ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL
Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar

"Inmunoestimulación temprana de *Litopenaeus vannamei* para inducir una mayor respuesta inmune al virus de la mancha blanca."

Tesis de Grado
Previa a la obtención del título de:

MAGISTER EN CIENCIAS

Presentada por:
Yuri Adán Espinosa Ortega

Guayaquil – Ecuador
2003

TESIS ELABORADA CON EL SOPORTE DE:

FUNDACIÓN CENAIM-ESPOL

COOPERACIÓN TÉCNICA BELGA

UNIVERSIDAD DE GANTE BÉLGICA

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE LOVAINA – BÉLGICA

FUNDACIÓN INTERNACIONAL PARA LA CIENCIA

VITA

Yuri Adán Espinosa Ortega nació el 19 de Mayo de 1963 en Boaco, Nicaragua. Se graduó como bachiller en el Colegio Calasanz de Managua, Nicaragua en diciembre de 1982. Realizó sus estudios universitarios en la Universidad Nacional Autónoma, Heredia, Costa Rica graduándose como Biólogo Marino en octubre de 1989. Realizó estudios de post grado sobre "Técnicas de Propagación de Camarones" en la Naikai Sea Farming Centre, prefectura de Yamaguchi, Japón durante el período de febrero-agosto de 1990. Laboró como gerente de producción de la empresa Larvas del Pacífico S.A (LAPSA) Nicaragua, entre noviembre de 1991 a enero de 1993. En septiembre de 1993 realizó estudios de post grado en la Texas A & M University atendiendo curso de entrenamiento en camarones. En noviembre de 1993 se integró como vice gerente de producción de la granja camaronera Camarones del Pacífico S.A, (CAMPA) Nicaragua. En noviembre de 1996 asumió la gerencia de producción cargo que desempeñó hasta agosto del 2001. Ingresó al programa de Maestría en Ciencias con especialidad en Acuicultura Marina en septiembre del 2001 completando sus estudios en octubre del 2003.

DECLARACIÓN EXPRESA

"La responsabilidad por los hechos, ideas y doctrinas expuestos en esta tesis, me corresponden exclusivamente; y el patrimonio intelectual de la misma, a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL."

(Reglamento de Exámenes y Títulos profesionales de la ESPOL.

Yuri Adán Espinosa Ortega

TRIBUNAL DE TESIS

Eduardo Cervantes Ing.
Presidente del Tribunal

Jenny Rodríguez, Ph.D.
Directora de Tesis

Laurence Massaut, Ph.D.
Miembro del Tribunal

Julie Nieto, Ph.D.
Miembro del Tribunal

Stanislaus Sonnenholzner,Ph.D.
Miembro del Tribunal

Es algo formidable que vio la vieja raza
robusto tronco de árbol al hombro de un campeón
salvaje y aguerrido, cuya fornida maza
blandiera el brazo de Hércules, o el brazo de Sansón
fragmento del poema
Caupolicán
Rubén Darío

Esta Tesis está dedicada a la memoria de mi hermano

Jorge Mauricio Espinosa Ortega

(19 de Julio de 1957 – 29 de Julio del 2003)

Con todo el amor de tu hermano

Yuri

San Pedro de Manglar Alto, Ecuador

Octubre 2003

AGRADECIMIENTOS

Al Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas (CENAIM) en la persona de su Director Dr. Jorge Calderón y a su personal científico y técnico por el apoyo brindado.

A la Cooperación Técnica Belga quien brindó el financiamiento necesario para realizar los estudios de maestría.

Al programa IFS dentro del cual pude desarrollar mi trabajo de tesis.

A la Dra. Jenny Rodríguez, por darme la oportunidad de conocer y explorar el apasionante campo de la inmunología. Su guía fue acertada y oportuna siempre.

A Fabricio Echeverría por su imprescindible apoyo técnico y su incondicional amistad y fraternidad, Fanny Panchana por su colaboración en el análisis histológico de las muestras, Irma Betancourt por su colaboración en los análisis de PCR.

A Marita, Ma. Elena, Mervin, René, Robin, Galo, William, Ma Elena y William Maximiliano, ellos han pasado a formar parte de mi familia.

A Mariuxi Zhinaula, siempre tendrás un lugar especial en mi corazón.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABLAS

ABREVIATURAS

AA	Actividad antibacteriana
Am	Hemocitos amorfos
ANOVA	Análisis de varianza
BSA	Albúmina de suero bovino
CDH	Conteo diferencial de hemocitos
CP	Proteínas del cangrejo de río
D.O	Densidad óptica, en lector de micro placas Multiskan®
ADN	Ácido desoxirribonucléico
G	Hemocitos granulosos
Hi	Hemocitos hialinos
HP	Hepatopáncreas en camarones
IHHNV	Virus de la necrosis infecciosa hipodérmica y hematopoyética
L-DOPA	L-dihidroxifenilalanina
mAbs	Anticuerpos monoclonales
NBT	Nitro blue tetrazolium
NTH	Número total de hemocitos
O_2^-	Anión superóxido
Pen	Proteína Peneidina en *Litopenaeus vannamei*
PL	Post larvas
PO	Actividad fenoloxidasa
PP	Proteínas plasmáticas
proPO	Sistema profenoloxidasa
ROIs	Intermediarios reactivos de oxígeno
SG	Hemocitos semigranulosos
SOD	Súper óxido dismutasa
TSV	Virus del síndrome de taura
u	Unidades de medición en jeringuillas de insulina (100 u)
WSSV	Síndrome del virus de la mancha blanca

RESUMEN

Se realizaron dos experimentos utilizando camarones *L. vannamei* cultivados bajo dos protocolos; larvicultura tradicional sin uso de probióticos y larvicultura con uso del probiótico *Vibrio alginolyticus* (cepa Ili). En cada protocolo se utilizaron β-1,3-glucanos, administrados en etapa temprana (Zoea II), etapa media (PL12), etapa tardía (15 días pre infección) y un control sin β-glucanos. Los desafíos se realizaron administrando papilla conteniendo el WSSV, los desafíos tuvieron una duración de 15 días y se realizaron a temperatura ambiente. En el ensayo I se utilizaron post-larvas de 0,10 ± 0,03 g. Los resultados del análisis de las curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) no mostraron diferencias significativas en ninguno de los tratamientos. Los resultados del ANOVA de medidas repetidas indicaron una mayor supervivencia ($p < 0{,}01$) con uso de probióticos en el período 0 a 52 h post desafío, durante el período 56 a 156 h post desafío, el efecto de los β-glucanos aplicados en etapa temprana (ZoeaII) y media (PL12) sin probióticos presentaron las mayores supervivencias, durante el período 164 a 292 h post desafío no se presentaron diferencias significativas en la supervivencia final. En el ensayo II se utilizaron los camarones pertenecientes a los mismos grupos utilizados en el primer experimento pero con peso promedio de 2,64 ± 0,93 g. Los parámetros inmunitarios evaluados fueron anión superóxido (O_2^-), actividad fenoloxidasa (PO), proteínas plasmáticas (PP), actividad antibacteriana (AA), número de hemocitos totales (NHT), conteo diferencial de hemocitos (CDH) e índices inmunitarios. La prueba de PO no mostró diferencias significativas para ningún tratamiento. Los probióticos incentivaron una mayor generación de O_2^- ($p < 0{,}01$), disminuyeron la concentración de PP ($p = 0{,}03$), aumentaron la AA ($p < 0{,}01$), promovieron una mayor cantidad de NTH ($p < 0{,}01$), principalmente hemocitos granulosos ($p < 0{,}01$) y

semigranulosos ($p < 0,01$), y aumentaron los índices inmunitarios ($p < 0,01$). Los efectos de la aplicación de β-glucanos estuvieron en dependencia del tiempo de aplicación. La aplicación de β-glucanos disminuyó la generación de O_2^-, especialmente la inmunoestimulación temprana (ZoeaII) ($p = 0,04$), aumentó la cantidad de PP, especialmente cuando la inmunoestimulación fue temprana (ZoeaII) ($p < 0,01$), aumentó la AA con inmunoestimulación temprana (ZoeaII) ($p < 0,01$), tuvo un efecto negativo en la producción de hemocitos hialinos, (exceptuando la inmunoestimulación temprana-ZoeaII) y presentó un efecto negativo en los índices inmunitarios (exceptuando la inmunoestimulación tardía 15 días). En términos inmunitarios, los mejores resultados se consiguieron aplicando probióticos en la larvicultura e inmunoestimulando en etapa tardía (15 días pre desafío). Esta combinación aumentó la cantidad de proteínas plasmáticas (anulando el efecto negativo del probiótico), aumentó la generación de anión superóxido (contrarrestando el efecto negativo del β-glucano), presentó alto número de hemocitos totales iniciales y finales, especialmente con hemocitos granulosos y semigranulosos, presentando además el índice inmunitarios más alto al final del experimento.

1. INTRODUCCIÓN

La inmunidad es el conjunto de procesos de defensa que se manifiestan ante la presencia de moléculas extrañas (Vásquez *et al*., 1998). Durante la evolución se han seleccionado dos sistemas que proveen defensa interna contra agentes infecciosos: el sistema inmune innato (natural) y el adquirido (adaptativo) (van de Braak *et al*., 1996). Los decápodos tienen un sistema circulatorio abierto mediante el cual son distribuidos nutrientes, oxígeno, hormonas y poseen solamente inmunidad innata (Vásquez *et al*.,1998). La inmunidad adquirida es filogenéticamente joven, se encuentra solamente en vertebrados y opera a través de los linfocitos (Lee y Söderhäll, 2002). El sistema inmune innato se ha encontrado en todos los animales multicelulares expresado como dos mecanismos de acción: los mecanismos de mediación celular, que consisten en reacciones tales como fagocitosis, encapsulación, citotoxicidad coagulación etc. y los factores humorales entre los que se pueden contar; proteínas de coagulación, aglutininas (Ej. lectinas), enzimas hidrolíticas y péptidos antimicrobianos, los cuales a menudo son producidos por los factores celulares. (van de Braak *et al*., 1996; Johansson *et al*., 2000)

Aunque el camarón cuenta con un sistema bastante completo de defensa inmunitario, su cultivo ha experimentado un descenso dramático debido a la presencia de patógenos. Aguirre y Ascencio (2000) han elaborado una lista exhaustiva de las principales enfermedades asociadas al cultivo del camarón, identificando una amplia gama de patógenos que incluyen protozoarios, hongos, bacterias y virus; entre éstos últimos se conocen cerca de veinte diferentes tipos de virus capaces de infectar a los camarones.

Los patógenos de importancia por sus efectos negativos en la industria incluyen al virus de la mancha blanca (WSSV), el virus de la necrosis infecciosa hipodérmica y hematopoyética (IHHNV) y el virus del síndrome del taura (TSV) (Lightner, 1996; Aguirre y Ascencio, 2000).

La metodología tradicional y ampliamente extendida de levantamiento larvario de camarones peneidos así como del cultivo en piscinas, involucra el uso de antibióticos de forma regular durante gran parte del cultivo, con la finalidad de combatir patógenos importantes como; *Vibrio harveyi, Vibrio vulnificus, Vibrio parahemolyticus* frecuentemente asociados a procesos infecciosos (Le Moullac *et al*., 1998). El uso de antibióticos representa un riesgo debido a la creciente resistencia de las bacterias a éstos. Por otra parte, no se pueden descartar efectos secundarios negativos como la depresión del sistema inmune, reportado en peces tratados con oxitetraciclina (Le Moullac *et al.,* 1998).

Una estrategia de mucha aceptación es la utilización de probióticos. Se considera que una microflora benéfica además de impedir la colonización de bacterias patógenas podría incidir sobre la salud de los animales, induciendo a un mejor desarrollo de los tejidos inmunitarios en los estadíos de desarrollo larvario (Moriarty, 1999; Berger, 2000).

Por otra parte, un método alterno o sinérgico a los probióticos podría ser el suministro en larvicultura de inmunoestimulantes tales como los β-glucanos. Larvas saludables con sus tejidos inmunes bien desarrollados podrían enfrentar con ventaja los desafíos microbianos en los estanques, ó responder mejor a tratamientos de inmunoestimulación.

Al respecto Arala-Chávez y Sequeira (2000) concluyen que los invertebrados a pesar de tener una muy baja diversidad de receptores para inmunoestimulantes comparado con los vertebrados, pueden generar respuestas inmunes. Los β-glucanos aplicados oralmente han estimulado una mayor producción de O_2^- (Song y Hsieh, 1994; Chang *et al*., 2003), promovido la activación de los hemocitos circulantes en *Astacus astacus* y *Carcinus maenas* (Smith y Söderhäll, 1983), *Penaeus monodon* (Le Moullac *et al*., 1998; Chang *et al.,* 2000; van de Braak *et al.,* 2002), *L. vannamei* (López *et al*., 2003), e incrementado significativamente la actividad de la PO en juveniles de *P. monodon* (Le Moullac *et al*., 1998) y *L. vannamei* (López *et al.,* 2003).

La presente investigación tuvo como objetivo evaluar el efecto de la inmunoestimulación temprana con β-glucanos administrados a postlarvas de *L. vannamei*, cultivadas sin probióticos y utilizando el probiótico *V. algynoliticus* cepa Ili. Se analizó, en un primer ensayo, la supervivencia de postlarvas PL-75 (aproximadamente 0,10 ± 0,03 g) sometidas a desafío con el virus de la mancha blanca en un período de quince días. En un segundo ensayo se cuantificó la respuesta inmune mediante hemogramas, producción de anión súper óxido (O_2^-), actividad fenoloxidasa (PO), proteínas plasmáticas (PP) y actividad antibacteriana del plasma (AA), de juveniles de 2,64 ± 0,93 g desafiados con el virus de la mancha blanca.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. INMUNIDAD

Los sistemas inmunes se han desarrollado para proteger a los organismos multicelulares de la invasión de partículas extrañas. Durante la evolución se han desarrollado dos tipos de sistemas inmunes para detectar dichas sustancias; el sistema innato (natural) y el adaptativo (adquirido) (Lee y Söderhäll, 2002). Los crustáceos no pueden producir inmunoglobulinas, células receptoras T, células de memoria T (Thörnqvist y Söderhäll, 1997; Arala-Chávez y Sequeira, 2000) y por ende no tienen memoria inmune. Poseen un sistema inmune innato rápido y eficiente para reconocer y destruir material no específico, incluyendo patógenos (van de Braak *et al*., 1996).

