siembra para satisfacer las necesidades humanas básicas como es la alimentación y en segundo plano la protección ambiental de los mares y su población natural.

Al trabajar con grandes densidades, sometemos a los organismos a estrés ambiental, disturbios alimenticios y contaminación. Todas estas acciones en conjunto afectan la salud y favorecen la aparición de alguna enfermedad (2).

Los cultivos de especies no vertebradas tienden a ser mas susceptibles con respecto a las enfermedades virales, bacterianas o micóticos. Según Flegel, (18) esto se debe a que los invertebrados poseen un interacción distinta con el patógeno, en este caso nos referimos a los virus, ya que los crustáceos pueden ser considerados portadores de por vida sin mostrar ningún signo de enfermedad infecciosa.

Entre las enfermedades virales mas graves que han afectado a los camarones tenemos al IHHNV, descubierto en el camarón azul *Penaeus stylirostris* y *P. vannamei*. El virus del Síndrome de Taura o TSV que fue descubierto en Ecuador y el WSSV conocido en latino América como el virus de la Mancha Blanca.

1.9.2 WSSV o White Spot Syndrome Virus o WSSV

Este virus de ADN de cadena doble con peso molecular de 150 kb perteneciente a la familia Nimaviridea (3) ha causado grandes estragos en la industria acuícola a nivel mundial. Posee el más amplio rango de infección en crustáceos y otros artrópodos ya que se lo ha detectado en larvas de insectos, langostas, cangrejos, y gran variedad de camarones (48, 3). La forma en que se transmite es de manera horizontal, a través del alimento, canibalismo y agua (49) según Mohan, (50), el virus puede traspasarse de los progenitores a las crías.

Durante la replicación del virus los viriones genera núcleos hipertrofiados sin cuerpos de oclusión (51) esta enfermedad produce daños en el material genético presente en el núcleo celular, inclusiones intra celulares basofílicas y necrosis en ciertos tejidos .

1.9.3 Impacto causado por WSD en el Ecuador.-

En 1999 es declarada formalmente la presencia del principal patógeno conocido hasta ahora en nuestro país, el mismo que provocó una de las caídas mas conocidas del

mercado de producción, compra y venta de camarón, con perdidas aproximadas e de mil millones de dólares (52). En ese momento nuestro país recién se recuperaba de las pérdidas ocasionadas por el Síndrome de Taura y los fenómenos climáticos como es El Niño.

Cabe recalcar que las regulaciones fito sanitarias en aquella época y las buenas prácticas de manejo de cultivos acuícola eran una utopía que solo se podía apreciar en textos de la FAO o de otros países. Tal vez si la regulaciones de importación como también la manera de llevar los cultivos en dichos días hubiera sido un poco mas responsable y ligada a los protocolos básicos de cultivos de especies orgánicas, la situación hubiera sido distinta.

En la actualidad, protocolos, trazabilidad y múltiples reglamentaciones rigen la producción del mercado del camarón. En el ámbito legal, científico y económico, nuestro país ha sido obligado a cumplir normas internacionales para la venta y exportación del producto a otros países, inclusive hemos podido incluir productos acuícola en el exigente mercado Suizo. (53). La competencia a nivel mundial radica en la calidad del producto y la forma en que se presenta al consumidor.

CAPITULO II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1.Material Biológico

La especie con la que se realizó el bio-ensayo, es el camarón blanco *P. vannamei* descrito por Boone en 1931. Su hábitat natural va desde Sonora, México hasta Tumbes, Perú, también se lo puede localizar en el Golfo de Panamá. En la Tabla 1 se presenta la clasificación Taxonómica de *P. vannamei*.

Tabla # 1. Clasificación taxonómica del camarón *P. vannamei*

REINO	Annimalia
PHYLUM	Artrópoda
SUB-FHYLUM	Crustacea
CLASE	Malacostraca

ORDEN	Decápoda
SUB-ORDEN	Dendrobranchiata
FAMILIA	Penaeidae
GENERO	Penaeus
ESPECIE	*Penaeus vannamei*

Fuente: Internet - Elaborado por Daniel Pedrazzoli

2.2. Verificación de la virulencia del material infeccioso con WSSV

2.2.1 Diseño del Experimento .-

Este experimento se realizó a fin de determinar la efectividad de la virulencia de la papilla de WSSV.

2.2.2 Materiales .-

- Set experimental.
- 10 acuarios con capacidad individual de 50 litros.
- 10 carameleras con capacidad de 2 litros cada una.
- Inóculo de WSSV (1ml/l)
- 5 animales por acuario, 50 animales en total
- 1 animal por caramelera, 10 animales en total

2.2.3 Procedimiento .-

Se siguieron dos diseños de manera simultánea; infección individual realizada en carameleras, infección colectiva realizada en acuarios. 5 carameleras como también 5 acuarios fueron sometidos a infección por baño a dos diluciones: Stock concentrado y dilución 1/10.

- A los acuario con capacidad de 20 litros de agua, se adicionó 20 ml de inóculo.
- A las carameleras con un volumen 1 litro se les colocó 1 ml de inóculo.

El experimento concluye una vez finalizada la mortalidad (luego de dos días sin ningún muerto contando desde el último moribundo recolectado).

2.3.Infección experimental con WSSV

La infección fue individual en carameleras utilizando el Stock concentrado. Un total de 128 camarones *P. vannamei* fueron usados en este experimento, todos ellos fueron colocados en el set experimental a una temperatura de 30 □ C. Los animales fueron distribuidos en 6 bandejas Marías con 14 carameleras cada una y un flujo continuo de agua dulce a 30 ° C.

La temperatura fue regulada previamente para que alcance los 30 ° C, cada 2 horas se realizó un control térmico a fin de evitar un estrés por variaciones térmicas.

Previamente se realizó la limpieza y desinfección a todo el set incluyendo líneas de aire con alcohol, antes de transportar a los organismos para su aclimatación.

2.3.1 Estrategia de infección

1.- Se estimó una mortalidad de aproximadamente 40 % del total de animales a infectar. De los 84 animales se calculó tener un máximo de 30 moribundos, y al menos 30 sobrevivientes.

2.- La muestra correspondiente al tiempo cero (T=O), antes de la infección, fue de 30 animales elegidos aleatoriamente entre las 5 bandejas destinadas a la infección. Se consideró una bandeja María de control no infectada separada del grupo de infección, esta tuvo el mismo número de animales (#14) que los otros tratamientos que fueron infectados .

3.- El bioensayo de infección fue considerado como un experimento observacional con intervalos de tiempo para realizar una revisión del comportamiento de los camarones como también para proceder a la recolección de los moribundos y su posterior análisis, se detallan en la Tabla 2.

Tabla # 2. Tiempo de post-infección e intervalos de revisión.

Tiempo 0 a 48 horas de post infección	Revisión cada 6 horas
48 horas a las 72 horas de post infección	Revisión cada 2 horas

72 horas hasta finalizar el bio-ensayo	Revisión cada 4 horas

Fuente: elaborado por Daniel Pedrazzoli

Estos intervalos fueron calculados en base a infecciones previas que establecen que la mayor mortalidad en infecciones individuales se da entre las 48 y 72 horas después de la infección. Luego de las 72 horas , si ya no se observa mortalidad el experimento es dado por concluido.

4.- 84 camarones fueron infectados por baño usando 1 ml de inóculo de WSSV del stock concentrado (se guardó una muestra para cuantificar el virus por análisis de PCR en tiempo real).

5.- A las 6 horas se completo a 2 litros con agua de mar filtrada, luego a las 12 horas se realizó recambio total del agua a fin de evitar deterioro.

2.3.2 Muestreos

El muestreo fue diseñado para comparar al tiempo cero con los sobrevivientes, para determinar los datos hematológicos de la hemolinfa, se analizó el NTH y sub-poblaciones de hemocitos circulantes.

Los 30 animales del tiempo cero fueron elegidos y capturados aleatoriamente antes de la infección, posterior a la infección, a las 96 horas fueron elegidos al azar 10 animales sobrevivientes (SPV 96h). A las 150 horas post infección se realizó el muestreo final de sobrevivientes, recolectando 30 animales (SPV 150h).

Con respecto a los análisis histopatológicos, se tomaron 10 animales del tiempo cero como también 10 animales sobrevivientes, los análisis se focalizaron en modificaciones del Ol.

Adicionalmente a las 96 horas post infección se sortearon 10 animales a los cuales solo se realizaron análisis histopatológicos a fin de corroborar las modificaciones en el Ol.

2.4.Análisis Inmunitarios.

2.4. 1 Hemograma

La técnica empleada para este análisis fue descrito por Muñoz,(54), el procedimiento se detalla en el Anexo 1.

2.4.2 Evaluación de actividad de hemocitos hialinos mediante cuantificación del Anión Súper Oxido y ELISA indirecto contra α2 MG.

Basados en el método de Muñoz et al, (4). Se estimó la capacidad fagocítica de los hemocitos hialinos a través de la generación de O_2^-. El procedimiento se detalla en Anexos El ensayo ELISA se realizó fijando 20.000 células por hoyo de cada muestra (duplicado o triplicado según la disponibilidad de la muestra), en placas MaxiSorp (Nunc), con tampón CBC (Carbonato Bicarbonato tampón), se utilizó en dilución 1/10 anticuerpo específico para hemocitos hialinos, el 41B12

2.4.3 Evaluación de los hemocitos Semi-granulosos y Granuloso mediante detección y estimación de la Actividad Fenoloxidasa

La actividad fenoloxidasa recae en los hemocitos semi-granulosos y granulosos. La técnica de detección de PO estimulable basado en los protocolos estandarizados de Echeverría, (55). La actividad enzimática de PO Total se realizó siguiendo el procedimiento de Hernández., et al., (56) El procedimiento esta detallado en Anexos I.

2.4.4 PCR para detección de WSSV

Para los moribundos se realizó la extracción de ADN a partir de la hemolinfa empleando el método de CTAB. Para los otros grupos como T=O, sobrevivientes y blancos se utilizo el método de Isocyanato de Guanidina, usando como muestra las branquias fijadas en alcohol al 95 %. La PCR anidada se hizo utilizando los iniciadores de Kimura, et al(57) Procedimiento (Anexos).

2.4.5 Histo-patología

A través de la histología se diagnosticó las condiciones del organismo, el grado de infección de sus tejidos y también determinar las áreas afectadas. La técnica aplicada se basó en los protocolos de Bell y Ligthner, (58).

Se puso especial atención al órgano linfoide, se buscó esferoides en el Órgano Linfoide como también esferoides ectópicos. En la tabla 3 mostramos la distribución

de placas y análisis histológicos que se realizaron a los distintos grupos de animales muestreados. El análisis histológico se completó con Hibridación *In situ* e histoquímica tanto para hemocitos hialinos como para WSSV y también se empleo la técnica Terminal Deoxynucleotidyltransferase dUTP Nick End Labeling (TUNEL, Promega) para detección de Apoptosis.

a) Inmuno - localización de hemocitos grandes hialinos y semi granulosos mediante Inmuno histoquímica

Esta técnica se basa en el reconocimiento de los hemocitos presentes en el tejido a través de anticuerpos específicos La búsqueda se focalizó en los hemocitos grandes hialinos mediante el anticuerpo 41B12. El protocolo aplicado fue el descrito por Destoumieux et al., (15). Los semi-granulosos fueron inmuno localizados con el anticuerpo 40E10 (30).

b) Localización de WSSV mediante Hibridación *In situ* e histoquímica.

Para la Hibridación *In situ* se utilizó el protocolo descrito por Valladares,(59). Para histoquímica se utilizó el protocolo de Destonomieux, et al., (15), el anticuerpo específico, antiVP28 de WSSV, fue donado por el Centro de Biomedicina Marina y Ciencias Ambientales de la Universidad de Carolina del Sur, EEUU.

c) Detección de apoptosis - mediante TUNEL

Esta técnica es usada para detectar la presencia de material genético fragmentado en tejidos histológicos, y permite determinar la ubicación de las células que se encuentran en muerte celular programada.

Procedimiento (Anexos 1).

Tabla # 3. Distribución de cortes histológicos

Muestras	histología	Hibridación-InSitu	Inmunohistoquimica	Apoptosis
T= O	*	*	*	*
Pre-Sobreviv ientes	*	*	*	*
Sobrevivientes	*	*	*	*
Moribundos	*			*
TIPO DE PLACA	normal	cargada	cargada	cargada

Fuente: elaborado por Daniel Pedrazzoli

2.4.6. Tinción DAPI - 4',6-Diamidino-2-fenilindol dicorhidrato para detección de Apoptosis.

Técnica de tinción basada en la coloración de ADN a partir del colorante fluorescente DAPI que permite la tinción de material genético condensado, núcleos celulares como también de células vivas

La técnica que aplicada a los hemocitos de animales moribundos para determinar si estos se encontraban en Apoptosis, haciendo el uso de microscopio de Epi-fluorescencia. Se consideró que la célula esta en apoptosis si el núcleo se encontró condensado o fragmentado. El procedimiento se describe en los Anexos.