Aunque existen muchos trabajos sobre los mecanismos de defensa interna de los crustáceos, hay un consenso entre los diversos investigadores acerca de la clasificación de los mecanismos de defensa, siendo su funcionamiento muy similar en todas las especies de crustáceos (Jones, 1999; Johansson *et al*., 2000; Sierra *et al*., 2001).

2.1.1. Mecanismos celulares de defensa

La fagocitosis es la más común de las reacciones de defensa celular y junto con los componentes humorales, constituye la primera línea de defensa una vez que el patógeno ha sobrepasado la barrera física de la cutícula (Bayne, 1990; Söderhäll y Cerenius, 1992). Consiste en el reconocimiento, ingestión y degradación de partículas extrañas como bacterias, esporas o células envejecidas del propio organismo (Vázquez *et al*., 1998). Las partículas o microorganismos se internalizan dentro de una vacuola digestiva llamada fagosoma, donde se liberan enzimas degradativas y se generan radicales intermediarios de oxígeno reactivo (ROIs) (Söderhäll y Cerenius, 1992), en un proceso conocido como choque respiratorio (Muñoz *et al*., 2000). El primer ROI generado durante este proceso es el anión súper óxido (O_2^-), reacciones subsecuentes producirán otros intermediarios reactivos de oxígeno como peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radicales hidroxilo (OH^-) y oxígeno (O_2) (Anderson, 1996; Rodríguez y Le Moullac, 2000).

La formación de nódulos y la encapsulación son respuestas multicelulares para eliminar las partículas extrañas, que por su tamaño, no pueden ser fagocitadas o destruidas por los procesos humorales (Vásquez *et al*., 1998). Cuando la invasión se produce por una excesiva cantidad de microorganismos, que no pueden ser fagocitados, los hemocitos proceden a formar nódulos o bien encapsularlos (Bayne, 1990). Los microorganismos quedan atrapados dentro de éstos nódulos formados por varias capas de hemocitos altamente melanizados debido a la actividad fenoloxidasa del hospedero (Söderhäll y Cerenius, 1992). Estos dos procesos eliminan al patógeno por medio de la disminución de la concentración de oxígeno, la acción de hidrolasas ó quinonas tóxicas (Persson y Söderhäll, 1987).

El sistema profenoloxidasa (proPO) que al ser activado produce una serie de reacciones enzimáticas en cascada. El producto final de éstas reacciones es la melanina, un pigmento pardo negro con propiedades inhibitorias de la actividad de enzimas bacterianas y fúngicas, este mecanismo es conocido como melanización (Söderhäll *et al*., 1996; Gollas-Galván *et al*.,1999).

2.1.2. Mecanismos humorales de defensa

Las proteínas con función de comunicación o adhesión celular, capaces de reconocer carbohidratos como los lipopolisacáridos (componentes de la pared celular de microorganismos). Un ejemplo es la peroxinectina que puede actuar como aglutinina u opsonina (van de Braak *et al*., 1996), la que se encuentra asociada al sistema profenoloxidasa (proPO) y cumple una doble función: adhesión celular durante los procesos de fagocitosis, nodulación y/ó encapsulación y actividad peroxidasa. Estas proteínas se sintetizan en los hemocitos, se almacenan en los gránulos secretores en forma inactiva y se liberan en respuesta a un estímulo (van de Braak, 2002).

También se han encontrado proteínas con actividad antimicrobiana como las peneidinas, aisladas originalmente en *L. vannamei* las que están constituidas por tres miembros principales Pen 1,2 y 3 (5,48 – 6,62 kDa) expresadas constitutivamente en los hemocitos, encontrándose los péptidos maduros en los gránulos citoplasmáticos de hemocitos granulares (Destoumieux *et al*., 2000). La tasa de producción de peneidinas puede incrementarse bajo desafíos microbianos (Muñoz *et al*., 2002). Otras proteínas que presentan actividad antimicrobiana son la hemocianina que es un pigmento respiratorio y representa entre el 60% al 93% del total de la proteína en la hemolinfa de crustáceos (Cheng *et al*., 2002). Se ha reportado que el fragmento c-terminal de ésta proteína posee propiedades microbicidas (Destoumieux *et al*., 2001), y la callinectina una proteína aislada del cangrejo *Callinectes sapidus* la cual presenta una estructura similar a las peneidinas, formada por dos dominios; una secuencia N-terminal rica en prolina y un dominio C-terminal cíclico con seis residuos de cisteína, estos residuos presentan actividad antimicrobial para bacterias Gram-positivas y hongos filamentosos y propiedades aglutinantes para bacterias Gram-negativas (Bachère *et al*., 2000).

2.1.3. <u>Mecanismos de coagulación</u>

Finalmente se encuentran los mecanismos de coagulación cuya función es atrapar el material extraño y prevenir la pérdida de hemolinfa. Un ejemplo es la reacción de coagulación dependiente de la transglutaminasa (TGasa), la cual es inducida cuando se libera la TGasa desde los hemocitos, mediante reacciones Ca^{2+} dependientes (Sritunyalucksana y Söderhäll, 2000).

2.2. <u>INMUNOESTIMULANTES Y RESPUESTA INMUNE</u>

Los niveles de respuesta inmune varían entre las diferentes especies de crustáceos (Vásquez *et al*., 1998), por lo cual se considera que ciertos factores tanto ambientales como fisiológicos contribuyen de manera importante en la inmunidad de estas especies. Estos factores son: condiciones de estrés (Jussila *et al*., 2001), aclimatación (Lignot *et al*., 2000; Sánchez *et al*., 2001; Lemaire *et al*., 2002), condiciones ambientales y sustancias tóxicas o contaminantes (Lee *et al*., 1999; Celso, 2000; Chen y Chen, 2000; Le Moullac y Haffner, 2000), estadío de desarrollo y cercanía a la etapa de ecdisis (Vásquez *et al*., 1998; Okumura y Katsumi, 2000).

Se ha encontrado que la aplicación de β-1.3-glucanos activa los hemocitos de crustáceos in vitro e in vivo, causando una rápida y marcada reducción en el número de hemocitos circulantes, concomitante con el inicio de las reacciones de defensa celular en los cangrejos *A. astacus* (Smith y Söderhäll, 1983) y *C. maenas* (Smith y Söderhäll, 1983; Smith *et al*., 1984). Los β-glucanos también incrementan la generación de O_2^- intracelular (Song y Hsieh, 1994; Chang *et al*., 2000), estimulan la resistencia aumentando la supervivencia de postlarvas (Chang *et al*., 1999) y reproductores de *P. monodon* desafiados con el WSSV (Chang *et al*., 2000; Chang *et al*., 2003). Montesdeoca *et al*. (2002) encontraron que la respuesta inmunitaria de *L. vannamei* desafiado con WSSV se incrementó cuando la aplicación de β-glucanos se realizó antes de la infección con dosis de 75 mg/Kg de alimento. Los resultados de producción en piscinas experimentales manejadas por el CENAIM fueron de 1.330 Kg /ha durante el período de enero a abril del 2003 (12 camarones/m^2) utilizando juveniles provenientes de larvicultura manejada con probióticos y aplicando β-glucanos de acuerdo a los ciclos lunares (J. Rodríguez, comunicación personal, Fundación CENAIM-ESPOL, Guayaquil, Ecuador).

Otra estrategia de estimulación involucra el uso de bacterias probióticas. Rengpipat *et al*. (2000) utilizando la bacteria probiótica (*Bacillus* S11) demostraron incrementos significativos ($p < 0,05$) en la supervivencia, el crecimiento, la actividad fagocitaria y la actividad fenoloxidasa de *Penaeus monodon* desafiado con la bacteria patógena *V. harveyi*.

Gullian (2001) evaluando el efecto inmunoestimulante de bacterias probióticas asociadas al cultivo de *L. vannamei*, concluyó que las bacterias benéficas aisladas de la microflora autóctona del hepatopáncreas (HP) son competidoras potenciales de bacterias patógenas.

De las 80 cepas bacterianas aisladas del HP de camarones silvestres, dos (*Vibrio* P62 y *Bacillus* P64), cumplieron con los requisitos de alcanzar altos porcentajes de colonización (> 50%) en camarones de 1 g e inhibir tanto in vivo como in vitro, el crecimiento de *V. harveyi* (Gullian, 2001).

2.3. TÉCNICAS INMUNITARIAS

Los estudios para evaluar los parámetros celulares y humorales como indicadores de la condición del camarón se llevan a cabo con la intención de desarrollar criterios para inspeccionar la sanidad y realizar programas de selección para camarones con alta resistencia a patógenos (Gullian, 2001). Varios procedimientos cuantitativos han sido adaptados para evaluar la expresión de la respuesta inmune de los peneidos. Un primer paso es la medición in vitro de los parámetros inmunitarios tales como: Hemogramas, consistentes en el conteo del número total de hemocitos (NTH) (Perazzolo *et al*., 2002) y conteo diferencial de los tipos de hemocitos, cuantificación de la actividad fenoloxidasa (PO) (Sritunyalucksana y Söderhäll, 2000); medición de intermediarios reactivos de oxígeno (ROIs) (Muñoz *et al*., 2000) con especial énfasis en la producción del anión súper óxido (O_2^-) (Anderson *et al*., 1992), cuantificación de la actividad antibacteriana del plasma (AA) (Alabi *et al*., 2000), cuantificación de la concentración de proteína plasmática (PP) (Rodríguez y Le Moullac, 2000).

2.4. GENERALIDADES SOBRE EL WSSV

El agente responsable de la enfermedad de la macha blanca es un virus de ADN de doble hebra. Los reportes iniciales lo catalogaron como un báculo virus de no-oclusión, pero subsecuentes análisis de su secuencia genética no apoyaron esta afirmación (Lightner, 1996). Otros investigadores como van Hulten *et al*. (2001) lo han catalogado como un grupo nuevo llamado Nimaviridae. La literatura sin embargo le ha nombrado de diferentes maneras, la más generalizada de ellas como Virus de la Mancha Blanca ó WSSV por sus siglas en inglés (OIE, 2000).

El virus de la mancha blanca tiene un espectro amplio de hospederos. La primera epidemia se reportó en Japón, en granjas que cultivaban *Penaeus japonicus*, subsecuentes infecciones se han observado en poblaciones de *Penaeus chinensis, Penaeus indicus, Penaeus merguiensis, Penaeus monodon, Penaeus setiferus*, *Penaeus stylirostris, L. vannamei, Penaeus aztecus, Penaeus duorarum* y *Penaeus setiferus* (OIE, 2000).

Los primeros reportes del virus de la mancha blanca se dieron en Japón, Taiwán y China continental entre 1991 y 1993 (OIE, 2000). Posterior a esta fecha se ha reportado prácticamente en todo el este y sureste asiático (Chang *et al*., 1999). En el continente americano se reportó por primera vez en Texas, EE.UU. (Lightner, 1996). Para el año de 1999 al menos ocho países de Latinoamérica lo han reportado, Colombia, Ecuador, Guatemala, Honduras, México, Nicaragua, Panamá y Perú (Subasingue *et al*., 2001).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron camarones cultivados en las instalaciones del CENAIM (15,000 larvas por tanque de 15 m^3 de capacidad), levantadas mediante dos protocolos (Tabla 1). En el primer protocolo no se incluyó la utilización de probióticos. Para la aplicación del β-glucano las larvas se separaron en cuatro grupos. El primer grupo no recibió β-glucanos, el segundo grupo recibió inmunoestimulación temprana, utilizando β-glucanos aplicados desde Zoea II hasta PL18 administrados utilizando rotíferos y *Artemia* enriquecidos con levadura de pan (levapán®) y alimento artificial Cenaim 50 (150 mg /Kg alimento), el tercer grupo recibió inmunoestimulación media desde PL12 hasta PL18 utilizando β-glucanos con alimento artificial Cenaim 50 y el cuarto grupo recibió inmunoestimulación tardía utilizando β-glucanos con el alimento artificial Cenaim 50 únicamente durante los15 días previos a la infección.

Para el segundo protocolo se utilizó el probiótico *Vibrio alginolyticus* (cepa Ili) aislado en un laboratorio del Ecuador (J. Rodríguez, comunicación personal, Fundación CENAIM-ESPOL, Guayaquil, Ecuador) y usado intensivamente como probiótico en larvas de camarón (Zherdmant *et al*., 1997) adicionado al agua desde estadío nauplio 6 hasta PL12 a una concentración en crecimiento exponencial de 10^{10} UFC/mL. La concentración final del probiótico en el agua de los tanques fue de 10^5 UCF/mL. La aplicación del β-glucano se realizó siguiendo el mismo procedimiento empleado en el primer protocolo.