2.4.7 Análisis estadístico.

Los valores de NTH, O-2, actividad PO y ELISA fueron analizadas a través de un análisis de varianza (ANOVA) de una vía (Animales susceptibles del T=O y sobrevivientes (T=150h.) con 30 replicas cada uno). La normalidad fue calculada utilizando la prueba de Kolmogorov - Smirnov además del histograma de normalidad (normal probability plot). Se determinó la homogeneidad de varianza, mediante la prueba de Levene usando el programa Statistical Package for the Social Sciences (SPSS 14.0). Los datos de ELISA y actividad PO fueron transformados para obtener homogeneidad en varianzas, usando Log(x+1) (60).

Los datos son expresados como media □ desviación estándar (Anexos 3).

Las diferencias en la fórmula hemocitaria (%) entre animales susceptibles del T=O y los sobrevivientes SPV (T=150h) fueron analizados con el estadístico de Chi-cuadrado y la prueba exacta de Fisher.

En la siguiente tabla se clasificó en categorías a los niveles de poblaciones hemocitarias (alta y baja) de acuerdo a datos históricos. Fue usada la clasificación de (6) y modificada en esta Tesis.

Tabla # 4. Categorización de sub-poblaciones hemocitarias

Niveles de Hemocitos	**Semigranulosos %**	**Granulosos %**	**Hialinos %**	**Atípicos %**
medio	< 34 - 55	< 14 - 25	< 14 – 30	<14 - 25
alto	55 - ≥ 75	25 - ≥ 41	30 -≥ 46	25 - ≥ 36

Elaborado por Daniel Pedrazzoli.(Adaptación del cuadro de categorización de rangos de frecuencias hemocitarias de (6)).

CAPITULO III. ANÁLISIS DE SITUACIÓN ACTUAL

3.1. Ensayo de virulencia del material infeccioso.

Este ensayo se realizó con el objetivo de verificar la virulencia del inóculo de WSSV. Se realizaron cuatro tipo de infecciones, 2 en acuario y 2 en carameleras. La temperatura se mantuvo alrededor de los 24 – 26□C. Esta temperatura brindó las condiciones óptimas para que el virus pueda infectar de forma eficiente a los animales.

La mortalidad se presentó a los dos días de post infección. Una vez pasado el tiempo de mortalidad, dos días desde la última muerte, se detuvo el ensayo obteniendo un 40% de mortalidad en acuario infectado con inóculo diluido 1/10. Mientras que en el acuario donde se colocó inóculo concentrado la mortalidad fue del 60 %. En las carameleras donde se utilizó el inóculo diluido, se obtuvo una mortalidad del 40 % mientras que las carameleras que fueron infectadas con inóculo concentrado la mortalidad fue del 80 %.

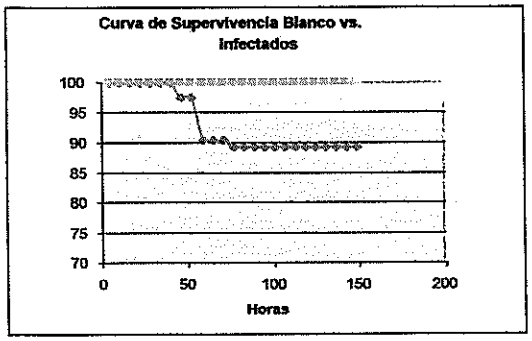
3.2.Ensayo de infección con WSSV

El ensayo se realizó de manera individual a fin de evitar la re-infección, la temperatura fue regulada a 31□ C. De esta forma se aseguró buenas condiciones para los camarones, durante el proceso infeccioso viral con WSSV.

3.2.1 Eficacia de la infección

La mortalidad se presentó alrededor de las 43 horas hasta las 72 horas después de la infección. Se obtuvo un 11 % de mortalidad, 9 animales en total.(Gráfico 1).

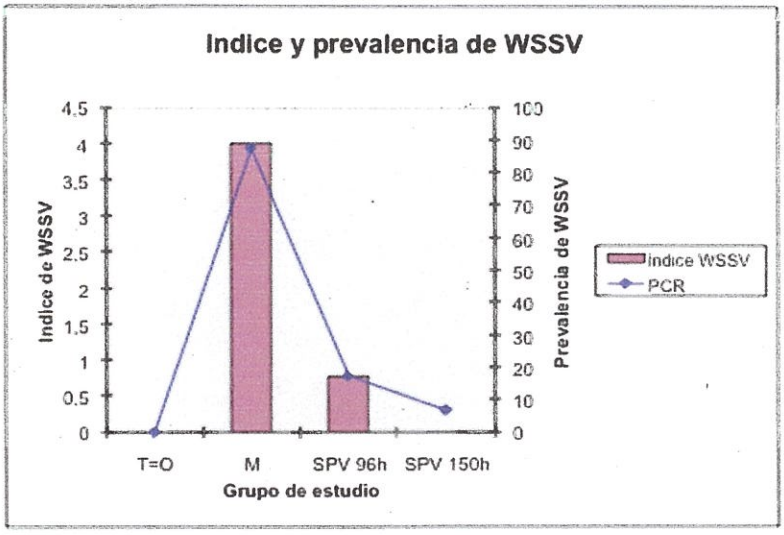
Gráfico # 1. Curva de Supervivencia de los animales del blanco vs. Los animales infectados



Fuente: Elaborado por Daniel Pedrazzoli.

La eficiencia de la infección se determinó mediante PCR para WSSV e histología. Se realizó PCR a todas las muestras de los diferentes grupos de estudio T=O, moribundos, SPV 96h y SPV 150h. En el gráfico 2 se detallan las prevalencias para WSSV de cada grupo. Antes de la infección no se detectaron animales con WSSV mientras que los moribundos presentaron una prevalencia muy alta (88%). La prevalencia para los sobrevivientes fue baja (7%) .

Gráfico # 2. Indice y Prevalencia para WSSV (PCR) en los grupos de estudio, T=O susceptibles muestreados en tiempo cero, M Moribundo, SPV t=150h, SPV t= 96h. (Las barras representan el índice de WSSV y la línea , el porcentaje de prevalencia)



Fuente: Elaborado por Daniel Pedrazzoli

Los resultados de histopatología confirmaron que la mortalidad fue causada por WSD. La gráfica 2 contiene los índices de lesiones atribuidas a la Mancha Blanca. Antes de infectar a los animales no se presentaron lesiones. Como se puede observar el índice mas alto corresponde a los animales moribundos (87.5%). En tanto los sobrevivientes (7%) posee un índice mas bajo que los pre sobrevivientes (17%)

3.2.2 Animales Moribundos – (M)

En la tabla 5 se presentan los datos hematológicos de los animales moribundos. Se aprecia una caída de la concentración de NTH además de un alto porcentaje de hemocitos atípicos (superior al 20%). El índice de infiltración de hemocitos fue así mismo el más bajo de todos los grupos de animales del estudio.

Tabla # 5. Datos hematológicos correspondientes a los animales moribundos

NTH	% G	% SG	% H	% A	I. Infiltracion
1.5E+06 ± 1.12E+06	10.3 ± 24.9	53.0 ± 29.7	12.57± 19.2	24.0 ± 23.1	0.01 ± 0.04

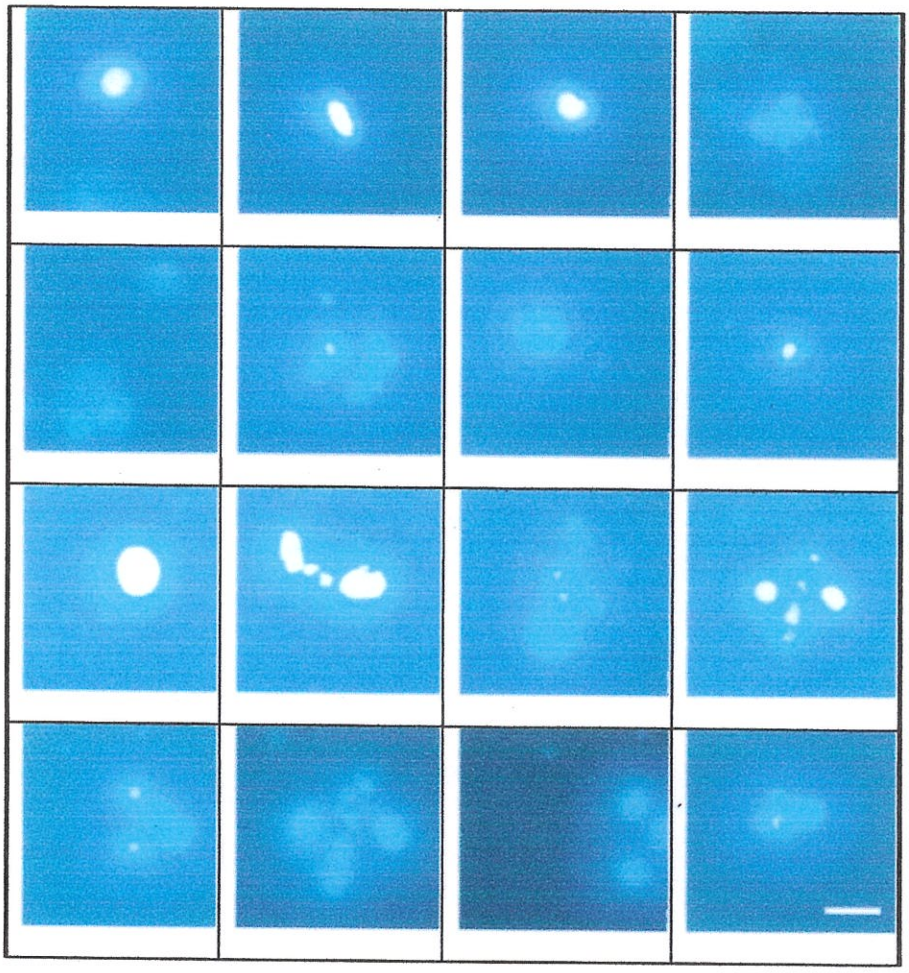
NTH número total de hemocitos, G granulosos, SG semi-granulosos, H hialinos, A atípicos, I índice de infiltración.

Fuente: Elaborado por Daniel Pedrazzoli

a) Detección de Apoptosis en hemocitos atípicos

Para detectar apoptosis en los hemocitos de animales moribundos, se recurrió a 2 técnicas, detección del estado del ADN mediante electroforesis y tinción DAPI. La electroforesis del ADN hemocitario mostró altos niveles de degradación de material genético (datos no mostrados). La tinción DAPI marcó señal positiva en todos las muestras de hemocitos pertenecientes al grupo de moribundos. La figura 1 muestra los hemocitos con fuerte efecto fluorescente producido por la condensación de ADN así como también la fragmentación del material nuclear.

Figura 1 .- Tinción DAPI: Marcado de Hemocitos Atípicos en Proceso de Apoptósis, las áreas más brillantes corresponden a material genético condensado. (Barra: 10 µm) – Anexos 3



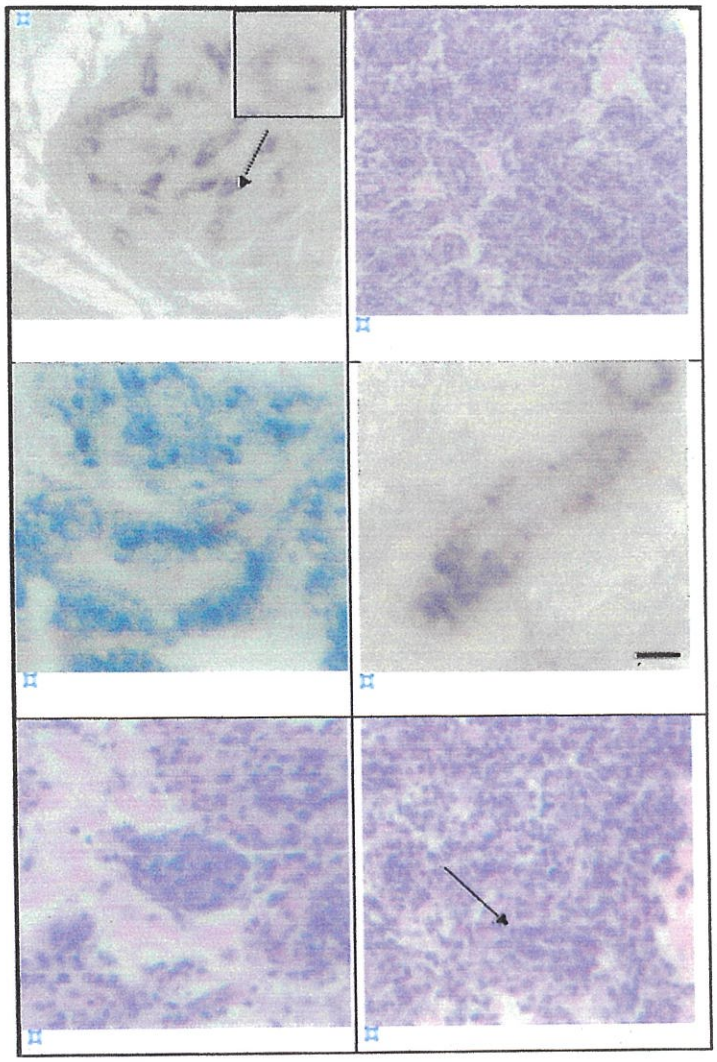
Fuente: realizado por Daniel Pedrazzoli

b) Histopatología

La histopatología realizada en este grupo de animales, además de altos niveles de infección (Gráfico. 2), mostró severa desorganización del Ol. En la matriz estromal se

observaron núcleos hipertrofiados con inclusiones virales así como piknosis y careorexis.

Figura 2.- Histología e Inmunohistoquímica para WSSV. Lesiones y presencia de células infectadas en los camarones moribundos, tejido analizado OL (Barra 10 um) – Anexos 3



Fuente : elaborado por Daniel Pedrazzoli

La Hibridación *In situ* y la Inmuno-histoquímica para detección de WSSV mostraron una señal muy fuerte en tejidos. En el Ol la infección se presentó en la matriz estromal de los túbulos que participaron en el proceso de filtración los cuales se encuentran localizados en la zona central del Ol (Fig 2).

Los pocos esferoides observados no presentaron signos de WSSV (ausencia de los núcleos hipertrofiados).

3.2.3 Animales que sobrevivieron a la exposición a WSSV (SPV)

Los análisis realizados en estos animales fueron contrastados con los susceptibles muestreados en el Tiempo Cero (T=O).

a) Hemograma

EL número total de hemocitos en los sobrevivientes fue significativamente superior (p=0.00) comparado con los animales susceptibles (Tabla 6).

Tabla # 6. Distribución porcentual de las sub.-poblaciones hemocitarias (granulosos, semi-granulosos, hialinos y atípicos) Datos son expresados como media □ desviación estándar, NTH (cel x7/ml)

	% de G	% de S.G.	% de H.	% de A.	NTH
T=O	9.1± 10.0	48.3 ± 12.1	39.4 ± 15.6	3.2 ± 2.8	1.44 ± 0.741
SPV	8.74 ± 4.03	52.71 ± 15.29	33.75 ± 17.19	4.80 ± 4.14	2.4 ± 1.3

T=O = Tiempo cero,, SPV 150h = superviviente, G granuloso, S.G. semi-granuloso, H hialinos, A atípico, NTH = número total de hemocitos

Fuente: Elaborado por Daniel Pedrazzoli

En los dos grupos, el porcentaje de hemocitos atípicos fue inferior al 20 %. Los porcentajes de hemocitos granulosos también se mantuvieron bajos. Las principales sub-poblaciones constituyeron los hemocitos hialinos y los semi-granulosos.

En los muestreos de campo se observó modificaciones en las frecuencias de los rangos de las sub poblacionales de hemocitos hialinos y semi-granulosos (6). Para verificar esto se analizaron las frecuencias de rangos mediante □2 y prueba de Fisher aplicados a tablas de contingencia

Tabla # 7. Tabla de Contingencia mostrando la redistribución en frecuencias de los rangos de los hemocitos hialinos en los SPV (□2 = 12.48; grados de libertad = 1, Fisher test □ 0.01), al 95 % de confianza

Niveles de Hemocitos	T=O	SPV
Medio	3	16
Alto	26	14

T=O animales susceptibles en el tiempo cero, SPV supervivientes (T= 150h)

Fuente: Elaborado por Daniel Pedrazzoli

Como se puede observar existió redistribución en la sub poblaciones de hemocitos hialinos. Los animales susceptibles del T=O tuvieron rangos altos, luego de la infección, se incrementó el número de individuos con rangos medios.

Tabla # 8. Tabla de Contingencia Hemocitos de Semi-Granulosos entre individuos susceptibles del TO=0 vs. Individuos sobrevivientes SPV (x2 = 5.28; gl 1 p = 0.0215 al 95 %).

Niveles de Hemocitos	T=O	SPV
Medio	22	14
Alto	7	16

T=O Animales susceptibles en el tiempo cero, SPV sobrevivientes (T=150h)

Fuente: Elaborado por Daniel Pedrazzoli

De igual manera que los hemocitos hialinos, los semi-granulosos sufrieron de una re-distribución. Luego del evento viral las poblaciones de individuos con hemocitos altos y medios se equilibraron.

b) **Indicadores de Hemocitos Hialinos (Producción de Súper Oxido y □2 MG.) y de Hemocitos Granulosos y Semi-granulosos (Actividad PO).**

El análisis realizado para cuantificar la liberación del radical oxígeno generado durante el proceso de fagocitosis no presentó diferencias significativas entre el tiempo cero y los supervivientes.

Como un indicador adicional de los hemocitos hialinos, se utilizó la concentración del antígeno □2 MG mediante ELISA indirecto. La concentración del antígeno fue mayor en el grupo de los supervivientes (p = 0.00).

En cuanto al indicador de células granulosas y semi-granulosas (Actividad PO Total) los resultados indicaron mayor (p = 0.011) actividad PO total en los SPV, en tanto no

se observaron diferencias significativas en actividad PO estimulable. Los datos numéricos de los análisis se sumarizan en la tabla 9.

Tabla # 9. Indicadores de hemocitos hialinos y semi-granulosos - SPV vs. TO

	Super Oxido (tasa)	α_2MG (mDO)	PO total (mDO)	PO estimulado (mDO)
T=O	1.040± 0.127	274± 9.3	181± 96.52	114 ± 48
SPV	1.051± 0.197	284 ± 7	280 ± 173.4	109 ± 69

T=O animales susceptibles del tiempo cero, SPV sobrevivientes (T=150h), □2 MG, alfa –dos macro globulina, PO fenoloxidasa,

Fuente: Elaborado por Daniel Pedrazzoli

c) Estudio histopatológico

Infiltración de hemocitos en los tejidos

En el estudio histopatológico se incluyó entre los sobrevivientes a los animales denominados pre sobrevivientes de 96 horas. Como se observa en la tabla 4, luego de la exposición al virus la infiltración de hemocitos se incrementa. El grupo que presentó un mayor grado de infiltración fueron son los Supervivientes muestreados a los 150 horas seguidos de los sobrevivientes muestreados a las 96 horas (SPV 96h.). Los hemocitos infiltrados fueron observados en branquias, tejido conectivo, Órgano Linfoide, músculo, apéndices, glándula antenal y hepatopáncreas.

Tabla # 10. Infiltración de hemocitos en los tejidos

Grupo	Indice de infiltracion
T=0	0.04 ± 0.08
SPV 96h	0.10 ± 0.19
SPV 150h	0.14 ± 0.10

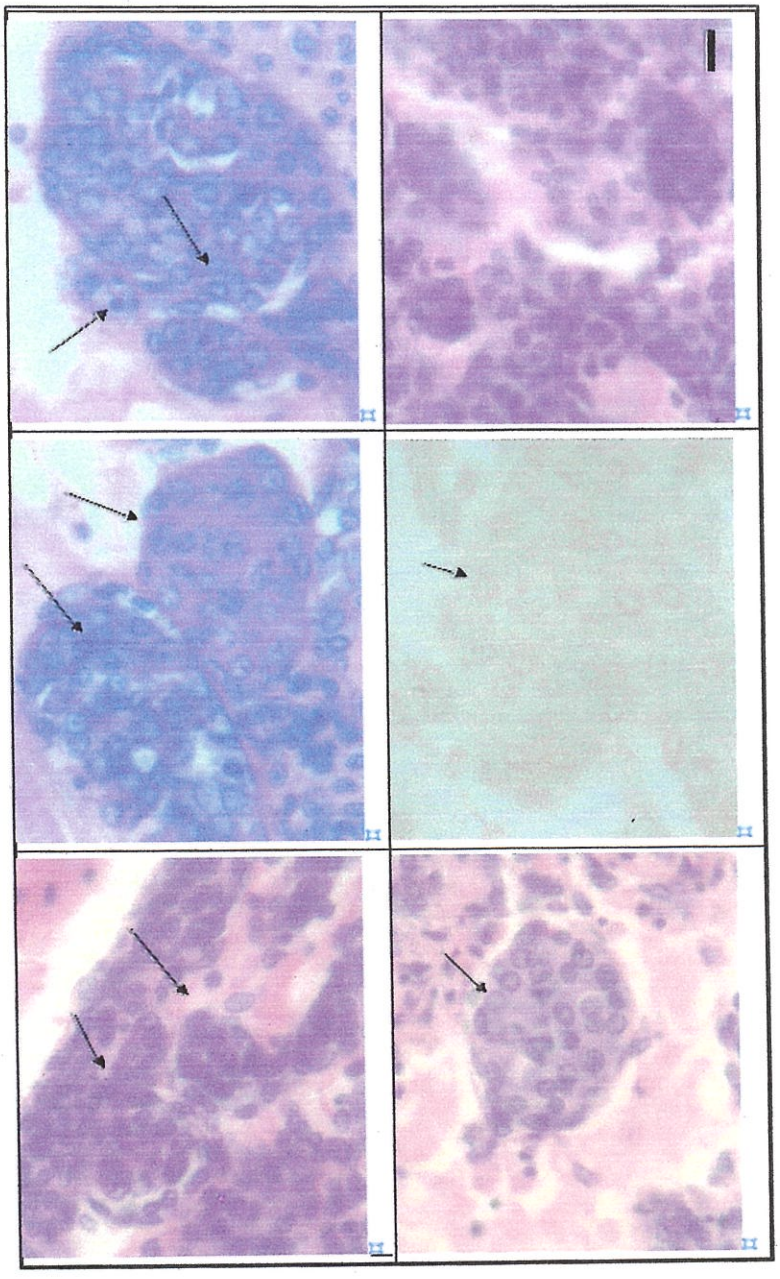
T=O, tiempo cero, SPV sobrevivientes (T=150h), SPV sobrevivientes (T=96h)

Fuente: Elaborado por Daniel Pedrazzoli

Estudio histopatológico del OL y esferoides

Como se observa en la Fig. 2, el nivel de lesiones en los SPV 96h fue bajo y casi inexistente en los SPV 150h. Considerando al Ol como principal tejido de limpieza de la hemolinfa, se prestó mucha atención a las modificaciones en este tejido. Los animales susceptibles del tiempo cero presentaron los túbulos del Ol muy saludables, con gran número de células en la matriz estromal y muchos hemocitos en el lumen y en los sinus hemales entre los túmulos. De 7 muestras que presentaron Ol en los cortes, 6 mostraron esferoides, en su mayoría de tipo A (ausencia de vacuolas y núcleos picnóticos), localizados preferencialmente en la periferia del tejido (Fig 3).

Figura 3 .- Histología: Presencia de Esferoides en el OL de los Grupos T=0, M, SPV 96h, SPV 150h. Marcado TUNEL para Apoptósis en los Esferoides presentes en el OL de los sobrevivientes (Recuadro inferior central) (Barra=10µm)- Anexos 3



Fuente: Elaborado por Daniel Pedrazzoli

(tabla 10), Los esferoides correspondieron en su mayoría a los de tipo B temprano y tardío (núcleos agrandados, picnosis y vacuolas, C (fuertemente basófilos, muy vacuolizados y en aparente proceso de reabsorción. (Fig 3) y también de tipo A. El Ol de estos animales se encontró en buen estado, presentando un nivel alto de infiltración de hemocitos. Los esferoides ectópicos morfológicamente se categorizaron como de tipo B.

La tabla 11 detalla el número de animales en órgano linfoide como también el tipo de esferoides encontrados en cada grupo de estudio, además de la presencia de esferoides ectópicos.

Tabla # 11. Distribución de los esferoides

Grupo	Muestras con OL	Esferoides de tipo A	Esferoides de tipo B	Esferoides de tipo C	Esferoides Ectópicos	Animales con esferoides
T=0	7	5	1	1	0	6
SPV 96h	4	1	1	2	1	4
SPV 150h	3	1	1	1	1	4

T=0: Animales susceptibles muestreados antes del desafío, tiempo 0. SPV 96h: sobrevivientes muestreados 96 horas de post infección. SPV 150h: Animales sobrevivientes muestreados 150 horas de post infección.

Fuente: Elaborado por Daniel Pedrazzoli

Detección de WSSV.