Tabla 1:Tratamientos utilizados en el presente estudio

Tratamiento	Combinaciones
T1	Con probióticos, sin β-glucanos
T2	Con probióticos, β-glucanos Zoea II a PL18
T3	Con probióticos, β-glucanos PL12 a PL18
T4	Con probióticos, β-glucanos 15 días pre infección
T5	Sin probióticos, sin β-glucanos
T6	Sin probióticos, β-glucanos Zoea II a PL18
T7	Sin probióticos, β-glucanos PL12 a PL18
T8	Sin probióticos, β-glucanos 15 días pre infección

3.1. ENSAYO I. DESAFÍO CON EL WSSV Y EVALUACIÓN DE LA SUPERVIVENCIA

3.1.1. **Diseño experimental**

El primer ensayo consistió en evaluar la supervivencia en los animales provenientes de los ocho tratamientos sometidos a desafío con el WSSV. El experimento se llevó a cabo en el laboratorio #1 (CENAIM) durante el período comprendido del 20 de marzo del 2003 al 04 de abril del 2003 (15 días). Las unidades experimentales fueron recipientes de vidrio de 4 L de capacidad (carameleras). Las unidades observacionales fueron los camarones de aproximadamente 0,10 ± 0,03 g.

Se utilizó un diseño completamente aleatorio con 16 réplicas (unidades experimentales) por tratamiento y 10 unidades observacionales (n = 10) por réplica. Quince días antes del desafío los animales de todos los tratamientos, exceptuando el T1 y T5, recibieron una nueva dosis de β-glucanos (150 mg/Kg), administrados vía una dieta elaborada en el Centro (CENAIM 40).

El desafío se realizó por el método de ingestión. El extracto viral fue preparado en el CENAIM siguiendo el protocolo descrito por Chou *et al*. (1998). Se realizaron dos aplicaciones de la papilla a intervalos de 4 h cada una. Se administró aproximadamente el 10% de la biomasa por unidad experimental. Luego de 1 h post aplicación se procedió a recambiar el agua a fin de evitar muertes por degradación de la calidad del agua.

El experimento se dividió en tres fases y durante cada fase se anotó el número de camarones muertos por unidad experimental. La primera fase abarcó observaciones individuales por unidad experimental cada 2 h durante las primeras 52 h del experimento. En la segunda fase las observaciones se realizaron cada 4 h cubriendo el período entre las 56 y 156 h de experimentación. La tercera fase consistió en observaciones cada 8 h hasta completar la finalización del experimento a las 164 a 292 h.

Se estableció como hipótesis de trabajo que las postlarvas de 0,10 ± 0,03 g de peso cultivadas con probióticos e inmunoestimuladas con β-glucanos, estarían mejor preparadas para enfrentar desafíos virales. Los animales inmunoestimulados desde las fases tempranas de larva tendrían mejores supervivencias que los animales inmunoestimulados en la fase media de post larvas, ó los animales inmunoestimulados en fase tardía 15 días pre desafío ó los animales no inmunoestimulados.

3.1.2. <u>Análisis estadístico</u>

El comportamiento de la supervivencia se analizó usando la metodología de Kaplan-Meier (1958).

Se utilizó la herramienta de análisis de varianza de medidas repetidas de dos factores (probióticos × β-glucanos ó factores entre grupo) y un factor (tiempo ó dentro grupo), a un nivel de confianza del 95%. El diseño contempló el factor probióticos (A) con dos niveles; con probióticos (a_1), sin probióticos (a_2) y el factor β-glucanos (B) con cuatro niveles; sin β-glucanos (b_1), β-glucanos desde ZoeaII (b_3), β-glucanos desde PL12 (b_4) y β-glucanos 15 días pre infección (b_2).

Cuando el ANOVA detectó diferencias significativas debido a efectos principales (factores) ó interacciones de primer orden (factores entre grupo) se procedió a realizar análisis de medias post-hoc, utilizando el criterio de diferencias significativas mínimas (LSD) en una prueba de Scheffé con un nivel $\alpha = 0{,}05$ (Rao, 1998).

Se comprobaron los supuestos básicos del modelo mediante el análisis exploratorio de residuales (normal probability plot) para normalidad, prueba de Bartlett para homogeneidad de varianza (Zar, 1999). Para comprobar la independencia de muestras se realizó un análisis de correlación de los promedios vs. la desviación estándar según los procedimientos sugeridos para medidas repetidas (Rao, 1998; Zar, 1999). Los datos de supervivencia se transformaron con la función arcoseno ($\sqrt{y}$). Los cálculos estadísticos se realizaron con la ayuda del paquete Statística® 4.1 (1994-2000, StatSoft, Oklahoma, EE.UU.).

3.2. ENSAYO II. DESAFÍO CON WWSV Y EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE

3.2.1. **Diseño Experimental**

Se utilizaron los camarones pertenecientes a los mismos grupos utilizados en el primer bioensayo, con la única diferencia de tener más edad y peso (2,64 ± 0,93 g).

El desafío con WSSV se realizó en el laboratorio #23 (CENAIM), durante el período comprendido entre el 5 de junio del 2003 y el 20 de junio del 2003 (15 días). El experimento se realizó en 24 tanques de 250 L (unidades experimentales). Los animales se distribuyeron de forma completamente aleatoria, con tres réplicas por tratamiento y 30 animales por réplica (unidades observacionales n = 30).

Quince días antes del desafío los animales de todos los tratamientos, exceptuando el T1 y T5, recibieron una nueva dosis de β-glucanos (150 mg/Kg), administrados vía una dieta elaborada en el Centro (CENAIM 40).

El desafío con el WSSV se realizó siguiendo el protocolo descrito en el ensayo I.

Se tomaron 10 muestras de camarones por réplica, en tres muestreos independientes considerando los siguientes muestreos:

- T_i (0 h inicio del experimento) Respuesta de base
- T_{24} (24 h post infección). Respuesta a la infección
- T_f (360 h ó15 días post infección). Respuesta de los supervivientes

Se tomó la hemolinfa de los camarones muestreados utilizando jeringuillas de insulina (100 u), previamente cargadas con una solución anticoagulante de citrato de sodio al 10% estéril en relación 1:1 v:v (Muñoz *et al.,* 2002). La muestra se dividió en tres alícuotas las que se utilizaron para: hemogramas (Muñoz *et* al., 2002) y cuantificación del anión súper óxido (Muñoz *et* al., 2002). La hemolinfa restante se centrifugó y el pellet sirvió para la detección de la actividad fenoloxidasa (Tapia, 1997) y el sobrenadante se utilizó para la cuantificación de proteínas plasmáticas (Lowry *et* al., 1951) y la actividad antibacteriana (Tapia, 1997).

El cálculo del índice inmunitario se basó en el procedimiento descrito por Gullian (2001). Se consideraron los resultados obtenidos en las pruebas inmunitarias (a excepción de la PO) y la fórmula para transformar los resultados fue la siguiente:

$$Vt = (a - b) \times \frac{0.2}{k}$$

Donde:Vt = Valor transformado

a = valor obtenido por réplica en cada prueba inmunológica

b = valor mínimo del rango

k = rango de cada prueba

0.2 = correspondiente al 20%

El índice inmunitario global fue el resultado de la suma de los resultados parciales de cada prueba.

Índice = vt(NTH) + vt(NBT) + vt(PO) + vt(AA) + vt(PP)

Donde:vt(NTH) = valor transformado del número total de hemocitos

vt(NBT) = valor transformado del anión súper óxido vt(PO) = cuantificación de la actividad fenoloxidasa

vt(AA) = cuantificación de la actividad antibacteriana del plasma

vt(PP) = cuantificación de las proteínas plasmáticas

La actividad fenoloxidasa no pudo realizarse en el último muestreo por la insuficiente cantidad de hemolinfa recolectada en los camarones supervivientes al desafío. Se decidió entonces eliminar esta prueba del índice, bajo la premisa de que al ser una fórmula aditiva, el eliminar una prueba no afectaría sensiblemente el resultado del índice global.

Se estableció como hipótesis de trabajo que los juveniles de 2,64 ± 0,93 g cultivados con probióticos e inmunoestimulados con β-glucanos, estarían mejor preparados para enfrentar desafíos virales. Los animales inmunoestimulados en las fases tempranas de larva tendrían una mejor respuesta inmunitaria que los animales inmunoestimulados en la fase media, ó los animales inmunoestimulados en la fase tardía, ó los animales no inmunoestimulados.

3.2.2. Análisis Estadístico

Se utilizó la herramienta de análisis de varianza de medidas repetidas descrita en el ensayo I.. Cuando el ANOVA detectó diferencias significativas debido a efectos principales (factores) ó interacciones de primer orden (factores entre grupo) se procedió a realizar análisis de medias post-hoc, utilizando el criterio de diferencias significativas mínimas (LSD) en una prueba de Scheffé con un nivel $\alpha = 0,05$ (Rao, 1998).

Se comprobaron los supuestos básicos del modelo mediante el análisis exploratorio de residuales (normal probability plot) para normalidad, y prueba de Bartlett para homogeneidad de varianza (Zar,1999). Para comprobar la independencia de muestras se realizó un análisis de correlación de los promedios vs. la desviación estándar según los procedimientos sugeridos para medidas repetidas (Rao, 1998; Zar, 1999)

Para cumplir con la homogeneidad de varianza los datos de proteínas plasmáticas, conteo total de hemocitos y conteos diferenciales de hemocitos se transformaron usando log (X+1). Los cálculos estadísticos se realizaron con la ayuda del paquete Statística® 4.1 (1994-2000, StatSoft, Oklahoma, EE.UU.).

Los datos en las tablas y figuras se presentaron como media ± desviación estándar sin transformarse para facilitar su interpretación.

4. RESULTADOS

4.1. ENSAYO I, ANÁLISIS DE LA SUPERVIVENCIA

El desafío se realizó a temperatura ambiente registrándose un promedio de temperatura de 28,7 ± 0,3 ^{o}C con una fluctuación entre los tratamientos menor a un grado Celsius.

El análisis de los percentiles de supervivencia indicó que el 25% de la población total (todos los tratamientos) murió durante el intervalo entre 0 y 14 h post infección. El 50% de la población total murió en el intervalo comprendido entre las 0 y 36 h post infección y el 75% de la población murió en el intervalo comprendido entre las 0 y 92 h post infección. La estimación de las curvas de supervivencia por método de Kaplan-Meier no detectó diferencias significativas entre los tratamientos (Fig.1).

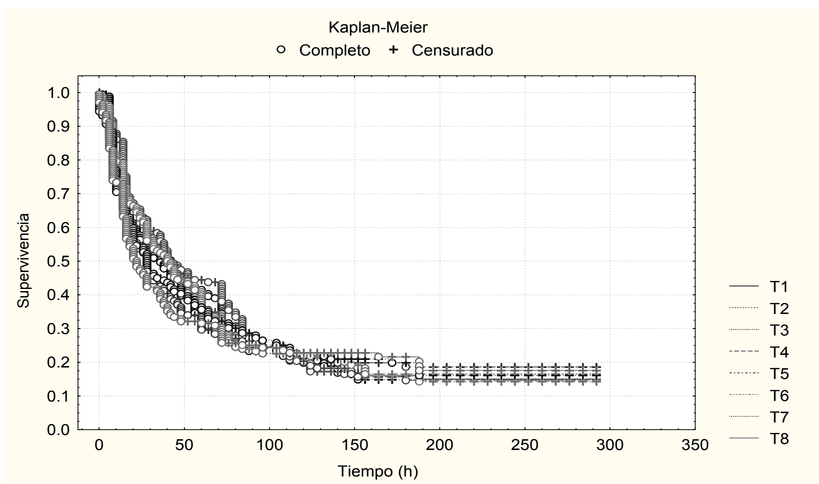

Figura 1: Tiempos de supervivencia del ensayo I de juveniles de *L. vannamei* desafiados con el WSSV.

Para el período 0 a 52 h el análisis de varianza de medidas repetidas detectó diferencias significativas para el efecto probióticos (p = 0,03). Encontrándose que los tratamientos con inmunoestimulación y probióticos tuvieron mayores supervivencias durante este período. También se encontraron diferencias significativas para el factor tiempo ($p < 0,01$) y la interacción probióticos-β-glucanos-tiempo para los tratamientos con inmunoestimulación temprana (Tabla 2).

Tabla 2: Resultado del ANOVA de la supervivencia en el Ensayo I (0 – 52 h)

Efecto	Efecto (gl)[a]	Efecto (CM)[b]	Error (gl)	Error (CM)	F	p
Probióticos	1	5,5083	120	0,6335	8,6950	<0,01
β-glucanos	3	1,6976	120	0,6335	2,6796	0,05
Tiempo	24	8,2062	2.880	0,1590	514,9955	<0,01
Prob x β-glucanos	3	0,1964	120	0,6365	0,3102	0,82
Prob x tiempo	24	0,0101	2.880	0,0159	0,6370	0,91
β-glucanos x tiempo	72	0,0171	2.880	0,0159	1,0712	0,32
Prob x β-glucanos x tiempo	72*	0,0291	2.880	0,1593	1,8283	<0,01

[a] gl = grados de libertad, [b]CM= Cuadrado medio

Para el período 56 a 156 h los tratamientos de inmunoestimulación temprana (ZoeaII) y media (PL12) sin probióticos presentaron las mayores supervivencias ($p < 0,01$). También se encontraron diferencias significativas para el factor tiempo ($p < 0,01$) y la interacción probióticos-β-glucanos-tiempo ($p < 0,01$) (Tabla 3).

Tabla 3: Resultado del ANOVA de la de supervivencia en el Ensayo I (56 – 156 h)

Efecto	Efecto (gl)[a]	Efecto (CM)[b]	Error (gl)	Error (CM)	F	p
Probióticos	1	0,0850	120	1,8970	0,0451	0,83
β-glucanos	3	0,5533	120	1,8970	0,2917	0,83
Tiempo	26	1,3955	3.120	0,0143	97,2934	<0,01
Prob x β-glucanos	3	1,0290	120	1,8970	0,5424	0,65
Prob x tiempo	26	0,0210	3.120	0,0143	1,4466	0,67
β-glucanos x tiempo	78	0,0438	3.120	0,0143	3.0523	<0,01
Prob x β-glucanos x tiempo	78*	0,0339	3.120	0,0143	2,3590	<0,01

[a] gl = grados de libertad, [b]CM= Cuadrado medio

Durante el período 164 a 292 h post desafío la mortalidad fue significativa hasta las 188 h la interacción probióticos-β-glucanos-tiempo fue significativa ($p < 0{,}01$) y no se encontraron diferencias significativas en términos de supervivencias finales (Tabla 4).