Se recurrió a hibridación *in situ* y a inmunohistoquímica para localizar al virus asociado o no a lesiones en los tejidos. Entre los 9 animales del tiempo cero, 4

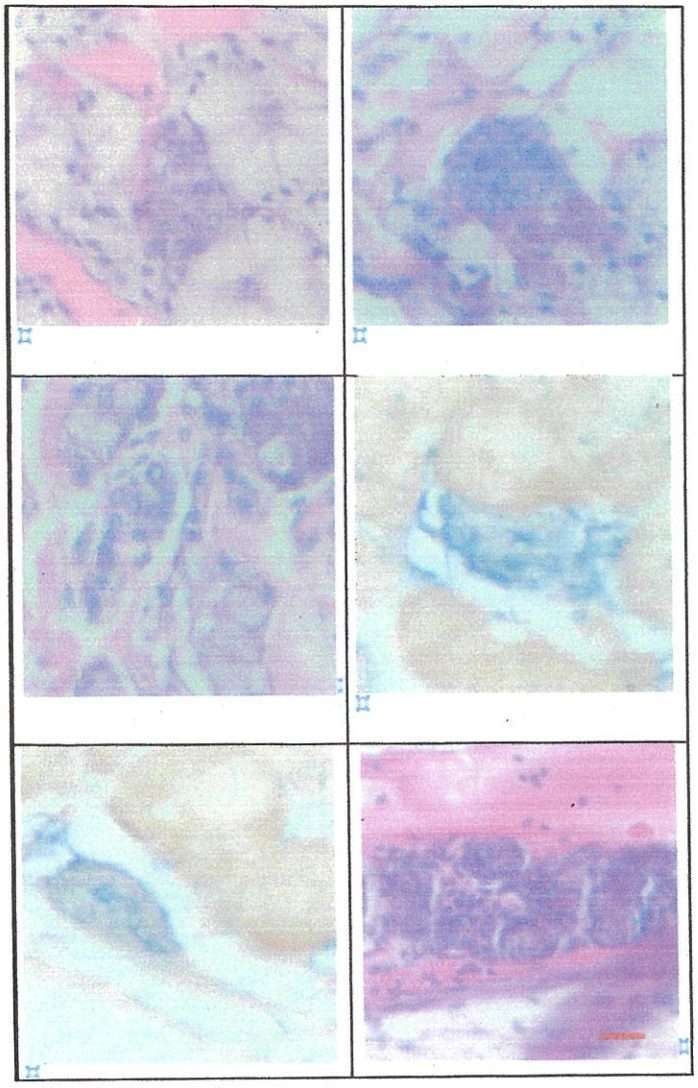
mostraron señal positiva para WSSV. El marcado fue muy ligero y difuso. Este marcado se presentó en el área de la matriz estromal de los túbulos del OI, también se detectó una señal muy débil en la glándulas tegumentales. Al menos un animal presentó un ligero marcado en los esferoides de tipo A.

En el grupo total de los sobrevivientes, de las 17 muestras analizadas, 7 fueron positivos a WSSV, tanto en el OI como también en las glándulas tegumentales y algunos en el estómago. La señal fue muy débil en pocos esferoides del OI, en tanto que los esferoides ectópicos dieron una clara señal positiva para WSSV.

Detección de Hemocitos Hialinos y Semi-granulosos a través de Histoquímica con anticuerpo anti □2-MG(41B12) y MAB(40E10)-

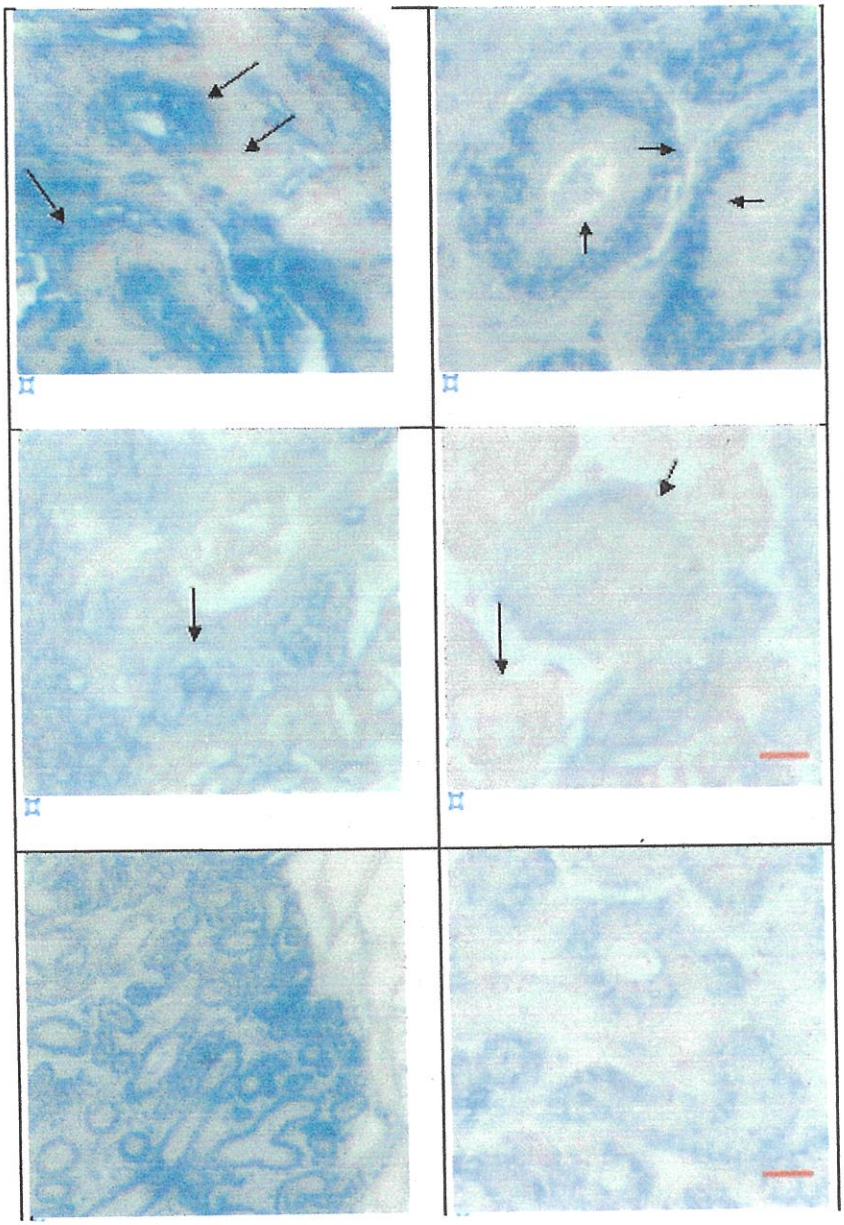
Los tres grupos de animales entraron en este análisis. El anticuerpo 41B12 reconoció a los hemocitos hialinos en tejido conectivo, estómago y apéndices bucales, también marcó branquias y tejido hematopoyético y ocasionalmente el corazón. Se observó una señal muy fuerte para toda la zona del esófago y estómago, prolongándose hacia el OI (Fig.5) En cuanto a este último tejido fueron reconocidos hemocitos en el lumen y en los sinus hemales y un marcado muy leve en la matriz estromal. Muchos animales, en particular los susceptibles del tiempo cero, presentaron señal positiva en el borde externo de los túbulos del OI. En cuanto a los esferoides, algunos mostraron señal positiva con este anticuerpo, pero muchos fueron negativos indistintamente del tipo del esferoide. Los esferoides ectópicos presentaron señal positiva para este anticuerpo (Fig 4).

Figura 4.- Histología: Esferoides Ectópicos ubicados en las Glándulas Tegumentales y TejidoConectivo. Inmunohistoquímica para Hemocitos Hialinos con Marcado Positivo (Color azul) (Barra= 10µm)



Fuente: Elaborado por Daniel Pedrazzoli

Figura 5.- Inmunohistoquímica Positiva para Hemocitos Hialinos. Tejidos Analizados sobrevivientes y tiempo cero. (Barra = 10 µm)



Fuente: Elaborado por Daniel Pedrazzoli

El anticuerpo que reconoce a los hemocitos semi-granulosos proporcionó una señal positiva en las capas internas de la matriz estromal de los túbulos del Ol y pudo reconocer esferoides de tipo A. Otros tejidos marcados fueron positivos: Hematopoyético, podocitos de la glándula antenal y eventualmente el corazón.

Detección de Apoptosis a través de TUNEL – método Colorimétrico

Los tejidos analizados correspondieron a organismos sobrevivientes, el mayor número de esferoides que dio señal positiva para TUNEL (Fig.3), en particular los que se encuentran ubicados en la periferia del Ol sin embargo algunos fueron negativos, en especial los que se encontraban en el área central del mismo. Los esferoides ectópicos fueron positivos para TUNEL.

CAPITULO IV. DISCUSIÓN

Estrategia de Estudio

El objetivo de este estudio fue evaluar la respuesta inmune celular de los animales sobrevivientes a la exposición del patógeno WSSV. En ese sentido el primer experimento se realizó para determinar la infecciosidad del inóculo de WSSV; no se reguló la T°C a fin de favorecer la virulencia, la máxima temperatura registrada fue de 26 □C. De acuerdo a lo esperado el desafió produjo una mortalidad muy alta .

En el segundo experimento, solo se obtuvo un 11 % de mortalidad usando el mismo inóculo. Antes del bio-ensayo los animales fueron mantenidos en tanques con sistema "air lift " de aireación a fin de evitar recambios de agua y la temperatura se mantuvo estable de 30 □C. Durante el desafío se llevó un control estricto de la temperatura, la media obtenida fue de 31°C. A esta temperatura se espera menor estrés y baja

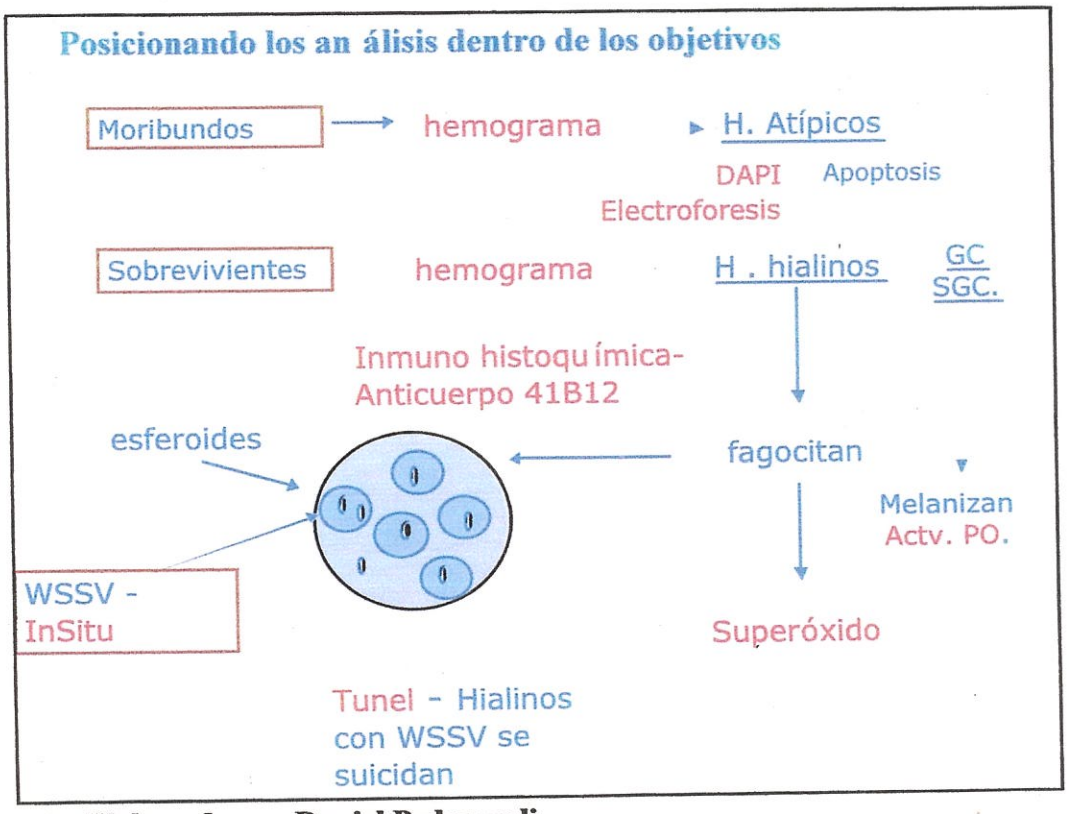
prevalencia (61, 62). A fin de evitar la re-infección por cohabitación, los organismos se encontraban separados unos de otros. Con estas buenas condiciones se esperó favorecer la respuesta inmune de los animales expuestos al patógeno.

La comparación entre los camarones SPV 150h y los susceptibles muestreados al tiempo cero antes de la infección, sirvió para establecer los cambios que sufre el animal luego de ser expuesto a un evento infeccioso con WSS en las mejores condiciones posibles de manejo. Nuestro estudio se centró en los hemocitos, principales efectores de la respuesta inmune. Se evaluó el número total de hemocitos circulantes así como adicionalmente con las muestras de hemolinfa se analizó generación O_2^-, antígeno α_2 MG (41B12) mediante ELISA y actividad PO.

Siendo el OI el principal tejido de limpieza de la hemolinfa, se dedicó mucho interés a las modificaciones sufridas por este órgano, estado de los túbulos, infiltración de hemocitos y formación de esferoides. Se recurrió a técnicas como la histoquímica y la hibridación *In situ* para inmuno localizar al WSSV y a los hemocitos hialinos, siguiendo la hipótesis de que siendo los hemocitos hialinos las células fagocitadoras (14), infiltran y atrapan al virus en el OI. Finalmente se consideró que el destino final de las partículas virales es su eliminación a través de la apoptosis en los esferoides. Por lo tanto se empleó la técnica TUNEL a fin de detectar este proceso en los esferoides.

El gráfico 3 relaciona los análisis realizados con los objetivos de estudio, así como la importancia de cada técnica para llegar al resultado buscado; los que permitieron aceptar, negar o modificar la hipótesis planteada.

Gráfico # 3. Estrategia empleada de estudio seguido en este trabajo, Hemocitos hialinos, semi-granulosos, granulosos, PO reacción Fenoloxidasa.



Fuente: Elaborado por Daniel Pedrazzoli

Resultados obtenidos en los animales que no sobrevivieron a la exposición al WSSV.