Tabla 4: Resultado del ANOVA de la supervivencia en el Ensayo I (164 – 292 h)

Efecto	Efecto (gl)[a]	Efecto (CM)[b]	Error (gl)	Error (CM)	F	p
Probióticos	1	0,7093	120	1,5516	0,4572	0,50
β-glucanos	3	1,8029	120	1,5516	1,1620	0,33
Tiempo	16	0.0120	1 920	0,0011	11,1456	<0,01
Prob x β-glucanos	3	0,7925	120	1,5516	0,5108	0,68
Prob x tiempo	16	0,0003	1 920	0,0011	0,2672	0,99
β-glucanos x tiempo	48	0,0004	1 920	0,0011	0,4168	0,99
Prob x β-glucanos x tiempo	48*	0,0017	1 920	0,0011	1,6207	<0,01

[a] gl = grados de libertad, [b]CM= Cuadrado medio

4.2. ENSAYO II: ANÁLISIS DE LA RESPUESTA INMUNE

El segundo ensayo se realizó a temperatura ambiente, la que se registró diariamente en todas las réplicas. Hubo pocas variaciones durante la mayor parte del experimento (23,0 ± 0,2 °C). La temperatura al inicio fue de 22,8 ± 0,3 °C incrementó un grado al día 5 y se mantuvo así hasta el día 12. El día 13 descendió más de un grado. Durante los dos últimos días hubo una recuperación paulatina finalizando en 23,0 ± 0,1 °C.

4.2.1. **Cuantificación del anión superóxido (O_2^-)**

El análisis de varianza de medidas repetidas encontró que la interacción probióticos-β-glucanos fue significativa ($p = 0{,}03$). En presencia de los probióticos, la tasa de producción de O_2^- fue mayor cuando la inmunoestimulación se realizó en etapa tardía (15 días preinfección) y temprana (ZoeaII) ($p = 0{,}03$), no hubo variaciones significativas con la inmunoestimulación media (PL12) y sin inmunoestimulación (Fig. 2).

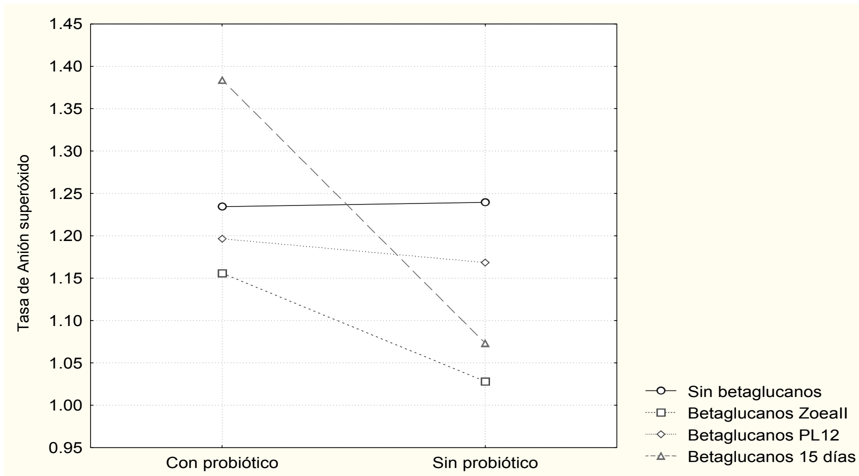

Figura 2: Efecto de la interacción probióticos-β-glucanos en la tasa de O_2^- de juveniles de *L. vannamei* desafiados con el WSSV.

La producción de O_2^- en el período 0 h post infección fue significativamente menor en los tratamientos sin probióticos T6 (ZoeaII) y T8 (15 días pre infección) ($p < 0{,}01$) indicando una disminución de la capacidad de producción de O_2^- cuando la inmunoestimulación con β-glucanos se realizó en fase temprana ó tardía sin uso de probióticos. En el período de infección (24 h) no se presentaron diferencias significativas. La respuesta de los supervivientes (360 h) fue de disminución de los niveles de producción de O_2^-. Es importante mencionar que únicamente el tratamiento con probióticos T4 (15 días pre infección) incrementó significativamente la tasa de producción durante este período ($p < 0{,}01$), reflejando el hecho que los animales estimulados con probióticos y β-glucanos en fase tardía fueron capaces de generar una eficiente respuesta inmune (Tabla 5).

Tabla 5: Tasa de producción de O_2^- de juveniles de *L. vannamei* desafiados con el WSSV

Tratamientos	Período de muestreo		
	0 h	24 h	360 h
T1	$1{,}282 \pm 0{,}148^{a*}$	$1{,}336 \pm 0{,}190^{a**}$	$1{,}085 \pm 0{,}225^{a*}$
T2	$1{,}228 \pm 0{,}059^{b*}$	$1{,}438 \pm 0{,}161^{b**}$	$0{,}801 \pm 0{,}307^{a*}$
T3	$1{,}256 \pm 0{,}142^{a*}$	$1{,}179 \pm 0{,}061^{a**}$	$1{,}191 \pm 0{,}389^{a*}$
T4	$1{,}346 \pm 0{,}143^{b*}$	$1{,}056 \pm 0{,}050^{a*}$	$1{,}722 \pm 0{,}093^{c**}$
T5	$1{,}359 \pm 0{,}140^{b*}$	$1{,}181 \pm 0{,}166^{a**}$	$1{,}179 \pm 0{,}169^{a*}$
T6	$1{,}025 \pm 0{,}036^{a**}$	$1{,}105 \pm 0{,}062^{a**}$	$0{,}954 \pm 0{,}321^{a*}$
T7	$1{,}239 \pm 0{,}221^{a*}$	$1{,}135 \pm 0{,}012^{a**}$	$1{,}131 \pm 0{,}143^{a*}$
T8	$1{,}103 \pm 0{,}075^{a**}$	$1{,}128 \pm 0{,}070^{a**}$	$0{,}984 \pm 0{,}038^{a*}$

Datos en una misma fila con diferente letra son significativos (Scheffé 95%)
Datos en una misma columna con diferente cantidad de (*) son significativos

4.2.2. <u>Cuantificación de la actividad fenoloxidasa (PO)</u>

Debido al número reducido de camarones supervivientes no fue posible realizar la última cuantificación de la actividad fenoloxidasa (360 h). Se decidió utilizar la limitada cantidad de hemolinfa extraída de los supervivientes en las cuatro pruebas restantes. El análisis de varianza no detectó diferencias significativas entre ninguno de los tratamientos (Tabla 6).

Tabla 6: Actividad PO (D.O) de juveniles de *L. vannamei* desafiados con el WSSV

Tratamientos	Período de muestreo	
	0 h	24 h
T1	0,209 ± 0,059	0,137 ± 0,095
T2	0,268 ± 0,069	0,282 ± 0,107
T3	0,255 ± 0,070	0,206 ± 0,047
T4	0,156 ± 0,027	0,253 ± 0,042
T5	0,198 ± 0,096	0,157 ± 0,021
T6	0,195 ± 0,146	0,270 ± 0,092
T7	0,307 ± 0,116	0,232 ± 0,049
T8	0,372 ± 0,036	0,213 ± 0,088

4.2.3. Cuantificación de proteínas plasmáticas (PP)

El análisis de varianza de medidas repetidas detectó diferencias significativas para la interacción probióticos-β-glucanos ($p = 0{,}03$). Cuando se aplicaron probióticos la concentración de PP aumentó con la inmunoestimulación tardía (15 días preinfección) ($p = 0{,}03$) y disminuyó con la inmunoestimulación temprana (ZoeaII) media (PL12) y sin inmunoestimulación ($p = 0{,}03$) (Fig. 3).

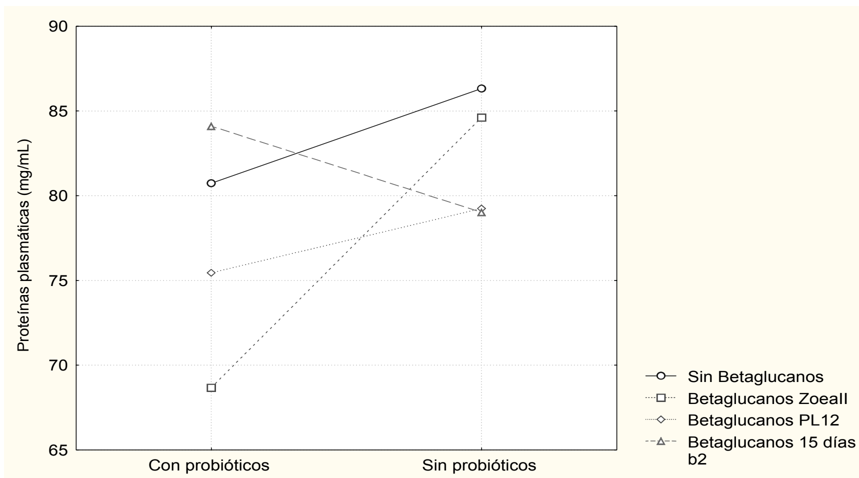

Figura 3: Efecto de la interacción probióticos-β-glucanos en la concentración de PP de juveniles de *L. vannamei* desafiados con el WSSV.

Durante el período inicial (0 h) la concentración de PP no fue significativamente diferente entre los tratamientos. En respuesta a la infección (24 h) los tratamientos sin probióticos incrementaron significativamente la concentración de PP comparado con los tratamientos que utilizaron probióticos ($p< 0{,}01$). En este mismo período el tratamiento con probióticos T4 (15 días pre infección) también incrementó significativamente la concentración de PP ($p < 0{,}01$) este resultado demostró que la aplicación de β-glucanos en etapa tardía pudo contrarrestar el efecto negativo de disminución de PP provocado por los probióticos. En los supervivientes (360 h) los tratamientos con probióticos recuperaron significativamente la concentración de PP ($p < 0,01$), aunque la mayor concentración se registró en el T5 (sin probióticos, sin β-glucanos) ($p = 0,03$) (Tabla 7).

Tabla 7: Concentración de PP (mg/mL) de juveniles de L. vannamei desafiados con el WSSV

Tratamientos	Período de muestreo		
	0 h	24 h	360 h
T1	$76,2 \pm 16,3^{b*}$	$67,0 \pm 18,2^{a*}$	$95,0 \pm 16,9^{c*}$
T2	$88,9 \pm 27,4^{b*}$	$61,9 \pm 13,8^{a*}$	$89,7 \pm 17,0^{b*}$
T3	$76,0 \pm 26,8^{a*}$	$67,4 \pm 17,1^{a*}$	$71,6 \pm 28,8^{a*}$
T4	$65,5 \pm 16,9^{a*}$	$92,3 \pm 15,5^{b**}$	$92,0 \pm 23,1^{b*}$
T5	$67,9 \pm 13,4^{a*}$	$98,6 \pm 18,0^{b**}$	$117,4 \pm 19.9^{c**}$
T6	$75,5 \pm 19,0^{a*}$	$93,0 \pm 19,8^{b**}$	$91,9 \pm 21,5^{b*}$
T7	$84,4 \pm 15,7^{a*}$	$84,4 \pm 19,9^{a**}$	$81,5 \pm 22,4^{a*}$
T8	$71,2 \pm 14,4^{a*}$	$88,3 \pm 17,7^{b**}$	$83,7 \pm 11,4^{b*}$

Datos en una misma fila con diferente letra son significativos (Scheffé 95%)
Datos en una misma columna con diferente cantidad de (*) son significativos

4.2.4. <u>Cuantificación de la actividad antibacteriana del plasma (AA)</u>

El análisis de varianza de medidas repetidas detectó diferencias significativas para la interacción probióticos-β-glucanos ($p < 0,01$). Cuando se aplicaron probióticos la AA disminuyó con la inmunoestimulación tardía (15 días preinfección) ($p < 0,01$) y aumentó con la inmunoestimulación temprana (ZoeaII), media (PL12) y sin inmunoestimulación ($p < 0,01$) (Fig. 4).

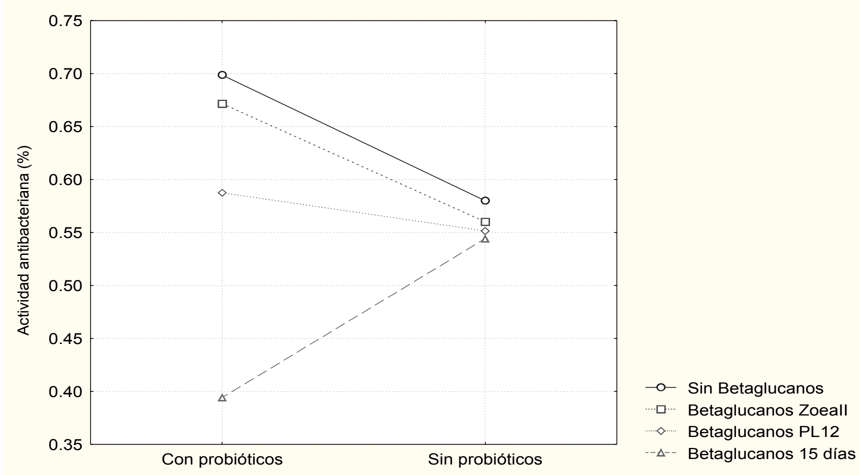

Figura 4: Efecto de la interacción probióticos-β-glucanos en el porcentaje de AA de juveniles de *L. vannamei* desafiados con el WSSV.

La AA durante el período 0 h post infección fue significativamente menor en los tratamientos con probióticos e inmunoestimulación en etapa temprana (ZoeaII) y etapa media (PL12) ($p < 0,01$). En respuesta a la infección (24 h) hubo un incremento significativo de la AA en todos los tratamientos ($p < 0,01$) observándose los más altos porcentajes de inhibición bacteriana en los tratamientos con probióticos T1(sin β-glucanos), T2 (ZoeaII) y sin probióticos T6 (ZoeaII) ($p < 0,01$). La actividad antibacteriana durante el período 360 h aumentó en el tratamientos con probióticos T3 (PL12) ($p < 0,01$) y disminuyó los tratamientos sin probióticos T6 (ZoeaII) y T7 (PL12) ($p < 0,01$) los tratamientos restantes no presentaron variaciones significativas (Tabla 8).

Tabla 8: Actividad antibacteriana del plasma (%) de juveniles de *L. vannamei* desafiados con el WSSV

Tratamientos	Período de muestreo		
	0 h	24 h	360 h
T1	0,410 ± 0,241[a***]	0,921 ± 0,089[b**]	0,847 ± 0,122[b**]
T2	0,090 ± 0,120[a*]	0,921 ± 0,114[b**]	0,952 ± 0,055[b***]
T3	0,088 ± 0,142[a*]	0,764 ± 0,146[b*]	0,985 ± 0,018[c***]
T4	0,178 ± 0,151[a**]	0,574 ± 0,201[b*]	0,581 ± 0,186[b*]
T5	0,329 ± 0,256[a***]	0,650 ± 0,141[b*]	0,784 ± 0,140[b**]
T6	0,197 ± 0,255[a**]	0,915 ± 0,105[b**]	0,606 ± 0,161[c*]
T7	0,280 ± 0,173[a***]	0,769 ± 0,158[b*]	0,581 ± 0,168[c*]
T8	0,238 ± 0,219[a**]	0,745 ± 0,165[b*]	0,784 ± 0,069[b**]

Datos en una misma fila con diferente letra son significativos (Scheffé 95%)
Datos en una misma columna con diferente cantidad de (*) son significativos

4.2.5. Número total de hemocitos (NTH)

El análisis de varianza de medidas repetidas detectó diferencias significativas para la interacción probióticos-β-glucanos ($p < 0,01$). Con probióticos el NTH no varió cuando la inmunoestimulación fue temprana (ZoeaII) e incrementó con la inmunoestimulación media (PL12), tardía (15 días preinfección) y sin inmunoestimulación ($p < 0,01$) (Fig. 5).

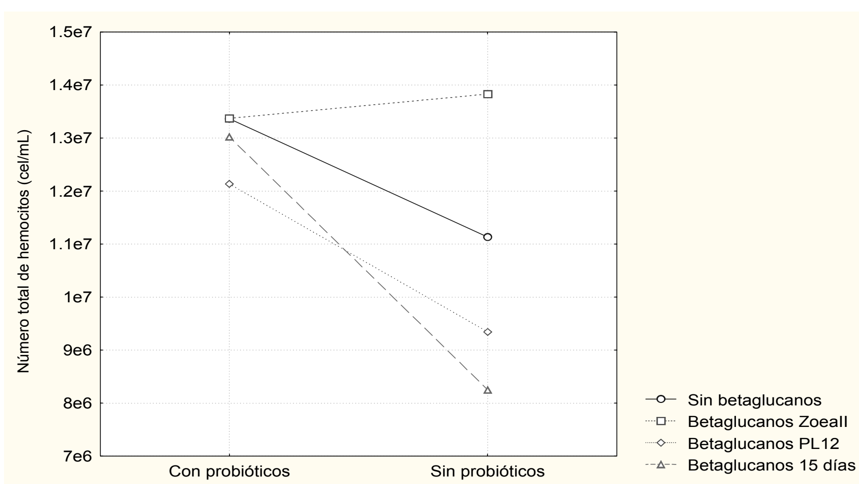

Figura 5: Efecto de la interacción probióticos-β-glucanos en el NTH de juveniles de *L. vannamei* desafiados con el WSSV.

El análisis de los hemocitos totales en el tiempo reveló que al inicio del experimento (0 h) el NTH fue mayor en los tratamientos que no recibieron probióticos ($p < 0,01$). En respuesta a la infección (24 h) hubo un incremento significativo del NTH en los tratamientos que utilizaron probióticos ($p<0,01$) a excepción del T4 (15 días pre infección) y una disminución en los tratamientos que no utilizaron probióticos ($p < 0,01$) el T6 (ZoeaII) fue el único tratamiento sin probióticos que no perdió de manera significativa hemocitos a las 24 h. Para este período los valores más altos de hemocitos totales se produjeron en los tratamientos con probióticos T1 (sin β-glucanos), T2 (ZoeaII), ($p = 0,02$). Los supervivientes (360 h) incrementaron significativamente el NTH sin importar el tipo de inmunoestimulación recibida ($p = 0,02$). aunque en los tratamientos sin probióticos T7 (PL12) y T8 (15 días pre infección) este incremento fue menor comparado con los demás tratamientos ($p = 0,02$) (Tabla 9).

Tabla 9: Número total de hemocitos (10^6 cel/mL) de juveniles de *L. vannamei* desafiados con el WSSV

Tratamientos	Período de muestreo		
	0 h	24 h	360 h
T1	$7,03 \pm 3,10^{a*}$	$13,54 \pm 6,45^{b**}$	$16,62 \pm 7,82^{c**}$
T2	$5,85 \pm 2,07^{a*}$	$12,41 \pm 6,11^{b**}$	$20,23 \pm 8,39^{c***}$
T3	$6,37 \pm 1,87^{a*}$	$10,09 \pm 5,05^{b**}$	$23,13 \pm 2,70^{c***}$
T4	$10,92 \pm 3,12^{b**}$	$6,55 \pm 2,82^{a*}$	$19,67 \pm 7,49^{c***}$
T5	$9,45 \pm 3,76^{b**}$	$7,25 \pm 2,67^{a**}$	$16,40 \pm 7,86^{c*}$
T6	$11,33 \pm 4,10^{a**}$	$10,02 \pm 5,23^{a**}$	$16,88 \pm 3,05^{b**}$
T7	$11,14 \pm 4,25^{b**}$	$5,11 \pm 2,49^{a*}$	$14,16 \pm 4,98^{c**}$
T8	$8,51 \pm 3,69^{b*}$	$6,66 \pm 3,67^{a*}$	$11,20 \pm 4,32^{c*}$

Datos en una misma fila con diferente letra son significativos (Scheffé 95%)
Datos en una misma columna con diferente cantidad de (*) son significativos

4.2.6. Conteo diferencial de hemocitos granulosos (G)

El análisis de varianza de medidas repetidas detectó diferencias significativas para la interacción probióticos-β-glucanos ($p = 0,01$). Cuando se aplicaron probióticos el número de hemocitos granulosos aumentó con la inmunoestimulación media (PL12), tardía (15 días preinfección) y sin inmunoestimulación ($p < 0,1$). La inmunoestimulación temprana no presentó variaciones significativas (Fig. 6).

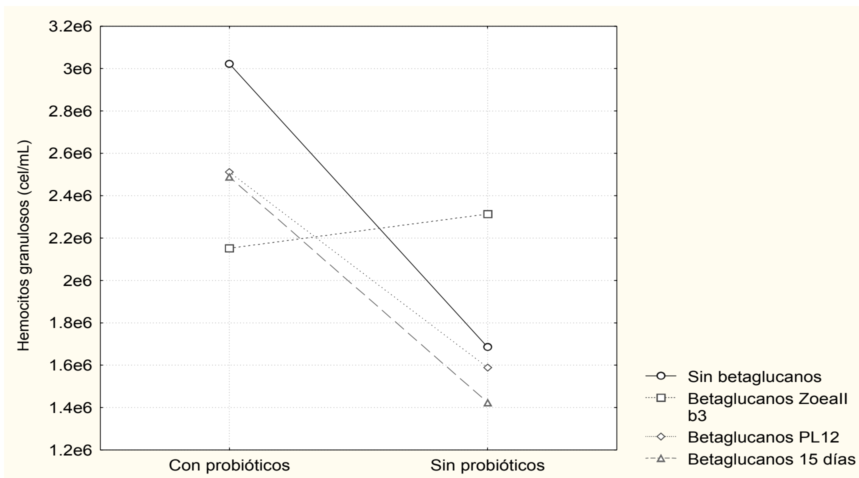

Figura 6: Efecto de la interacción probióticos-β-glucanos en el número de hemocitos granuloso de juveniles de *L. vannamei* desafiados con el WSSV.

No hubo diferencias significativas en el número de hemocitos granulosos al inicio del experimento (0 h). En respuesta a la infección (24 h) los tratamientos que recibieron probióticos presentaron un aumento significativo en el número de hemocitos granulosos ($p = 0,02$) excepto el tratamiento con probióticos T4 (15 días pre infección). Los supervivientes (360 h) aumentaron la cantidad de hemocitos granulosos en los tratamientos sin probióticos ($p = 0,02$) mientras que en los tratamientos con probióticos el aumento fue significativo sólo para los tratamientos T3 (ZoeaII) y tardía T4 (15 días pre infección) ($p = 0,02$) (Tabla 10).

Tabla 10: Número de hemocitos granulosos (10^6 cel/mL) de juveniles de *L. vannamei* desafiados con el WSSV

Tratamientos	Período de muestreo		
	0 h	24 h	360 h
T1	$1,61 \pm 0,84^{a*}$	$2,84 \pm 3,09^{b**}$	$2,15 \pm 1,74^{b*}$
T2	$1,28 \pm 0,75^{a*}$	$2,21 \pm 2,13^{b**}$	$2,17 \pm 1,41^{b*}$
T3	$1,00 \pm 0,46^{a*}$	$2,09 \pm 1,32^{b**}$	$3,67 \pm 0,81^{c**}$
T4	$1,77 \pm 0,83^{b*}$	$1,01 \pm 0,64^{a*}$	$4,20 \pm 2,50^{c**}$
T5	$1,11 \pm 0,75^{a*}$	$0,95 \pm 0,46^{a*}$	$2,81 \pm 1,90^{b*}$
T6	$1,39 \pm 1,03^{a*}$	$1,78 \pm 1,42^{a*}$	$2,54 \pm 1,24^{b*}$
T7	$1,94 \pm 1,26^{b*}$	$0,77 \pm 0,46^{a*}$	$2,40 \pm 0,67^{b*}$
T8	$1,24 \pm 0,77^{a*}$	$1,44 \pm 1,23^{a*}$	$1,44 \pm 0,83^{a*}$

Datos en una misma fila con diferente letra son significativos (Scheffé 95%)
Datos en una misma columna con diferente cantidad de (*) son significativos

4.2.7. Conteo diferencial de hemocitos semigranulosos (SG)

El análisis de varianza detectó diferencias significativas para la interacción probióticos-β-glucanos ($p < 0,01$). Con la aplicación de probióticos el número de hemocitos semigranulosos aumentó con la inmunoestimulación tardía (15 días preinfección) ($p < 0,01$). Sin variaciones con inmunoestimulación temprana (ZoeaII), media (PL12) y sin inmunoestimulación (Fig. 7).

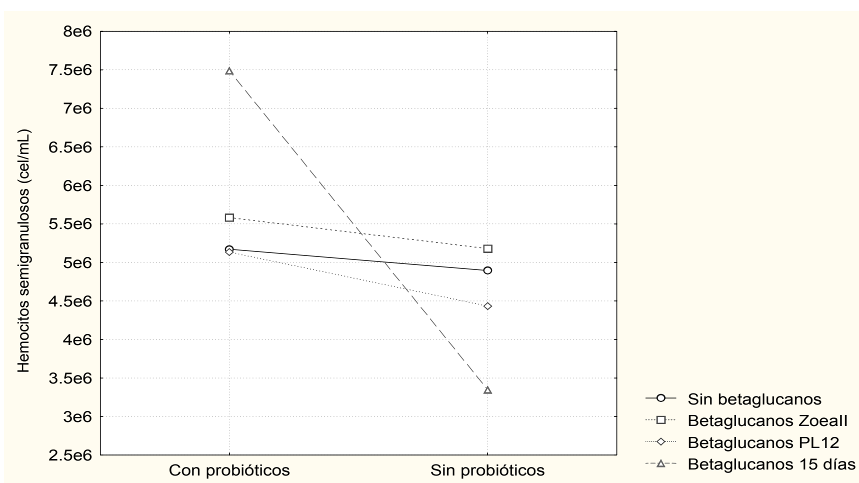

Figura 7: Efecto de la interacción probióticos-β-glucanos en el número de hemocitos semigranulosos de juveniles de *L. vannamei* desafiados con el WSSV.

El número de hemocitos semigranulosos durante el período inicial (0 h) fue mayor en el tratamiento sin probióticos T7 (PL12) ($p = 0,02$). En respuesta a la infección (24 h) hubo un aumento del número de hemocitos semigranulosos en los tratamientos que recibieron probióticos ($p < 0,01$), excepto el T4 (15 días pre infección), los tratamientos que no recibieron probióticos experimentaron un descenso del número de hemocitos semigranulosos ($p < 0,01$). Los supervivientes (360 h) incrementaron de forma significativa ($p < 0,01$) la producción de hemocitos semigranulosos, los tratamientos con mayor número de hemocitos fueron aquellos que recibieron inmunoestimulación tardía (15 días pre infección) con probióticos (T4) y sin probióticos (T8) ($p < 0,01$) (Tabla 11).