Los camarones moribundos fueron analizados como un grupo separado, esta población de animales presentó serias lesiones de mancha blanca, com era de esperar el NTH fue bajo, además se observó un incremento sustancial en el porcentaje de

hemocitos atípicos por encima del 20% rango establecido como crítico por Montesdeoca(6). Las imágenes obtenidas con tinción DAPI sugieren que estos hemocitos estaban en proceso de muerte celular considerando, la condensación y la fragmentación nuclear como signos de apoptosis De Toro,(42) Wongpraser et al.(63), realizaron observaciones similares en hemocitos de camarón *P monodon* infectado con virus de mancha blanca. La incapacidad del tejido hematopoyético infectado de producir más hemocitos se reflejó también en la baja tasa de infiltración.

El Ol marcado con el anticuerpo específico para WSSV, mostró túbulos filtrando virus, pero al parecer el proceso colapsó y en vez de dar paso a la destrucción del material viral en los esferoides, las células de la matriz estromal se infectaron, convirtiendo al Ol en un sitio de replicación viral. La destrucción de hemocitos agrava el fracaso del Ol como tejido de tamizaje. Shao et al,(64) y Anggraemi, Owens, (65) indican el origen hemocitario tanto de las células de la matriz estromal como de los esferoides del Ol. De hecho en la matriz estromal de los moribundos se observó la masiva acumulación de núcleos picnóticos muy similares a los observados en circulación (hemocitos atípicos).

La desorganización completa del tejido podría ser la causa y consecuencia de la fuerte carga viral en los animales moribundos. Cápsulas y nódulos alrededor de núcleos piknóticos fueron observados en el Ol de estos animales, indicando que estos restos celulares (posiblemente hemocitos atípicos apoptóticos) son capaces de desencadenar esta respuesta de eliminación celular.

Respuesta celular de los animales sobrevivientes a la exposición con WSSV.

Como se mencionó previamente, las condiciones que se brindaron a los animales fueron favorables para una buena respuesta del sistema inmune. En su conjunto los resultados histopatológicos de sobrevivientes T=96h y sobrevivientes T=150h, índice de mancha blanca e inmuno marcado indican una exposición exitosa al virus (los animales dieron señal positiva para WSSV por hibridación *In situ* e inmunohistoquímica) así como remisión de la enfermedad. Los sobrevivientes de 150h estuvieron menos afectados que los llamados sobrevivientes de 96h. Tanto en índice histológico de WSD y en prevalencia para WSSV.

Los sobrevivientes incrementaron tanto el número de hemocitos circulantes como infiltrantes, los datos de hemograma sugieren que los animales optaron por mantener poblaciones medianas a altas de hemocitos hialinos como semi-granulosos. Los altos niveles de hialinos antes del proceso viral podrían sugerir que las frecuencias de rangos hemocitarios de este evento experimental en particualar han sufrido modificaciones comparadas con los datos de la época previa a la mancha blanca en Ecuador, cuando la media de hemocitos hialinos era alrededor del 15 a 20 % (66).

Las tablas de contingencia mostraron que antes del desafío los rangos de hemocitos hialinos altos fueron más comunes y pocos individuos presentaron poblaciones

medianas. Sin embargo, luego del evento, ocurre una re-distribución de estas poblaciones. La cantidad de camarones que poseen poblaciones altas de hialinos como medianas fueron casi iguales. Con los semi-granulosos ocurrió a la inversa incrementándose el número de animales con rangos altos, de igual manera esta sub-población llegó a un punto de equilibrio entre las poblaciones medianas y altas.

Las observaciones de hemocitos a través del microscopio de contrastes de fases, puede prestarse a errores de identificación entre los hemocitos inmaduros y los verdaderos hialinos. Rodríguez (30) encontró que muchos hemocitos hialinos eran realmente semi-granulosos inmaduros mediante inmuno-fluorescencia. Esto sugiere que tal vez en los sobrevivientes se observó una rápida diferenciación de hemocitos semi-granulosos.

Los porcentajes de hemocitos granulosos no presentaron grandes modificaciones, en tanto el porcentaje de los hemocitos atípicos (no viables) se mantuvo bajo en los SPV.

Las modificaciones en las sub-poblaciones de hemocitos deberían reflejarse en los procesos realizados por estos. Los resultados de ELISA mostraron un incremento significativo del antígeno de los hemocitos hialinos. Sin embargo el porcentaje de hemocitos hialinos no se incrementó, no se puede descartar una posible confusión entre hemocitos hialinos grandes y semi-granulosos en el hemograma. Tampoco se observó un incremento significativo en la generación de O_2^-. Esto podría explicarse con la alta tasa de infiltración presente en los tejidos.

Posiblemente los hemocitos más activos infiltran y los que se mantienen en circulación en su mayoría corresponderían a hemocitos "perezosos" o inmaduros. Los resultados de la actividad PO parecen corroborar lo segundo. En los sobrevivientes se observó un incremento significativo en la actividad PO total, pero no de actividad PO estimulada. Ante un fuerte desafió microbiano la actividad proliferadora del tejido hemapotoyético mantendría en circulación una alta concentración de hemocitos inmaduros como ya fue observado por Muñoz et al.,(67).

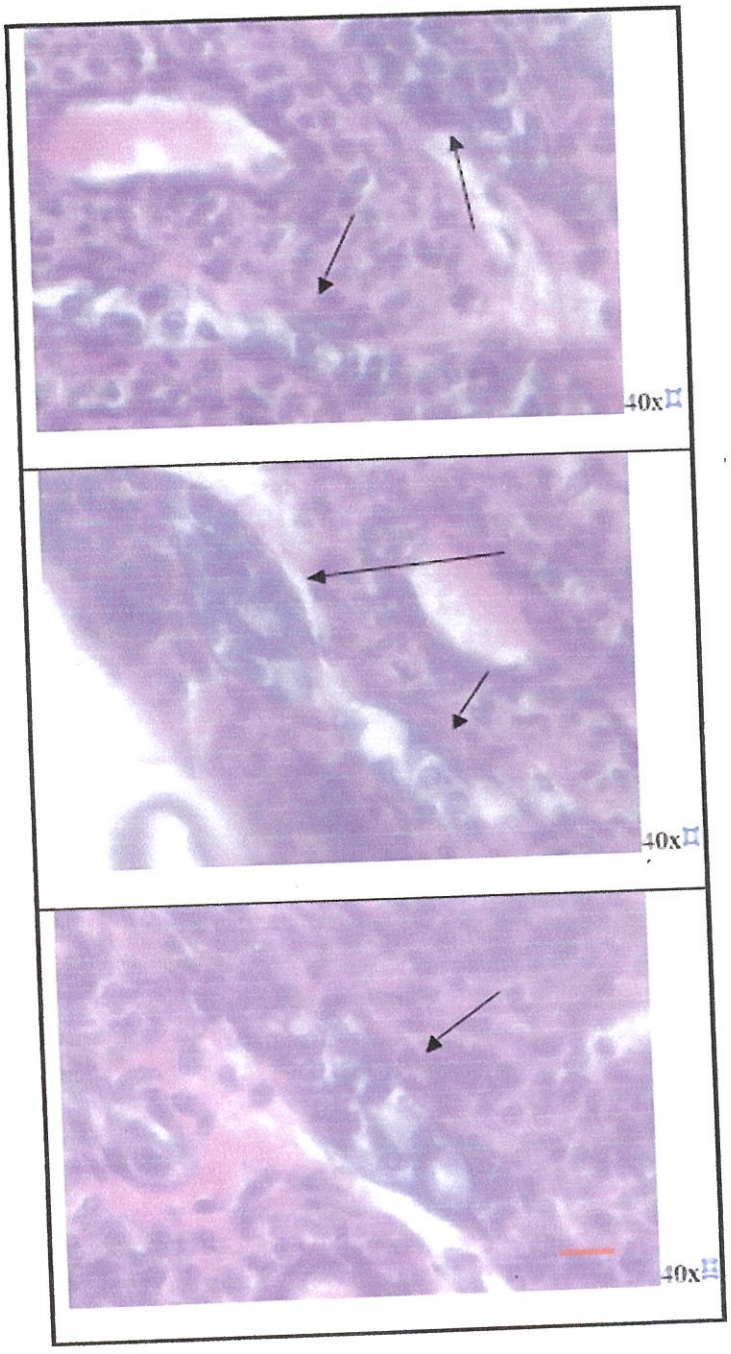
La literatura sugiere que durante el proceso de infección con WSSV los hemocitos semi-granulosos y granulosos son más susceptibles a ser infectados (68). Los camarones sobrevivientes a la exposición al WSSV mantienen el porcentaje de hemocitos granulosos pero el número total se incrementa, y la cantidad de enzima proPO también. Los hemocitos semi-granulosos son importantes depósitos de sistema proPO y factores microbicidas como las peneidinas (67). Los cuales son importantes para combatir infecciones micóticas y bacterianas. Estos resultados indican que las defensas contra otros agentes infecciosos durante eventos virales no solo se mantienen si no que incluso se incrementan.

Los resultados de TUNEL mostraron que numerosas células de los esferoides se encontraban en apoptosis. Pero otras características de apoptosis no fueron observadas, material nuclear condensado "blebbing" y la presencia de otras células fagocitando los restos celulares (69, 70). Los esferoides de tipo B mostraron núcleos

agrandados con la cromatina marginada hacia la membrana nuclear, esta no se encontraba condensada. Muchas estructuras celulares que en Hematoxilina y Eosina (H y E) aparentaron ser núcleos picnóticos, no se tiñeron con TUNEL, sugiriendo que posiblemente no constituyen material nuclear fragmentado. Además en los esferoides tipo C se observó grandes áreas vacuolizadas en proceso de reabsorción (Fig. 6). Esto podría sugerir que tal vez en el camarón no solo ocurre la apoptosis si no tambien otro tipo de muerte celular programada, ya sea autofagía o Paraptosis (71), tipo de muerte celular programada (posiblemente más antigua que la apoptosis). Según Wang, et al (72), esta se caracteriza por vacuolización excesiva y ausencia de piknosis. Esta hipótesis debe ser estudiada con mucho más detalle, ya que implicaría que en el camarón existen otros tipos de muerte celular diferentes a la apoptosis.

Las células de los núcleos hipertrofiados de los esferoides no presentaron signos de estar infectadas con WSSV, ni en H y E, ni presentaron cuerpos de inclusión con señal positiva, cuando hubo señal esta se limitó al citoplasma. Esto se observó incluso en los pocos esferoides presentes en los moribundos.

Figura 6 .- Histología: Presencia de grandes áreas vacuolizadas, posiblemente un nuevo tipo de muerte celular (Barra = 10 µm)



Fuente: Elaborado por Daniel Pedrazzoli

La presencia de esferoides de tipo A en el Ol de los camarones de T=0 implica la existencia previa de partículas extrañas. Además a través de inmuno-histoquímica, se observaron señales de WSSV en las glándulas tegumentales y la matriz estromal del Ol, nunca se observó señal positiva en los núcleos hipertrofiados. Esto indica que antes del desafió con WSSV, los animales se encontraban con infección latente y los signos sugieren un efectivo control por parte del sistema inmune de los hospederos.

Realizamos inmuno-histoquímica con anticuerpo α_2 MG y anti WSSV por dos razones, la primera establecer si los hemocitos hialinos intervenían en la formación de esferoides y la segunda determinar si estos esferoides contenían WSSV. De forma consistente la señal para a α_2 MG detectada en el Ol sugiere el importante rol de los hemocitos hialinos en el filtrado de partículas virales e indica su participación en la fagocitosis y formación de esferoides. Se detectó señal en el lumen, borde externo de los túbulos (como células marcadas o material finamente granular) y células presentes en los sinus hemales. Como ha sido descrito en *P. monodon* (33) y (63) para *Penaeus chinensis.* Además de una señal muy leve y difusa presente en la matriz estromal.

Los hemocitos migrarían desde el lumen hacia los sinus hemales. Se establecen en los bordes externos no sin antes degranular en la zona de material fibroso o matriz estromal, que rodea los túbulos y que retiene material viral durante la filtración. Es muy posible que entre las moléculas liberadas se encuentren factores que facilitan la retención y aglutinación de cualquier tipo de material extraño y la posterior ingestión

por parte de fagocitos ubicados en los sinus hemales, los cuales darían origen a los esferoides. Algunos esferoides presentes en el Ol, fueron positivos para el anticuerpo específico de células hialinas, pero la mayoría de los esferoides centrales del Ol no lo fueron, indicando que no todos los esferoides son producidos por hemocitos hialinos y que también intervienen otros hemocitos. El marcado con el anticuerpo 40E10 de los esferoides de tipo A de los susceptibles del tiempo cero, indica que los hemocitos semi-granulosos también intervienen en la formación de esferoides. Tampoco puede descartarse que algunos esferoides dejan de ser reconocidos por los anticuerpos debido a degranulación de los hemocitos.