Tabla 11: Número de hemocitos semigranulosos (10^6 cel/mL) de juveniles de *L. vannamei* desafiados con el WSSV

Tratamientos	Período de muestreo		
	0 h	24 h	360 h
T1	$2,13 \pm 1,46^{a*}$	$7,05 \pm 3,68^{b**}$	$5,37 \pm 3,65^{b*}$
T2	$2,60 \pm 1,21^{a*}$	$6,67 \pm 4,00^{b**}$	$5,68 \pm 3,40^{b*}$
T3	$2,77 \pm 1,19^{a*}$	$4,93 \pm 3,80^{b*}$	$11,13 \pm 6,49^{c**}$
T4	$5,73 \pm 2,46^{b*}$	$3,06 \pm 1,66^{a*}$	$11,60 \pm 5,60^{c**}$
T5	$4,81 \pm 2,52^{b*}$	$3,27 \pm 1,67^{a*}$	$6,17 \pm 4,09^{c*}$
T6	$3,72 \pm 2,68^{a*}$	$4,31 \pm 2,48^{b*}$	$6,43 \pm 3,40^{c*}$
T7	$6,80 \pm 3,76^{b*}$	$2,33 \pm 1,19^{a*}$	$6,30 \pm 3,39^{b*}$
T8	$3,67 \pm 2,42^{a*}$	$2,84 \pm 2,05^{a*}$	$4,53 \pm 1,99^{b*}$

Datos en una misma fila con diferente letra son significativos (Scheffé 95%)
Datos en una misma columna con diferente cantidad de (*) son significativos

4.2.8. <u>Conteo diferencial de hemocitos hialinos (Hi)</u>

El análisis de varianza de medidas repetidas no encontró diferencias significativas para la interacción probióticos-β-glucanos.

El número de hemocitos hialinos en el período 0 h post infección fue mayor en el tratamiento sin probióticos (T6) (ZoeaII) ($p = 0,02$). En respuesta a la infección (24 h) no se presentaron incrementos significativos. El T6 (ZoeaII) perdió hemocitos hialinos. Los supervivientes (360 h) presentaron un alto número de hemocitos hialinos en todos los tratamientos ($p < 0,01$) (Tabla 12).

Tabla 12: Número de hemocitos hialinos (10^6 cel/mL) de juveniles de *L. vannamei* desafiados con el WSSV

Tratamientos	Período de muestreo		
	0 h	24 h	360 h
T1	$2,04 \pm 1,42^{a*}$	$3,56 \pm 2,19^{a**}$	$9,02 \pm 3,30^{c**}$
T2	$1,75 \pm 1,20^{a*}$	$3,51 \pm 2,31^{b**}$	$12,26 \pm 4,47^{c***}$
T3	$2,56 \pm 1,00^{a*}$	$3,06 \pm 1,14^{a**}$	$8,33 \pm 4,27^{b**}$
T4	$3,33 \pm 1,72^{a*}$	$2,01 \pm 1,04^{a*}$	$3,87 \pm 0,23^{a*}$
T5	$3,47 \pm 1,53^{a*}$	$2,71 \pm 1,80^{a**}$	$7,34 \pm 4,44^{b**}$
T6	$6,11 \pm 3,02^{a*}$	$3,48 \pm 1,95^{a**}$	$7,80 \pm 3,23^{c**}$
T7	$2,37 \pm 1,58^{a*}$	$1,87 \pm 1,82^{a*}$	$5,47 \pm 2,98^{b*}$
T8	$3,33 \pm 1,70^{a*}$	$2,11 \pm 1,28^{a*}$	$5,10 \pm 4,12^{b*}$

Datos en una misma fila con diferente letra son significativos (Scheffé 95%)
Datos en una misma columna con diferente cantidad de (*) son significativos

4.2.9. <u>Conteo diferencial de hemocitos amorfos (Am)</u>

El análisis de varianza de medidas repetidas detectó diferencias significativas para la interacción probióticos-β-glucanos ($p = 0,02$). Cuando se aplicaron probióticos el número de hemocitos amorfos aumentó en los animales sin inmunoestimulación ($p = 0,02$), disminuyendo en los animales que recibieron inmunoestimulaciones temprana (ZoeaII), media (PL12) y tardía (15 días preinfección) ($p = 0,02$) (Fig. 8).

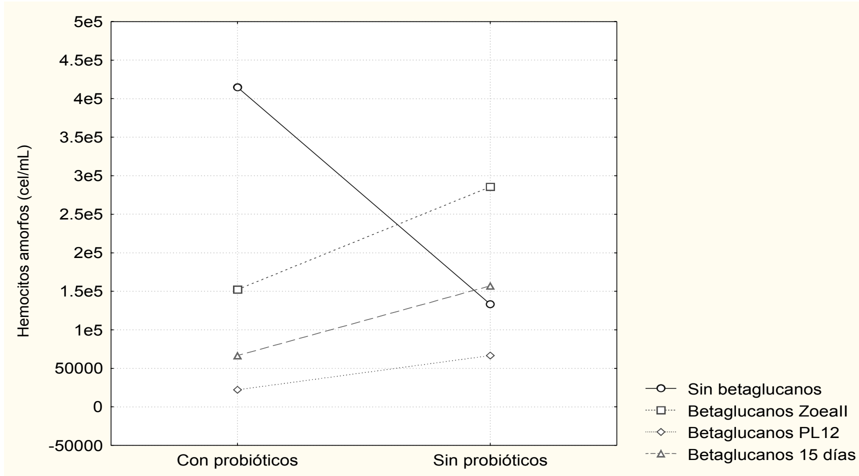

Figura 8: Efecto de la interacción probióticos-β-glucanos en el número de hemocitos amorfos de juveniles de *L. vannamei* desafiados con el WSSV.

La mayor cantidad de hemocitos amorfos en el período inicial (0 h) se registró en el tratamiento con probióticos sin β-glucanos (T1) ($p < 0,01$). La respuesta a la infección (24 h) fue de un incremento en el número de hemocitos amorfos para los tratamientos sin probióticos ($p = 0,02$) y una disminución en los tratamientos con probióticos ($p = 0,02$). Exceptuando el incremento significativo del tratamiento con probióticos T2 (ZoeaII) los supervivientes (360 h) de los demás tratamientos disminuyeron significativamente el número de hemocitos. El menor número de hemocitos amorfos se observó en los animales de inmunoestimulación media (PL12) con probióticos (T3) y sin probióticos (T7) y en el tratamiento con probióticos T4 (15 días post infección) (Tabla 13).

Tabla 13 Hemocitos amorfos (10^6 cel/mL) de juveniles de *L. vannamei* desafiados con el WSSV

Tratamientos	Período de muestreo		
	0 h	24 h	360 h
T1	$1,25 \pm 0,85^{b***}$	$0,09 \pm 0,29^{a*}$	$0,07 \pm 0,10^{a*}$
T2	$0,22 \pm 0,22^{b**}$	$0,01 \pm 0,51^{a*}$	$0,11 \pm 0,23^{b*}$
T3	$0,05 \pm 0,11^{a*}$	$0,01 \pm 0,04^{a*}$	0^{a*}
T4	$0,93 \pm 0,21^{c***}$	$0,41 \pm 0,41^{b**}$	0^{a*}
T5	$0,05 \pm 0,13^{a*}$	$0,32 \pm 0,25^{b**}$	$0,07 \pm 0,27^{a*}$
T6	$0,11 \pm 0,19^{a**}$	$0,45 \pm 0,43^{b**}$	$0,11 \pm 0,23^{a*}$
T7	$0,27 \pm 0,11^{c**}$	$0,14 \pm 0,17^{b*}$	0^{a**}
T8	$0,27 \pm 0,28^{a**}$	$0,27 \pm 0,35^{a**}$	$0,16 \pm 0,22^{a*}$

Datos en una misma fila con diferente letra son significativos (Scheffé 95%)
Datos en una misma columna con diferente cantidad de (*) son significativos

4.2.10. <u>Índices inmunitarios</u>

El análisis de varianza de medidas repetidas detectó diferencias significativas para la interacción probióticos-β-glucanos ($p < 0,01$). La adición de los probióticos incrementó los índices inmunitarios cuando la inmunoestimulación se realizó en etapa media (PL12), tardía (15 días preinfección) y sin inmunoestimulación ($p < 0,01$), no se encontraron variaciones significativas con la inmunoestimulación temprana (ZoeaII) (Fig. 9).

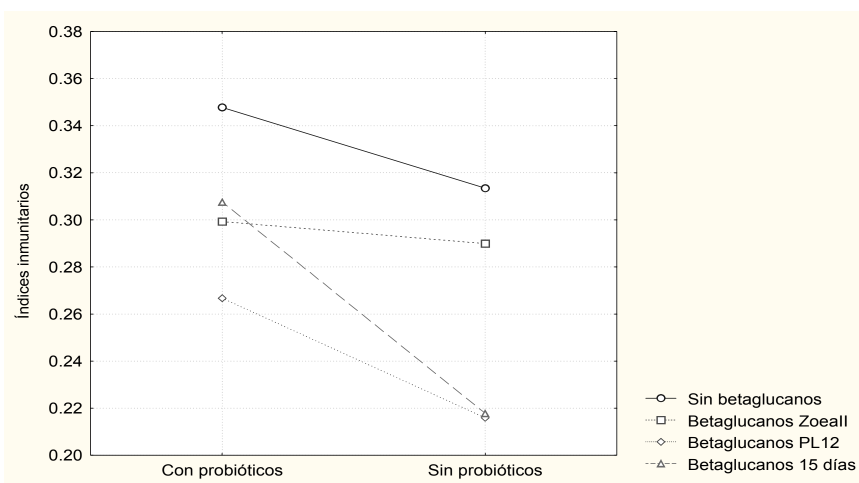

Figura 9: Efecto de la interacción probióticos-β-glucanos sobre el índice inmunitario de juveniles de *L. vannamei* desafiados con el WSSV.

Durante el período 0 h post infección los menores índices inmunitarios se registraron en los tratamientos con probióticos e inmunoestimulación media T3 (PL12) e inmunoestimulación tardía sin probióticos (T8) (15 días pre infección) ($p = 0,02$). La respuesta a la infección (24 h) estuvo caracterizada por un aumento significativo en los índices inmunitarios, los mayores valores se registraron en los tratamientos con probióticos T1 (sin β-glucanos), y los dos tratamientos de inmunoestimulación temprana con probióticos T2 (ZoeaII) y sin probióticos T6 (ZoeaII) ($p = 0,01$). Los índices se mantuvieron altos al final del ensayo (360 h), entre los supervivientes, los mayores índices se presentaron en los tratamientos con probióticos (T1, T2, T3, T4) y el tratamiento sin probióticos T5 (sin β-glucanos) ($p < 0,01$) (Tabla 14).

Tabla 14 Índices inmunitarios de juveniles de *L. vannamei* desafiados con el WSSV

Tratamientos	Período de muestreo		
	0 h	24 h	360 h
T1	$0,21 \pm 0,06^{a**}$	$0,36 \pm 0,08^{b**}$	$0,38 \pm 0,09^{b**}$
T2	$0,16 \pm 0,05^{a*}$	$0,35 \pm 0,06^{b**}$	$0,39 \pm 0,04^{b**}$
T3	$0,14 \pm 0,05^{a*}$	$0,27 \pm 0,06^{b*}$	$0,43 \pm 0,06^{c**}$
T4	$0,20 \pm 0,04^{a**}$	$0,23 \pm 0,05^{a*}$	$0,45 \pm 0,04^{b**}$
T5	$0,21 \pm 0,06^{a**}$	$0,28 \pm 0,05^{b*}$	$0,42 \pm 0,08^{c**}$
T6	$0,17 \pm 0,06^{a*}$	$0,32 \pm 0,08^{b**}$	$0,30 \pm 0,04^{b*}$
T7	$0,20 \pm 0,07^{a**}$	$0,27 \pm 0,05^{b*}$	$0,28 \pm 0,05^{b*}$
T8	$0,13 \pm 0,06^{a1}$	$0,28 \pm 0,05^{b1}$	$0,29 \pm 0,04^{b*}$

Datos en una misma fila con diferente letra son significativos (Scheffé 95%)
Datos en una misma columna con diferente cantidad de (*) son significativos

5. DISCUSIÓN

5.1. ANÁLISIS DE LA SUPERVIVENCIA DE LAS POST LARVAS DESAFIADAS CON EL WSSV

En la hipótesis de trabajo se postuló que los animales inmunoestimulados con probióticos y β-glucanos en etapas tempranas (ZoeaII) y media (PL12), estaban mejor preparados para enfrentar desafíos virales que los animales inmunoestimulados 15 días pre desafío o no inmunoestimulados y por ende deberían tener mejores supervivencias.

El análisis de la supervivencia por el método Kaplan-Meier no detectó diferencias significativas entre los tratamientos. Las primeras mortalidades se observaron a las 12 h post infección, registrándose una mortalidad acumulada del 50% a las 36 h. Se considera que hubo una reacción viral muy fuerte durante este período ya que generalmente en los experimentos de laboratorio utilizando el WSSV las mortalidades inician entre las 24 a 48 h post infección (Chou *et al.,* 1995; Lightner *et al.,* 1998). Los resultados de los análisis de PCR anidado (datos no presentados) detectaron una alta carga viral, con índices de infección de 3 (en escala de 0 a 3) confirmando un fuerte proceso de replicación del virus. Al respecto Chou *et al*. (1998) sostienen que el WSSV tiene su pico de replicación en el período 24 a 48 h post infección, y es capaz de infectar la totalidad de los órganos diana (Chang *et al.,* 1996). Aunque los resultados del PCR demostraron la fuerte actividad de replicación viral, este hecho por sí solo no es suficiente para justificar la pérdida tan prematura del 50% de la población. Se considera que hubo otros factores que ayudaron a maximizar el proceso infeccioso y por ende aumentar las mortalidades, a continuación se discuten los más relevantes.

El método de infección utilizado que consistió en la administración de papilla provenientes de animales infectados con el WSSV. Aunque existen diversos métodos de infección tales como inmersión en agua conteniendo extracto viral (Chou *et al.,*1998) ó por inyección de tejido infectado (Chang *et al*., 2003), se escogió el método de papilla ó macerado (Lightner *et al.,* 1998) porque es la ruta dominante de infección una vez que la epidemia ha comenzado en los estanques (Lotz y Soto, 2002). La desventaja de este método es que no se puede controlar la carga viral ya que se administra el tejido infectado directamente (Soto *et al.,* 2001) en contraste con los métodos de inmersión ó inyección en donde la carga viral puede ser manipulada (Chou *et al.,* 1998; Vidal *et al.,* 2001; Echeverría *et al.*, 2002), e incluso disminuida (Chang *et al.,* 1999). Otro factor que incidió en la mortalidad del presente ensayo fue el canibalismo el cual se observó durante todo el desafío pese al esfuerzo por retirar los cadáveres en cada muestreo. El consumo de los animales muertos implicó una maximización del proceso infeccioso y una mayor diseminación del virus vía reinfección. Este efecto aditivo de cohabitación y canibalismo se ha reportado también en experimentos realizados con *Macrobrachium rosembergii* desafiados con el WSSV, encontrándose un aumento significativo en el canibalismo y la tasa de mortalidad debido a la presencia de animales muertos (Pramod-Kiran *et al.*, 2002).

Para evaluar los efectos de la inmunoestimulación, mediante el ANOVA de medidas repetidas, se dividió el ensayo en tres períodos. El primer período 0-52 h correspondió a la fase inicial y de máxima replicación del virus, durante este período el camarón es más sensible a la infección (Chou *et al*., 1995). Se observó una mayor supervivencia en los tratamientos que recibieron probióticos (38%) comparada con los tratamientos que no recibieron probióticos (33%). Durante este ensayo sólo se observó la mortalidad y no se midieron otros parámetros inmunitarios, sin embargo podría suponerse que la mayor supervivencia observada en este período estaría relacionada con un aumento de la respuesta inmunitaria de los animales que recibieron probióticos (Rengpipat *et al*., 2000; Gullian, 2001) en especial a una mayor actividad de los hemocitos hialinos los que no son infectados por el WSSV (Wang *et al.*, 2002) y pudieron estar comprometidos en procesos de fagocitosis, encapsulación ó nodulación de partículas virales justo al inicio de la infección como una respuesta celular inmediata (Montesdeoca, 2001).

Durante el período 56 a 156 h el cual está caracterizado como un período de infección aguda (Lotz y Soto, 2002) la mortalidad aumentó y el efecto probiótico dejó de ser significativo. En esta etapa las combinaciones sin probióticos y β-glucanos en ZoeaII y PL12 presentaron las mayores supervivencias. Una explicación sería que la alerta inmunitaria inicial en los tratamientos con probióticos y β-glucanos no pudo sostenerse por mucho tiempo debido a su alto costo energético (Sánchez *et. al.*, 2001). Otra explicación sería que la carga viral se haya visto favorecida por las altas densidades a las que se realizaron los ensayos, por los procesos de reinfección debidos al canibalismo o por la concentración viral de la papilla misma, todos estos factores pudieron haber aumentado tanto la carga viral que finalmente superó la capacidad inmunitaria del hospedero (Lightner *et al*., 1998).

En la tercera fase, durante el período 164 – 292 h post infección, la mortalidad disminuyó y finalmente se estabilizó a las 188 h, las supervivencias finales no fueron significativamente diferentes y variaron entre un 9 a 17%.

En términos generales hay muy pocos camarones supervivientes en desafíos de laboratorio con el WSSV (Lotz y Soto, 2002). Al respecto Chou *et al*. (1995); Lightner *et al*. (1998) reportan supervivencias finales entre 0 y 2,9 % en desafíos virales utilizando 3% de biomasa de camarones infectados con el WSSV en un período de 12 días. Resultados similares de bajas supervivencias finales (12 %) son reportados en desafíos de 15 días de duración utilizando postlarvas (PL 15) de *P. monodon* desafiadas con el WSSV e inmunoestimuladas con dosis de β-glucanos de 2 g/Kg de alimento (Chang *et al.*, 1999)

5.2 ANÁLISIS DE LA RESPUESTA INMUNITARIA DE LOS JUVENILES DESAFIADOS CON EL WSSV

En la hipótesis de trabajo se postuló que los animales inmunoestimulados con probióticos y β-glucanos en etapas tempranas (ZoeaII) y media (PL12), presentarían mejores parámetros inmunitarios para enfrentar desafíos virales, que los animales inmunoestimulados 15 días pre desafío o no inmunoestimulados.

Las tasas de producción de O_2^- fluctuaron desde un mínimo de 0,801 a un máximo de 1,359 (Tabla 3) estos valores se ubican dentro del rango aceptable de respuesta inmune inicial de camarones estimulados con β-glucanos (Chang *et al.*, 2003). El análisis de varianza detectó diferencias significativas de mayor producción de O_2^- cuando se utilizaron probióticos. Las producciones iniciales fluctuaron entre 1,025 a 1,359 esta respuesta a la inmunoestimulación es comparables con los resultados reportados por Muñoz *et al*. (2000); Song y Hsieh, (1994); Chang *et al.* (2003). Durante el período de 24 h (respuesta a la infección) las tasas no fueron significativamente diferentes sin embargo disminuyeron al final del experimento, esta reducción podría atribuirse a la acción de los mecanismos de defensa antioxidante (Anderson, 1996). Aunque el O_2^- se produce en las vacuolas fagocíticas, una importante cantidad puede traspasar al ambiente extravacuolar y extracelular causando daños en las células.(Campa-Córdoba *et al*., 2002). Los mecanismos de defensa antioxidantes tienen la función de proteger a las células de los daños causados por estos compuestos a través de la reducción del anión superóxido a peróxido de hidrógeno, mediante la acción de la superóxido dismutasa (SOD), el peróxido de hidrógeno luego de cruzar la membrana es removido por la acción de catalasas y la glutatión peroxidasa (Anderson, 1996). Este mecanismo de protección ha sido reportado por Campa-Córdova *et al*. (2002) quienes obtuvieron producciones de superóxido dismutasa (SOD) 1,5 veces mayores que el control cuando aplicaron β-glucanos oralmente a juveniles de *L. vannamei*.

El incremento de la producción de O_2^- al inicio del experimento y como respuesta a la infección con el WSS sugiere que el choque respiratorio podría ser un importante mecanismo antiviral que involucraría la participación de los hemocitos hialinos circulantes encargados de encapsular las partículas virales eliminándolas dentro de la cápsula por medio de la liberación de O_2^- (Holmblad y Söderhäll, 1999) ó por hemocitos hialinos infiltrados en el órgano linfoide capaces de encapsular y fagocitar partículas virales (Montesdeoca *et al*., 2002).

La cuantificación de la actividad fenoloxidasa no mostró diferencias significativas entre los tratamientos. Los valores encontrados al inicio del experimento fluctuaron desde un mínimo de 0,156 a un máximo de 0,372 D.O estos valores fueron considerados bajos ya que en experimentos similares utilizando *P. monodon* estimulado con β-glucanos y desafiado con el WSS los valores de PO reportados se ubicaron entre 0,8 y 1,4 D.O (Chang *et al.,* 2003). Estos mismos autores señalan que los resultados de la PO 24 h post infección disminuyeron significativamente a valores menores de 0,5 D.O. Esta disminución en la actividad PO en respuesta a la infección con el WSSV reportada por Chang *et al.* (2003) junto con los bajos niveles encontrados en el presente experimento son coincidente con el hecho que el WSSV infecta tanto los hemocitos granulosos como a los semigranulosos (Wang *et al.,* 2002) que son las células que contienen las enzimas necesarias para la activación del sistema PO (Söderhäll y Cerenius, 1992), ó por el hecho que no hubo una activación del sistema proPO para producir melanina durante la encapsulación de las partículas virales (Montesdeoca *et al.*, 2002).

En el presente estudio las proteínas plasmáticas fluctuaron desde 61,9 a 117,4 mg/mL. La respuesta a los inmunoestimulantes no fue significativamente diferente encontrándose que las concentraciones iniciales estuvieron por debajo los valores normales de 100 mg/mL (Cheng *et al.*, 2002). En respuesta a la infección los animales estimulado con probióticos y β-glucanos disminuyeron la concentración de proteínas, esta disminución pudo deberse a que parte de las proteínas hayan sido utilizadas en la activación del sistema profenoloxidasa. Adachi *et al.* (2003) encontraron que camarones estimulados con β-glucanos fueron capaces de convertir la hemocianina en una enzima capaz de activar el sistema proPO, de igual forma Vargas-Albores *et al.* (1996) demostraron que los β-glucanos fueron capaces de incentivar la producción de BGBP una proteína monomérica (100 kDa) de reconocimiento específica de β-glucanos capaz de incentivar la activación del sistema proPO. Por otra parte, al ser la hemocianina la mayor constituyente del plasma en camarones (90 a 95%) (Khayat *et al.,* 1995), la disminución de la concentración de las proteínas plasmáticas en respuesta a la infección pudo deberse a la utilización de ésta proteína para combatir la infección. Al respecto los estudios de Destoumieux *et al.* (2001) demostraron que los camarones enfrentados a desafíos microbianos son capaces de transformar la hemocianina en un péptido antimicrobiano.

La actividad antibacteriana del plasma en respuesta a la infección incrementó significativamente en todos los tratamientos observándose los más altos valores en los tratamientos con probióticos sin β-glucanos y los tratamientos con inmunoestimulación en ZoeaII con y sin uso de probióticos. Estos resultados indican que los camarones responden positivamente a la inmunoestimulación (Alabi, *et al*., 2000). Al comparar el nivel de actividad antibacteriana del plasma a las 24 h con la concentración de proteínas plasmáticas para este mismo período, se puede observar que cuando la actividad antibacteriana aumenta las proteínas plasmáticas disminuyen en los animales inmunoestimulados con probióticos. Estos datos suponen que la actividad antibacteriana del plasma se debe principalmente a la movilización de hemocianina la cual es convertida en péptido antimicrobiano (Destoumieux *et al.,* 2001).

Los hemocitos en los crustáceos juegan un papel preponderante en la respuesta inmune del hospedero (Anderson *et al*., 1992). Debido a su extraordinaria versatilidad en la respuesta inmune no específica, el conteo del número total de hemocitos (NTH) ha sido una prueba inmunitaria evaluada constantemente en la mayoría de los estudios de inmunoestimulación y desafíos virales con el WSSV (Jones, 1999; Chang *et al*., 2000; Wang *et al*., 2002; Yip y Wong, 2002; Chang *et al*., 2003; López *et al*., 2003).

Los resultados encontrados en el presente trabajo reflejaron un incremento promedio del NTH para los tratamientos con probióticos en respuesta al desafío ($10,64 \pm 3,11x10^6$ cel/mL) y en los supervivientes ($19,9 \pm 2,67x10^6$ cel/mL). Estos resultados difieren de los reportados por diversos autores quienes señalan una disminución del número total de hemocitos en animales inmunoestimulados con β-glucanos durante las 24 h. post infección con el WSSV (Smith y Söderhäll, 1983; Smith *et al*., 1984; van de Braak *et al*., 2002; Chang *et al*., 2003). Sin embargo los resultados obtenidos en el presente ensayo son coincidentes con los resultados encontrados por Maldonado (2003). Con la finalidad de dilucidar esta diferencia se analizaron los (NTH) agrupándolos en tratamientos sin probióticos-β-glucanos y tratamientos con probióticos-β-glucanos. Los resultados mostraron que los tratamientos sin probióticos perdieron hemocitos como respuesta a la infección, esta disminución de las poblaciones hemocitarias en respuesta a desafíos ha sido reportada por diversos autores (Smith y Söderhäll, 1983; Le Moullac *et al.,* 1998; Muñoz *et al.,* 2000). El ANOVA de medidas repetidas encontró un incremento significativo del NTH con las interacciones probióticos-β-glucanos permitiendo a los supervivientes tener muchos hemocitos capaces de migrar hacia los sitios en donde se presente la infección (van de Braak *et al*., 2002).

Los resultados antes descritos deben observarse con especial cuidado. Es importante recordar que los hemocitos comprenden tres grupos bien definidos y con funciones distintas las que actuando en forma concertada, imprimen mayor efectividad a la respuesta celular inmune no específica. Debido a esta versatilidad en sus funciones el análisis de los conteos diferenciales de hemocitos (CDH) se hace necesario para interpretar correctamente estos cambios.

Los hemocitos granulosos y semigranulosos siguieron el mismo comportamiento observado en el análisis de los NTH. Los tratamientos con probióticos-β-glucanos incrementaron su número en respuesta a la infección, mientras que los tratamientos sin probióticos-β-glucanos disminuyeron. El análisis estadístico confirmó los efectos positivos de incremento del número de hemocitos granulosos con la adición del probiótico. Resultados similares de aumento en el número de hemocitos se observaron en *P. monodon* estimulado con el probiótico *Bacillus* S11 y desafiado con *V. harveyi* en desafíos de 10 días de duración (Rengpipat *et al.,* 2000).