En cuanto a la dinámica del funcionamiento del Ol, los animales sobrevivientes, la fuerte actividad proliferadora del tejido hematopoyético aseguraría la regeneración de los túbulos del Ol, manteniendo esta capacidad filtradora y baja carga viral en el hemocele. La señal de WSSV indica que la filtración comenzaría en los túbulos centrales. Los esferoides de tipo B y C se concentran en los bordes del Ol, en tanto la mayor cantidad de esferoides centrales fueron de tipo A. Estas observaciones sugieren que el crecimiento de los túbulos del Ol sería del centro hacia fuera con migración de los esferoides hacia los bordes.

Las células de sostén que forman la estructura básica del Ol, células endoteliales y de la matriz estromal, son las que definen si el Ol mantiene su desempeño durante la infección. Si estas son infectadas no pueden ser reemplazadas con rapidez, o

participar en la formación de esferoides, lo que provocaría la desorganización del Ol y posteriormente la destrucción del mismo.

Los esferoides ectópicos de los apéndices estuvieron menos degenerados y siempre dieron señal positiva para WSSV, α_2 MG y TUNEL. Esto sugiere dos posibles destinos finales para los esferoides, reabsorción si se ubican en un tejido interno como el Ol o eliminación como el caso de los ectópicos durante la muda. si se ubican en apéndices, como ha sido reportado por Hose, et al, (73)

CONCLUSIONES

1. El grupo de animales susceptibles del tiempo cero, presentó un bajo nivel de infección con WSSV detectado a través de la inmunohistoquímica. Se observó altos niveles de NTH, elevados porcentajes de hemocitos hialinos y semi-granulosos, histológicamente el Ol se encontró en excelente estado y funcional, se pudo apreciar la presencia de esferoides de tipo A.

2. Los sobrevivientes mostraron elevados niveles de NTH en comparación con los del tiempo cero y los moribundos. La tasa de infiltración es muy alta mientras que en los moribundos es mas baja que en los susceptibles del tiempo cero. Su Ol se encontraba funcional, el inmuno marcado sugiere que posee un origen hemocitario conformado en su mayoría por hemocitos

hialinos y semi-granulosos, de igual manera los esferoides ectópicos. Al parecer los esferoides del OI presentaban un proceso de degeneración tan avanzado de muerte celular que el anticuerpo anti WSSV no pudo reconocerlos,

3. La formación de las células atípicas encontradas en los hemogramas de los moribundos podría estar relacionada con el colapso del sistema inmune debido a procesos degenerativos del tejido hematopoyético.

4. Los hemocitos amorfos o atípicos encontrados en los camarones moribundos se encontraban en proceso de muerte celular, además ciertos hemocitos lucían como simples pupas o capullos vacíos, su material celular se había degradado por completo dejando solo el exterior.

5. El Órgano Linfoide de algunos moribundos presenta un cuadro de desorganización total con acumulación de núcleos piknóticos.

6. Los esferoides ectópicos siempre dieron señal positiva para a α_2 MG, WSSV y Apoptosis.

RECOMENDACIONES

1. Desarrollar un estudio que permita confirmar si existen más de un tipo de muerte celular en el camarón, como podría ser la Paraptosis.

2. Establecer, a través de muestreos intensivos y análisis de datos históricos, si las poblaciones de camarones ecuatorianos presentan variaciones significativas en su NTH y la redistribución de sub-poblaciones hemocitarias luego de 10 años de presión de selección ocacionada por el virus de la Mancha Blanca.

3. Enfocar el estudio en relación entre el periodo de infección viral y la aparición de los esferoides. Esto aplicado a las etapas de evolución que presentan los esferoides encontrados en el OI.

3. Enfocar el estudio en relación entre el periodo de infección viral y la aparición de los esferoides. Esto aplicado a las etapas de evolución que presentan los esferoides encontrados en el Ol.

4. Investigar la forma de crecimiento que posee el Ol en el *P. vannamei*, y su relación con la concentración de hemocitos circulantes y los tipos hemocitarios.

ANEXOS

ANALISIS

Hemograma

1.- Se prepara Citrato de Sodio al 2 % esterilizado y se llenan inyecciones hipodérmicas con100 a 120 ul de la solución, se las mantiene en refrigeración hasta su uso.

2.- Se toma la muestra de hemolinfa de los senos hemales presentes en la cara inferior del cefalotórax del animal, con relación 1:1 de hemolinfa y solución de Citrato de Sodio.

3.- Se procede a completar con solución de Citrato de Sodio al 2 % si es que se tomo mas hemolinfa.

4.- Finalmente se adiciona 10 ul de Formol para preservar la muestra que posteriormente será analizada en el microscopio electrónico donde se hará el conteo total de hemocitos.

5.- La muestra es mezclada con ayuda de la micro pipeta para remover todos los hemocitos que se encuentren adheridos a las paredes del micro-tubo.

6.- Se toman 10 ul y son depositados en la cámara de Neubauer, se deja reposar la muestra por 2 minutos y se la lleva al microscopio

7.- Se realiza el conteo con el lente de objetivo de 20 X.

8.- Los datos obtenidos se los analizara posteriormente.

Anión Súper Oxido

1. Se toma 50 ul de muestra de hemolinfa igualada con Citrato de Sodio al 2 %.

2. Esta muestra es colocada en las Micro-placas junto con 50 ul de Hanks 3X para que los hemocitos se fijen en el fondo del pozo, después de 30 minutos se retira el sobrenadante con ayuda de una micro pipeta y se adiciona 50 ul de Hanks 2X en cada hoyo.

3. En los hoyos que son usados de Actividad Base se adiciona Hanks 3 X, mientras que en los hoyos que son de respuesta Estimulada se coloca 50 ul de PMA preparado en Hanks 3X.

4. Se adiciona en todos los pozos 50 ul de NBT y se deja reposar por 2 horas a temperatura ambiente en cámara oscura o cubierto por papel aluminio.

5. Se descarta el residuo de solución de NBT y se coloca 150 ul de alcohol al 100 % durante tres minutos. Luego se realizan dos lavados con alcohol al 70 % durante 2 minutos, se repite esta acción dos veces.

6. Al finalizar se coloca 120 ul de KOH y 140 ul de DMSO este es llevado al especto fotómetro y leído a 620 nm.

Actividad Fenol-Oxidasa

- Antes de realizar este procedimiento es indispensable determinar el numero de hemocitos presentes a través de los hemogramas.

La muestra debe ser previamente centrifugada en frió por 10 minutos a 3000 rpm, retirando el sobrenadante y adicionando solución tampón de Cacodilato de Sodio a 10 mM. Y se procede nuevamente a centrifugar en frió por 3 minutos a 12 000 rpm.

1. Se coloca en la microplaca 50 ul de muestra de hemolinfa con Cac y un duplicado ya que una muestra servirá para realizar proPO y la otra proPO total.
2. Al primer grupo se le adiciona 50 ul de solución activadora compuesta por 2 mg de laminarina, 20 ul de Ca 20 mM. Y 100 ul de Cac. Se lo incuba por 1 hora,
3. Mientras a los duplicados se le adiciona la misma solución pero en vez de Laminarina se le coloca Tripsina, esto provocara que se active toda la enzima PPA.
4. Se deja reposar las muestras en cámara oscura
5. Una vez concluido el periodo de incubación, colocamos a todas las muestras 50 ul de L-Dopa y dejamos que actue por 10 minutos, esta sustancia permite cuantificar la formación de dopa-cromo, la reacción se presenta de una coloración naranja fuerte.
6. Se lee inmediatamente en el espectro-fotómetro a una longitud de onda de 490 nm.

o nota, la reacción es continua, los colores se vuelven mas fuertes hasta llegar a negro ya que se trata de activar a toda la enzima presente.

Extracción de ADN

método C-TAB

Procedimiento

1. Homogenizar la muestra en 600 ul de CTAB Buffer
2. Incubar la muestra a 80 C por 30 minutos o 60 C por 45 minutos.
3. Enfriar la muestra a temperatura ambiente y centrifugar a 13000 g por 5 minutos y transferir el sobrenadante a un nuevo tubo de 1.5 ml
4. Adicionar 250 ul de Fenol mas 250 ul de Cloroformo y mezclar muy bien.
5. Centrifugar a 13000g por 5 minutos, recuperar el sobrenadante, importante no tocar la interfase de esta mezcla heterogénea con la punta de la micro pipeta.
6. Adicionar 500 ul de Cloroformo mezclar y centrifugar a 13000 g por 5 minutos.
7. Recuperar el sobre nadante y adicionar 400 ul de Isopropanol frio, mezclar y guardar a – 20 C por 30 minutos (en este paso se puede guardar la muestra por un día o dos).
8. Centrifugar a 13000 por 10 minutos, eliminar el sobrenadante y lavar el pellet con 400 ul de Etanol al 70 %.
9. Secar el pellet y resuspender el ADN en100 ul de agua MilliQ.

Método Isocianato de Guanidina

Procedimiento

1. Antes de realizar esta operación es necesario preparar el baño María a 60 C.
2. La muestra se lava con solución de TE 1 X.
3. Luego se procede a colocar 400 ul de Isocianato de Guanidina, la muestra reaccionara y se disolverá pero si es necesario se puede ayudar con un macerador.
4. Llevar la muestra a baño María por 30 minutos
5. Posteriormente enfriar y centrifugar a 8000 g por 15 minutos.
6. Recuperar el sobrenadante, colocar Isopropanol frió en relación 1 a 1, agitar.
7. Centrifugar a 12000 g por 15 minutos.
8. Una vez formado el pellet de ADN, eliminar el sobrenadante y lavar con Etanol al 70 % , colocar aproximadamente 300 ul, agitar.
9. Centrifugar a 12000 g por 3 minutos, retirar el sobrenadante y secar.
10. Colocar la muestra en la estufa a 40 C por 15 minutos.
11. Leer en el lector de DNA-Biophotometro y apuntar.

Apoptosis Tunel

Protocolo Kit

Previo a realizar la tinción por el Kit Tunnel, es necesario seleccionar los cortes de tejido que posean Esferoides en el órgano Linfoide.

La placa cargada que contenga el tejido a teñir se la desparafina usando dos baños de Xilol al 100 % durante 7 minutos cada uno.

Posteriormente se procede a colocar la placa en alcohol al 100, 95, 90, 80 y 70 %, cada baño tiene duración de 3 minutos, finalmente se sumergen las placas por 5 minutos en agua destilada, este proceso sirve para rehidratar los tejidos.

1. Una vez culminado los cinco minutos, se coloca sobre la placa, de una manera muy cuidadosa y con ayuda de una micro pipeta de 1000 ul, solución de NaCl al 0.85 % durante 5 minutos a temperatura ambiente.
2. Se realiza un lavado con PBS 1 X con ayuda de la micro pipeta de 1000 ul., 5 minutos a temperatura ambiente.

*nota: después de que se realice cada lavado con PBS o cualquier otra solución, la forma de limpiar las placas debe de ser cautelosa y minuciosa, debido a que el tejido no puede permanecer sin líquido en su superficie.

3. Se procede a colocar de igual manera, Paraformaldehído al 4 % durante 15 minutos a temperatura ambiente. * Sustancia Tóxica
4. Se realiza baño con PBS durante 5 minutos.

5. Durante este periodo el tejido puede quedar hasta una hora en PBS ya que es una solución tampón y le permite realizar alguna otra actividad inesperada.

6. Se procede a prepara las solución de Proteinasa K (en el Kit la encontramos en polvo a la cual le adicionamos 500 ul de agua desionizada esterilizada), tomamos 20 ul y lo llevamos a 100 ul con agua destilada, se coloca cuidadosamente sobre el tejido y se deja reposar a temperatura ambiente por 30 minutos.

7. Finalizado procedemos a realizar un lavado con PBS durante cinco minutos

8. Nuevamente realizamos un baño con solución de Paraformaldehído al 4 % durante 10 minutos.

9. Lavar con PBS durante 5 minutos, repetir este proceso.

10. Una de las placas puede quedar en PBS, la otra placa será usada como tratamiento control Positivo

a. Limpiamos la placa de PBS, y colocamos 100 ul de solución tampón DNAsa 1 Buffer, por cinco minutos.

b. Preparamos una mezcla que contenga 3 ul de DNAasa (DNAasa 1 1U/1ul) mas 300 ul de Buffer, limpiamos la placa del buffer colocado en el paso anterior y colocamos esta mezcla, durante 10 minutos a temperatura ambiente.

c. Una vez finalizado los 10 minutos, limpiamos la placa unas 3 veces con agua desionizada

d. Adicionamos PBS por 5 minutos a temperatura ambiente.

11. Preparamos la mezcla de Biotinylated Nucleotid Mix (en hielo) con rTDT de la siguiente manera :

a. Buffer de equilibración 98 ul por 100 ul

b. Byotinylated Nucleotid mix 1 ul por 100 ul

c. RTdT 1 ul por 100 ul .

12. colocamos encima de las placas, una lamina de Coverslips que vienen en el Kit.

13. Llevamos a 37 C por 60 minutos en cámara húmeda. Mientras la muestra se esta incubando preparamos en un jarra Coplin SSC a 2X, el Kit contiene SSC 20 X, realizamos una dilución de 1:10 con agua desionizada. Finalizada la media hora, colocamos las muestra en el baño de SSC 2 X por 15 minutos, esto además ayuda a que se desprendan los coverslips sin lastimar el tejido.

14. después de esto, colocamos en cada placa Peroxido de Hidrogeno 0.3 % por 5 minutos.

15. Realizamos dos baños con PBS 1 X 5 minutos cada uno.

16. Procedemos a diluir el Streptavidin HRP 1:500 (1ul en 500 ul de PBS 1X). Incubamos a temperatura ambiente por 30 minutos, en cámara húmeda.

17. Realizamos tres lavados con PBS 1X

18. Al finalizar el ultimo lavado, preparamos el combinado de DAB:

a. Buffer DAB 10 ul

b. DAB 20 X 10 ul

c. Peróxido de Hidrógeno 10 ul

d. Completar 200 ul con agua desionizada.

e. El tiempo de vida de esta solución es de 30 minutos

19. Colocamos 100 ul a cada placa, incube durante 10 minutos en cámara oscura y húmeda.

20. Finalizado los 10 minutos procedemos a lavar con agua desionizada 3 veces. Limpiamos los bordes de la placa y colocamos PBS 1 X – Glicerol para su observación en el microscopio.

Histología

Procedimiento (Bell, Lightner – 1988) * algunas modificaciones de la versión original.

1.- Se fijan la muestra con solución Davidson vía intra muscular con ayuda de una jeringuilla hipodérmica, la zonas donde de inyecta la solución Davidson son las siguientes : cefalotorax (areas dorsales y cerca del hepatopáncreas), cola (area dorsales y telson)

Posteriormente se coloca al camarón en un frasco con solución Davidson por 24 horas, transcurrido ese tiempo se los traslada a otro envase con Alcohol Etílico al 70 % hasta el análisis.

2.- Se procede a separar las partes que van hacer analizadas, en este caso el objetivo era el cefalotórax, así que se extrae el cefalotórax y se realiza un corte sagital para obtener dos partes y ser colocadas en la canasta de muestra.

3.- Inicia el proceso de deshidratación, la muestra pasa por distintos baños de alcohol (50, 70, 80, 90, 95 y 100 %) cada uno con duración de una hora. Concluido el último

baño de alcohol, se procede a realizar dos baños con Xyleno al 00 % para retirar el alcohol presente en el tejido (cada uno de una hora).

4.- El proceso de parafinado inicia con en el primer baño de parafina por 1 hora. (son 3 baños cada uno de una hora).

5.- Una vez concluido los baños, y obtenido el bloque de muestra, se procede a realizar la obtención de los cortes histológicos con ayuda del Micrótomo.

6.- Las placas obtenidas son colocadas en plancha caliente por 1 o 2 días aproximadamente.

7.- Las muestras que son usadas para histología común pasan a través de un proceso de desparafinado, inicia con los baños de Xyleno (7 minutos por cada uno, son dos) y luego los de alcohol (desde la concentración mas alta hasta agua destilada, cada uno de 3 minutos).

8.- Se procede a la tinción con Hematoxilina-Eosina (1 minutos cada una), se realiza el mismo proceso de deshidratación anteriormente mencionado, los tiempos varían, cada baño de alcohol es e 3 minutos y los de Xyleno son de 7 minutos.

9.- Se procede a realizar el montaje de la placa usando como resina Permount y se deja reposar por 3 horas previamente a ser observadas en el microscopio.

Histoquímica

Previamente a realizar este análisis, es necesario colocar en una plancha caliente durante media hora las placas que van a hacer usadas .

1.- Realizar el proceso de hidratación previamente mencionado.

2.- Toda el proceso es realizado en cámara húmeda, se coloca en cada placa suficiente leche descremada durante 1 hora a temperatura ambiente.

3.- Se realizan tres lavados con PBS 1 X Twin 0.01%, cado uno de 5 minutos.

4.-Se coloca el primer anticuerpo (41B12 1/20 para hemocitos hialinos o WSSV 1/500 diluidos en solución PBS 1X Twin 0.01% +leche descremada relación 4ml PBS Tween + 1m leche). Durante una hora a temperatura ambiente.

5.- Se realiza tres lavados con PBS 1X Twin 0.01 %, cada uno de 5 minutos.

6.-Se procede a colocar el segundo anticuerpo, ANTI DIGG, 7ul de anticuerpo en mezcla de 350 ul de solución PBS 1X Twin 0.01 % Leche, durante 1 hora a temperatura ambiente.

7.- Nuevamente se realizan los tres lavados con PBS 1X Tween 0.01%, de cinco minutos cada uno, en el ultimo lavado se prepara la solución Tampón de Fosfatasa Alcalina y la solución de Revelado.

8.- Se realiza un baño de 1 minuto con la solución Tampón Fosfatasa Alcalina a temperatura ambiente

9.- En este paso es necesario oscuridad en el área de trabajo, Se coloca la solución de revelado, en cámara húmeda, se revisa cada 10 minutos.

*Precaución .- la solución de revelado es Toxica.

10.- Finalizada la exposición a esta solución, se adiciona solución stop por 5 minutos a temperatura ambiente.

Hibridación Insitu

Antes de realizar este procedimiento, las placas que serán trabajadas es necesario colocarlas en plancha caliente durante media hora.

1.- Desparafinar e hidratar el tejido.

2.- Realizar un baño de cinco minutos con PBS 1X, en cámara húmeda a temperatura ambiente.

3.- Colocar la solución de Proteinasa K (25 ul/5 ml de PBS 1X), durante 15 minutos a 37 grados centígrados en cámara húmeda.

4.- Realizar 3 baños de PBS 1X Glicina 10X, en cámara húmeda, cado de 5 minutos.

5.-En cámara fría, se realiza un baño con PBS 0.4 % Paraformaldehido durante 10 minutos.

6.-Durante estos diez minutos, se prepara el baño María y también la sonda que será usada.

7.- Se coloca 100 ul de la mezcla de la sonda sobre cada placa y se les coloca un cubre objeto, se lleva las placa a baño María por 5 minutos.

8.- Las placas se someten a un shock térmico, se las coloca en cámara fría por 1 minuto.

9.- Se incuba toda la noche a 37 grados centígrados.

10.-Finalizada la incubación, se procede a realizar 3 baños de cada solución de SSC (2X,1X,0.5X) en el orden indicado, 5 minutos por cada baño, a temperatura ambiente, en cámara húmeda.

11.- Posteriormente se realiza un baño de TBS 1X durante cinco minutos en cámara húmeda, a temperatura ambiente.

12.- Se coloca la solución Blocking durante 10 minutos, a temperatura ambiente y en cámara húmeda.

13.- Luego del baño con la solución Blocking se coloca el anticuerpo ANTIDIOXIGENINA, durante 30 minutos, en cámara húmeda a 37 grados centígrados.

14.- Se realizan 3 baños con solución TBS 1X, 5 minutos cada una, temperatura ambiente en cámara húmeda.

15.- En el ultimo baño, se prepara la solución de revelado y la solución de Tampón de Fosfatasa Alcalina.

HOMOGENEIDAD DE VARIANZAS DE LOS ANÁLISIS REALIZADOS

Test of Homogeneity of Variances

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
NHT	4,013	1	57	,050
NBT	,685	1	57	,411
PO	4,971	1	34	,032
Elisahoraymedia	4,314	1	28	,047

Normalidad- análisis

PO(SPSS)

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
VAR00003	Between Groups	,360	1	,360	7,180	,011
	Within Groups	1,705	34	,050		
	Total	2,065	35			
VAR00004	Between Groups	90,564	1	90,564	6,396	,016
	Within Groups	481,444	34	14,160		
	Total	572,008	35			
VAR00005	Between Groups	362,585	1	362,585	6,403	,016
	Within Groups	1925,374	34	56,629		
	Total	2287,959	35			
VAR00006	Between Groups	,338	1	,338	6,718	,014
	Within Groups	1,712	34	,050		
	Total	2,051	35			
VAR00007	Between Groups	,000	1	,000	7,111	,012
	Within Groups	,000	34	,000		
	Total	,000	35			
VAR00008	Between Groups	90,757	1	90,757	6,393	,016
	Within Groups	482,679	34	14,196		
	Total	573,437	35			

Test of Homogeneity of Variances

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
VAR00003	,057	1	34	,813
VAR00004	1,431	1	34	,240
VAR00005	1,426	1	34	,241
VAR00006	,027	1	34	,869
VAR00007	6,869	1	34	,013
VAR00008	1,418	1	34	,242

Homogeneidad – ELISA (SPSS)

Datos base

Test of Homogeneity of Variances

VAR00001

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
4,314	1	28	,047

ANOVA

VAR00001

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	529,200	1	529,200	8,503	,007
Within Groups	1742,667	28	62,238		
Total	2271,867	29			

Datos transformados Log(x+1)

Test of Homogeneity of Variances

VAR00003

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2,451	1	28	,129

ANOVA

VAR00003

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	,002	1	,002	15,515	,000
Within Groups	,004	28	,000		
Total	,006	29			

Tablas de Contingencia – Hemogramas – SPV vs. TO

Tabla de Contingencia para S.G.

	t=o	SPV	total
Medium	22	14	36
STDV.	17.695	18.3	36
Standarized Residuals	1.0234	-1.01	0
Alto	7	16	23
STDV.	11.305	11.7	23
Standarized Residuals	-1.28	1.26	0
total	29	30	59

table contents:
Count
Expected Values
Standardized Residuals

Chi-square = 5.284 with 1
p = 0.0215
Fisher Exact Test:
= 0.0326

Tabla de Contingencia para Granulosos			
	t=0	SPV	total
Medium	27	30	57
STDV.	28.02	28.98	57
Standarized Residuals	-0.19	0.19	0
Alto	2	0	2
STDV.	0.98	1.02	2
Standarized Residuals	1.03	-1.01	0
total	29	30	59
table contents:			
Count			
Expected Values			
Standardized Residuals			
Chi-square =	2.142	with	1
p = 0.1434			
Fisher Exact Test:			
= 0.2373			

Tabla de Contingencia para Hialinos			
	t=o	SPV	total
Medium	3	16	19
STDV.	9.3	9.7	19
Standarized Residuals	-2.1	2.0	0
Alto	26	14	40
STDV.	19.7	20.3	40
Standarized Residuals	1.4	-1.4	0
total	29	30	59
table contents:			
Count			
Expected Values			
Standardized Residuals			
Chi-square =	12.48	with	1
p = 0.0004			
Fisher Exact Test:			
= 0.0006			

SOLUCIONES

Tampón Fosfato - PBS 10 X * 1 litro

- ClNa 80 g
- ClK 2 g
- Na2HPO4 14.4 g
- KH2PO4 2.4 g
- H2O desionizada 800 ml

PBS 1 X * 100 ml

90 ml H2O destilada + 10 ml PBS 10 X

PBS 1 X 0.01 % TWEEN * 20 ml

20 ml PBS 1 X + 0.002 ml TWEEN

Solución Fosfatasa Alcalina * 10ml

- 100 mM TRIS 1 ml
- 100 mM ClNa 0.2 ml
- 50 mM ClMg 0.5 ml
- Agua Desionizada 8.3 ml
-

Solución Alserver * 100 ml - pH. 4.6

- Citrato de Sodio (10%) 9 ml
- EDTA 0.37 g
- Glucosa 2 g
- ClNa 2 g
- Agua destilada 91 ml

Solución CBC al 2 % * 10 ml

- NaCO3 1.5 ml
- NaHCO3 3.5 ml
- Azide 0.9 ml
- H2O destilada 4.0 ml

Medio LB para Antibacteriano * 100 ml

- Agua destilada 100 ml
- LB caldo 2 g.
- ClNa 0.5 g

Medio LB Sólido para Antibacteriano * 50 ml

- Agua destilada 50 ml
- Agar LB 1 g
- ClNa 0.25 g

BIBLIOGRAFÍA

1. Shankar K.M. and Mohan C.V.(1998) Epidemiological aspects of shrimp viral diseases in India- a review. K Aqua Trop. 13(1):43-49.

2. Bachére E, Yannick G, González M, de Lorgeril J, Garnier J, Romestand B (2004) Insights into the anti-microbial defense of marine invertebrates: the penaeid shrimps and oyster Crasssostrea gigas, Immunological Reviews 198: 149-168.

3. Sangamaheswaran A.P., Jeyaseelan M.J.P. White Spot Viral Desease in Penaid Shrimp. (2001), Naga, The ICLARM Quarterly 24: 16-22

4. Muñoz, M., Cedeño, R., Rodríguez., Van der Knap., W. P.W., Mialhe., Bachére., (2000), Measurement of reactive intermediate production in haemocytes of the penaeid shrimp, Penaeus vannamei. Aquaculture. 191: 89-107.

5. Bachére E., Mialhe E., Noel D., Boulo V., Morvan A., Rodríguez J., (1995) Knowledge and research prospects in marine mollusk and crustacean immunology. Aquaculture 132, 17-32.

6. Montesdeoca M, Amano Y, Echeverria F, Betancourt I, Panchana F, Sotomayor M, Rodriguez J, La Respuesta Inmunitaria celuar del camaron Litopenaeus vannamei al WSSV y su utilidad en el Control de la enfermedad en los estanques, (2001) VI Congreso Ecuatoriano de Acuicultura.8 : 38 –42.

7. Wang H-C, Chang Y-S, Kou G-H, Lo C-F. 2004a. White spot syndrome virus: Molecular characterization of a major structural protein in a baculovirus expression system and shrimp hemocytes. Mar. Biotechnol.6: S95-S99.

8. Wu J L , Muroga K,(2004) Apoptosis does not play an important role in the resistance of immune Penaeus japonicus against white spot syndrome virus. Journal of Fish Diseases 27:15-21.

9. Khanobdee K, Soowannayan C, Flegel T.W., Ubol S, Withyachumnarnkul B, (2002) Evidence for apoptosis correlated with mortaliy in the giant black tiger shrimp Penaeus monodon infected with yellow head virus. Dis. Aquat. Org, 2002, 48:79-90.

10. Granja C.B., Vidal, O.M., Parra, G., Salazar, M., 2006. Hyperthermia reduces viral load of white spot syndrome virus in Penaeusvannamei. Dis. Aquat. Org. 68, 175–180.

11. Vargas –Albores F, Jimenez V, Yepiz P, Purification and comparison of B-1.3 –glucan binding protein from white shrimp (Penaeus vannamei) (1997). Comp. Biochem.Physol 116B:453-458.

12. Supamattaya K, Chittiwan V, Boonyaratpalin M, Immunological factors in Black Tiger shrim, Penaeus monodon, Fabricius.(2006), Aquafeed website.

13. Hasson K, Lightner D, Mohney L,Redman RM, White BM. Role of lymphoid organ spheroids in chronic Taura syndrome virus (TSV) infections in *Penaeus vannamei.* Dis.Aquat. Org, 1999; 38: 93-105..

14. Hose J, Martin G, Gerdad A, (1990). A Decapod Hemocyte Classification Scheme Integration Morphology, Cytochemestry and Function. Bio. Bull. 178:33-45.

15. Destoumieux D, Muñoz M, Cosseau C, Rodríguez J, Bulet P, Compo M, Bacheére E,. Journal of Cell Science 113 : 461 – 469 (2000) Penaeidins, antimicrobial peptides with chitin-binding activity, are produced and stored in

shirmp granulocytes and released after microbial challenge. Journal of Cell Science. 113: 461-469

16. Brostoff, J, Male, D. y Roitt, : Inmunología. 4ª ed. Ed. Harcourt-Brace. (1997)

17. Li Shi Yang, Zhi-Xin Yin, Ji-Xiang Liao, Xian-De Huang, Chang-Jun Guoa, Shao-Ping Wenga, Siu-Ming Chanc, Xiao-Qiang Yub, (2006), A Toll receptor in shrimp, Molecular Inmunology, Vol. 44, Issue 8, 1999-2008.

18. Flegel W. The Special Danger of Viral Pathogens in Shrimp Translocated for Aquaculture (2006) ScienceAsia 32 : 215 – 221.

19. O'Brien, Viruses and apoptosis (1998) Journal of General Virology 79: 1833-1845.

20. Engel D, Brouwer M, Mckenna S., Hemocyanin concentrations in marine crustceans as a function of environmental conditions, (1993), Marine Ecology Progress Series. Vol.93:235-244

21. Winton C, Chung-Hung L, Da-Fun Y, Jiann-Chu C, Hemolymph oxyhemocyanin, protein, osmolality and electrlyte leves of whiteleg shrimp Litopenaeus vannamei in relation to size and molt stage. (2002) Aquaculture 211: 325-339

22. Bachére E,(2000) Introduccion - Shrimp immunity and disease control, Aquaculture 191: 3-11.

23. Vargas-Albores, F and G. Yepiz- Plascencia (2000): Beta-glucan binding protein and its role in shrimp immune response. Aquaculture, 191: 13-21

24. Soderhall K, Serenius L, (1992) Crustacean immunity. Ann. Rev. Fish Dis. Pages . 3-2

25. Batistella, S., P. Bonivento and G.A. Amirante (1996a): Identification of an induced lectin involved in capsule formation in Squilla mantis (Crustacea, Stomatopoda) Ital. J. Zool., 63:119-123.

26. Séverine A , Ryan B., Kingsbury C, Gross P, Chapman R, Schey K, Antimicrobial activity of histones from hemocytes of the Pacific white shrimp (2004), Eur.J. Biochem 271 : 4825 – 4833.

27. Destoumieux D, Bullet P, Strub M,van Dorsselaer A, Bachere E, (1999) Recombinant expression and range of activity of penaeidins, antimicrobial peptides from penaeid shripms. Eur.J. Biochem. 266:335-346.

28. Rodriguez T, Borrel Y, Ramos L, Becquer U, Espinosa G, Activdad hemoaglutinante de la Hemolinfa de Litopenaeus scmitti.(2001) Rev. Invest, Mar 22(3) : 220-234

29. Tsing A, Arcier J.M., Brehélin M, (1989) Hemocytes of Penaeid and Palaemonid Shrimps: Morphology, Cytochemistry, and Hemograms, Journal of Invertebrate Pathology, 53:64-77

30. Rodríguez, J., Boulo, V., Mialhe, E. And Bachère, E., 1995. Characterization of shrimp haemocytes and plasma components by monoclonal antibodies. Journal of cellScience. 108, 1048–1050

31. Van de Braak, C.B.T., R. Faber, y J.H. Boon. 1996. Cellular and humoral characteristics of Penaeus monodon (Fabricius, 1798) haemolymph. Comparative

Haematology International, 194-203.

32. Henning, O.L. and E.R. Andreatta (1998): Effect of temperature in an intensive nursery system for Penaeus paulensis (Pérez Farfante, 1967). Aquaculture 164: 167-172.

33. Van der Braak C, Botterblom M, Taverne N, van Muiswinkel B, Rombout J, van der Knaap W. (2002) The roles of the haemocytes and lymphoid organ in the clearence of the infected Vibrio bacteria in Penaeus monodon shrimp. Fish and Shellfish Immunology,in press

34. Kanokpan W, Kornnika K, Supatra S, Prasert M, Boonsirm W,(2003) Time-course and levels of apoptosis in various tissues of black tiger shrimp Penaeus monodon infected with white-spot syndrome virus, Diseases of Aquatic Organisms 55 :3-10

35. Supamattaya,2001 – Tesis

36. Soderhall K, Cerenius L, Johansson M, the prophenoloxidase activating system in : invertebrates, New directions in Invertebrate Inmunology, (1996). Kenneth Soderhall, Sadaaki Iwanaga, Vasta Editors, SOS Publication N.J. USApp229-223

37. Johnson, P. (1987) A review of fixed phagocytic and pinocytotic cells of decapod crustaceans, with remarks on hemocytes. Dev. Comp. Immunol., 11: 679-704

38. Supamattaya, K., W. Phromkunthong, C. Tantikitti and R.W. Hoffmann. 2000. The immune system in black tiger shrimp, Penaeus monodon Fabricius : II.

Cells and tissues involved the removal of foreign particles in black tiger shrimp, Penaeus monodon Fabricius. Songklanakarin J. Sci. Technol. 22 (Suppl.): 581-588.

39. Rodriguez J, Le Moullac G, (2000) State of the art of immunological tools and health control of penaeid shrimp, Aquaculture191: 109-119

40. Vaux D. L., Strasser A. The molecular biology of apoptosis (1996). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 2239 – 2244.

41. Leist M, Kuhnle S, Single B, Nicotera P, Differentiation Between Apoptotic and Necrotic Cell Death by Means of the BM Cell Death Detection ELISA or Annexin V Staining, (1998), Biochemica No.2

42. De Toro G, Muerte celular programada, Revision del paradigma apoptosis-necrosis y formas alternatives de muerte celular,(2006) VIII Congreso Virtual Hispoamericano de Anatomia Patologica.

43. Gordeeva AV, Labas YA, Zvyagilskaya RA. 2003, Apoptosis in unicellular organisms: mechanisms and evolution.

44. Sahtout AH, Hassan MD, Shariff M (2001) DNA fragmentation, an indicator of apoptosis, in cultured black tiger shrimp Penaeus monodon infected with White spotsyndrome virus (WSSV). Dis Aquat Org 44:155–159

45. Graidist P. Fujise K, Wanna W, Sritunyalucksana K, Phongdara A,(2006) Establishing a role for shrimp fortilin in preventing cell death, Aquaculture, V.255 Issues :1-4, 157-164.

46. Söderhäll K, Ajaxon R (1982). Effect of quinones and melanin on mycelial growth of Aphanomyces spp. and extracellular protease of Aphanomyces astaci, a parasite on crayfish. J Invertebr Pathol 39: 105–109.

47. Nagai T, Kawabata S. (2000) A link between Blood Coagulation and Prophenol Oxidase Activation in Arthropod Host Defense, The Journal of Biological Chemestry 275 : 29264 – 29267.

48. O.I.E Manual of diagnostic for Aquatic Animales, 2005

49. Chou H, Huang C, Wang C, Chiang H, Lo C, Pathogenecity of baculovirus infection causing white spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Taiwan (1995) Diseases of Aquatic Organism 23 : 165-173

50. Mohan, P.C., Rao, R.G. and Dehairs, F. (1997). Role of Godavari mangroves (India) in the production and survival of prawn larvae. Hydrobiologia, 358 (1-3) : 317-320.

51. Lightner, D.V. 1993. Diseases of cultured Penaeid shrimp. Pp. 393–486. In: James P. McVey, ed. CRC Handbook of Mariculture, 2nd Edition, Volume I, Crustacean Aquaculture. Boca Raton, Florida, CRC Press.

52. Panorama Acuícola Online, 2008

53. Sippo – Swiss, Info, 2005

54. Muñoz, M. (1996). Desarrollo y optimización de ensayos para evaluar el estado immunitario del camaron Penaeus vannamei. Tesis de Grado, Escuela Superior Politecnica del Litoral, Guayaquil, Ecuador

55. Echeverría F. (1998) Desarrollo de un ensayo de cuantificación de la actividad fenoloxidasa (PO) como una herramienta de inmunoevaluación del camarón Penaeus vannamei. Redacción Técnica. Universidad de Guayaquil, Guayaquil, Ecuador.17pp.

56. Hernández-Rodríguez, A., Alceste-Oliviero, C., Sánchez, R., Jory, D., Vidal, L. & Constain-Franco, L.-F. 2001. Aquaculture development trends in Latin America and the Caribbean. In: Subasinghe, R.P., Bueno, P., Phillips, M.J., Hough, C., McGladdery, S.E. & Arthur, J.R., eds. Aquaculture in the Third Millennium. Technical Proceedings of the Conference on Aquaculture in the Third Millennium, Bangkok, Thailand, 20–25 February 2000. pp. 317–340. NACA, Bangkok and FAO, Rome.

57. Kimura T , Yamano K, Nakano H, Momoyama K, Hiroka M and Inouye K, (1996), Detection of penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV) by PCR, Fish Pathol, 31, 93-98.

58. ell, T., and D.V. Lightner. (1988). A Handbook of Normal Penaeid Shrimp Histology. World Aquaculture Society, Baton Rouge, L.A. EEUU.

59. Valladares, 2007

60. Zar J, Biostatistical Analysis, fourth edition,1999, Prenice – Hall, Inc. EEUU.

61. Gainza O, 2006

62. Santander R, 2008, en proceso.

63. Wongprasert K, Khanobdee K, Giunukarn S, Meeratana P, Withyachumnarnkul B, (2003), Time-course and levels of apoptosis in varius tissues

of black shrimp *Penaeus monodon* infected with white-spot syndrome virus, Diseases of Aquatic Organisms,Vol.55:3-10, 2003

64. Shao M, Zhang Z, Kang K, Chen Z, Kim J, (2004) The study on the cytology and histochemestry of lymphoid organ spheroids in Penaeus chilensis. Aquaculture(240), 463-471

65. Margaretha S, Leigh O, The haemocytic origin of lymphoid organ shepereoid cells in the penaeid prawn Penaeus monodon.(2000) Diseases of Aquatic Organism,Vol.40: 85-92

66. Echeverría F. Com.prs. 2008

67. Muñoz M. Vandenbulcke F, Saulnier D, Bachére E. (2002) Epxression and distribution of penaid antimicrobial peptides are regulated by haemocytes reactions in microbial challenged shrimp. Eur.J. Biochem.269,2678-2689

68. Wang YT, Liu W, seah JN, Lam CS, Xiang JH, Korzh V, Kwang J, White spot virus (wssv) infects specifics hemocytes of the shrimp Penaeus merguensis,(2002), Diseases of Aquatic Organisms, Vol 52: 249- 259.

69. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR (1972) Apoptosis: a basic bio- logical phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer 26:239–257

70. Thornberry NA, Lazebnik Y (1998) Caspases: enemies within. Science 281:1312–1316

71. Sperandio S., Belle I., Bredesen E.D., An alternative, nonapoptotic form of programmed cell death, (2000) PNAS, vol. 97, no. 26:14376-14381

72. Wang Y, Xianting L, Pelguo D, Yingmei Z, Wenling H, Ma D.(2003) An alternative form of paraptosis-like cell death, triggered by TAJ/TROY and enhanced by PDCD 5 overexpression, Journal of Cell Science 117(8):1525-1531

73. Martin, G. G. y J. E. Hose (1992): Vascular elements and blood (hemolymph). Microscop. Anat. Inv. 10:117-146.