Al inicio del experimento el mayor número de hemocitos hialinos se observó en el tratamiento de inmunoestimulación temprana (ZoeaII) sin probióticos, en respuesta a la infección no hubo incrementos significativos y al final del experimento los supervivientes incrementaron significativamente el número de hemocitos hialinos. Estos resultados indicaron que para este ensayo en particular, los hemocitos hialinos no se vieron afectados por la infección ya que no proliferaron o disminuyeron a las 24 h post infección, su respuesta básicamente obedeció al efecto de inmunoestimulación. Al respecto las investigaciones hechas con *Penaeus merguiensis* infectado con el WSSV, demostraron que efectivamente los hemocitos hialinos no son infectados por el virus (Wang *et al*., 2002).

Los hemocitos amorfos se presentan siempre asociados a eventos de infección causados por el WSSV y sirven para propósitos prácticos ya que representan la evidencia física de destrucción celular por necrosis ó apoptosis (J. Rodríguez, comunicación personal, FUNDACIÓN CENAIM-ESPOL, Guayaquil, Ecuador). Los resultados del ensayo indicaron una baja cantidad de hemocitos amorfos en la mayoría de los tratamientos y una disminución significativa en el tiempo. La poca destrucción celular observada en este ensayo en particular podría atribuirse a que la presencia de los probióticos hayan contribuido a evitar un alto nivel de infección celular, ó que la presencia de los β-glucanos hayan hecho más reactivos a los hemocitos, ó que los probióticos o la combinación probióticos-β-glucanos hayan conferido mayor resistencia a los hemocitos, estas suposiciones necesitan ser confirmadas a través de nuevos ensayos que permitan demostrar con rigurosidad científica estas suposiciones.

Con el uso de probióticos los índices inmunitarios iniciales fueron más altos. Como respuesta a la infección (24 h) y en los supervivientes (360 h), los índices inmunitarios se incrementaron o no al menos no disminuyeron cuando se combinaron probióticos y β-glucanos.

Los resultados de la presente investigación demostraron que el uso de probióticos y β-glucanos generó una variedad de respuestas inmunes sobre los juveniles de *L. vannamei* desafiado con el WSSV. Los efectos del uso de probióticos se reflejaron en un aumento de la supervivencia de juveniles desafiados con WSSV durante las primeras 48 h post infección. Además en términos de parámetros inmunitarios, los probióticos incentivaron una mayor generación de anión superóxido, de igual manera aumentaron los índices inmunitarios y promovieron una mayor cantidad de hemocitos totales circulantes principalmente hemocitos granulosos y semigranulosos, los probióticos también aumentaron la actividad antibacteriana del plasma y disminuyeron la cantidad de proteínas plasmáticas. Los efectos de la aplicación de β-glucanos estuvieron en dependencia de la estrategia de inmunoestimulación. Los β-glucanos produjeron un efecto positivo en la supervivencia durante el período 56 – 156 h post infección, este efecto beneficioso se prolongó hasta las 188 h post infección, la aplicación de los β-glucanos en etapas de ZoeaII y PL12 disminuyeron la generación de anión superóxido en los supervivientes al desafío, los β-glucanos también aumentaron la concentración de proteínas plasmáticas en los tratamientos sin probióticos, de igual forma aumentaron la actividad antibacteriana del plasma aunque disminuyeron la producción de hemocitos hialinos en respuesta a la infección. Los β-glucanos aumentaron los índices inmunitarios de los tratamientos sin probióticos en respuesta a la infección, sin embargo no lograron aumentar los índices en los supervivientes en estos mismos tratamientos.

Si se utilizan los probióticos y β-glucanos combinados, la mejor estrategia en términos inmunitarios se consigue aplicando probióticos en la etapa de larvicultura e inmunoestimulando con β-glucanos 15 días pre desafío. Esta combinación aumentó la cantidad de proteínas plasmáticas (anulando el efecto negativo del probiótico), de igual manera esta combinación incrementó la generación de anión superóxido (contrarrestando el efecto negativo del β-glucano), esta combinación también incentivó la producción de hemocitos totales iniciales y finales, especialmente con hemocitos granulosos y semigranulosos. En ausencia de probióticos podría explorarse la aplicación de β-glucanos desde ZoeaII, ya que estos tratamientos de inmunoestimulación temprana mostraron una alta capacidad de reacción a las 24 h post infección y altas concentraciones de hemocitos hialinos al final del ensayo indicando una alta capacidad proliferativa del órgano hematopoyético (Johansson *et al.,* 2000; Muñoz *et al*., 2002).

6. CONCLUSIONES

- La supervivencia final de post-larvas de *L. vannamei* desafiadas con WSSV no se incrementó con el uso de probióticos y/ó β-glucanos.

- El ANOVA de medidas repetidas encontró que las supervivencias de los tratamientos que usaron probióticos incrementaron significativamente la supervivencia de post larvas de *L. vannamei* desafiadas con el WSSV durante el período 0 – 52 h post infección

- El ANOVA de medidas repetidas encontró que los β-glucanos tuvieron un efecto positivo en la supervivencia durante el período 56 – 156 h post infección, prolongándose hasta las 188 h post infección cuando los β-glucanos se administraron en etapas de ZoeaII y PL12.

- La utilización del probiótico *V. alginolyticus* (cepa ILI) en la larvicultura de *L. vannamei* tuvo un efecto benéfico de incremento en la respuesta inmune de los camarones desafiados con el WSSV.

- La estrategia de inmunoestimulación que presentó mayor beneficio en términos de incremento de la respuesta inmune en los camarones desafiados con el WSSV fue la combinación que utilizó probióticos y β-glucanos15 pre infección

7. RECOMENDACIONES

- Se recomienda la utilización del probiótico *Vibrio alginolyticus* (cepa Ili) en la larvicultura dados sus efectos benéficos como inmunoestimulante.
- De igual manera se recomienda realizar más desafíos virales con la combinación probióticos y β-glucanos administrados en fase tardía con la finalidad de obtener la suficiente consistencia estadística que reafirme los beneficios de esta estrategia de inmunoestimulación ante desafíos con el WSSV.
- Con las muestras de camarones recogidas durante los muestreos del segundo ensayo se recomienda realizar análisis histológicos y de hibridación *in situ* para confirmar la infiltración de los hemocitos granulosos y semigranulosos en los tejidos infectados por el WSSV.
- Para futuros desafíos con el WSSV se recomienda que junto a las pruebas inmunitarias se realice electroforesis de proteínas a fin de confirmar la presencia de los fragmentos C terminales de hemocianina con actividad antibacteriana, estos resultados confirmarían la probable relación entre el aumento de la actividad antibacteriana del plasma y la disminución de las proteínas plasmáticas.
- Finalmente se recomienda realizar desafíos con el WSSV en donde además de cuantificar el NTH , CDH, y generación de O_2^- medir el índice fagocitario de los hemocitos hialinos de tal forma que se pueda establecer en que medida éstos hemocitos están comprometidos en los procesos de fagocitosis , encapsulación y posterior eliminación de las partículas virales en desafíos con el WSSV.

8. BIBLIOGRAFÍA

Adachi, K, T. Hirata, T. Nishioka, M. Sakaguchi. 2003. Hemocyte components in crustaceans convert hemocyanin into a phenoloxidase-like enzyme. Comparative Biochemistry and Physiology Part B 134: 135-141

Aguirre Guzmán, G., y F. Ascencio-Valle. 2000. Infectious disease in shrimp species with aquaculture potential. Resent Research of Developmental Microbiology, 4: 333-348 Research Signpost T.C. 36/248 (2), Trivandrum 8, India.

Alabi, A.O ., J.W. Latchford, D.A. Jones. 2000. Demonstration of residual antibacterial activity in plasma of vaccinated *Penaeus vannamei.* Aquaculture 187:15–34

Anderson, R.S. 1996. Production of Reactive Oxygen Intermediates by Invertebrates Hemocytes: Immunological Significance. *En*: New directions in Invertebrate Immunology. Söderhäll, K., Iwanaga, S. y Vasta, G., Editor., SOS. Publications.

Anderson, R.S., L.M. Olivier, y L.L. Brubacher. 1992. Superoxide anion generation by *Crassostrea virginica* hemocytes as measured by nitroblue tetrazolium reduction. Journal of Invertebrates Pathology. 59:303-307.

Arala-Chávez, M., y T. Sequeira. 2000. Is there any kind of adaptative immunity in invertebrates?. Aquaculture 191, 247-258.

Bachère, E., D. Destoumieux, y P. Bulet. 2000. Penaeidins, antimicrobial peptides of shrimp: a comparison with other effectors of innate immunity. Aquaculture 191, 71-88.

Bayne, J.C., 1990. Phagocytosis and non-self recognition in invertebrates. BioScience Vol. 40 N0. 10:723-731.

Berger, C. 2000. Aportes de la Bio-tecnología a la alimentación y a la inmunoestimulación de camarones peneidos. *En:*: Cruz Suárez, L.E., D. Ricque-Marie, M. Tapia-Salazar, M.A. Olvera-Novoa, y R. Civera-Cerecedo, (Eds.). Avances en Nutrición Acuícola. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 19-22 Noviembre, 2000. Mérida, Yucatán.

Campa-Córdova, A.I., N.Y. Hernández-Saavedra, F. Ascencio. 2002. Superoxide dismutase as modulator of immune function in American white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Comparative Biochemistry and Physiology Part C 133:557-565.

Celso, D.B.A. 2000. Biochemical responses in penaeids caused by contaminants. Aquaculture 191: 163-168

Chang, C.F., M.S. Su, H.Y. Chen, C.F. Lo, G.H. Kou, I.C. Liao. 1999. Effect of dietary β-1,3-glucan on resistance to white spot syndrome virus WSSV in post larval and juvenile *Penaeus monodon*, Diseases of Aquatic Organisms Vol. 33: 163-168

Chang, C.F., H.Y. Chen, M.S. Su, y I.C. Liao. 2000. Immunomodulation by dietary β-1,3-glucanos in the brooders of the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. Fish and Shellfish Immunology 10, 505-514.

Chang, C.F., M.S. Su, H.Y. Chen, y I.C. Liao. 2003. Dietary β-1,3-betaglucan effectively improves immunity and survival of *Penaeus monodon* challenged with white spot syndrome virus. Fish and Shellfish Immunology 00, 1-14.

Chang, C.I., W.Y. Liu, y C.Z. Shyu. 2000. Use of prawn blood agar hemolysis to screen for bacteria pathogenic to culture tiger prawns *Penaeus monodon*. Diseases of Aquatic Organisms Vol.43:153-157.

Chang, P.S., C.F.M. Lo, Y.C. Wang, y G.H. Kou. 1996. Identification of white spot associated baculovirus (WSB) target organs in the shrimp *Penaeus monodon* by *in situ* hybridization. Diseases of Aquatic Organisms 27:131-139.

Chen, J.M., y J.C. Chen. 2000. Study on the free amino acids levels in the hemolymph, gill, hepatopancreas and muscle of *Penaeus monodon* exposed to elevated ambient ammonia. Aquatic Toxicology 50: 27-37

Cheng, W., C.H. Liu, D.F. Yan, J.C. Chen. 2002. Hemolymph oxyhemocianin, protein, osmolality and electrolyte levels of white leg shrimp *Litopenaeus vannamei* in relation to size and molt stage. Aquaculture 211: 325-339.

Chou, H.Y., C.Y. Huang, C.H. Wang, H.C. Chiang, y C.F. Lo. 1995. Pathogenecity of a baculovirus infection causing white spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Taiwan. Diseases of Aquatic Organisms. 23: 165-173.

Chou, H.Y., C. Huang, C.C. Lo, y G.H. Kou. 1998. Studies of transmission of white spot syndrome associated baculovirus (WSBV) in *Penaeus monodon* and *P. japonicus* via water-borne and oral ingestion. Aquaculture, 164: 263-276

Destoumieux, D., M. Muñoz, C. Cosseau, J. Rodríguez, P. Bulet, M. Comps, y E. Bachère. 2000. Penaeidins, antimicrobial peptides with chitin binding activity, are produced and stores in shrimp granulocytes and released after microbial challenge. Journal of Cellular Science. 113: 461-469

Destoumieux, D., D. Saulnier, J. Garnier, C. Jouffrey, P. Bulet, y E. Bachère. 2001. Antifungal peptides are generated from the C terminus of shrimp hemocyanin in response to microbial challenge. The Journal of Biological Chemistry, Vol. 276. No. 50 pp. 47070-47077.

Echeverría, F., V. Otero, F. Cornejo, y J. Rodríguez. 2002. WSSV y ciclo de muda en el camarón blanco *Litopenaeus vannamei.* El Mundo Acuícola, Vol. 8, No.1, Fundación Cenaim-Espol, Guayaquil, Ecuador, pp. 43-46

Gollas-Galván, T., J. Hernández-López, y F. Vargas-Albores. 1999. Prophenoloxidase from brown shrimp (*Penaeus californiensis*) hemocytes. Comparative Biochemistry and Physiology Part B 122: 77-82.

Gullian, M. 2001. Estudio del efecto inmunoestimulante de bacterias probióticas asociadas al cultivo de *Penaeus vannamei.* Tesis de Maestría Escuela Superior Politécnica del Litoral, Guayaquil, Ecuador. pp. 56

Holmblad, T. y K. Söderhäll. 1999. Cell adhesion molecules and antioxidative enzymes in crustacean, possible roll in immunity. Aquaculture 172:111-123.

Johansson, M.W., P. Keyser, K. Sritunyalucksana, K. Söderhäll. 2000. Crustacean haemocytes and haematopoiesis. Aquaculture, 191:45-52

Jones, Brian. 1999. Cellular response to injury in spiny lobsters. Proceedings, International Symposium on Lobster Health Management, Adelaide, September.

Jussila, J., S. McBride, J. Jago, y L.H. Evans. 2001. Hemolymph clotting time as an indicator of stress in western rock lobster (*Panulirus Cygnus* George). Aquaculture 199: 185-193

Kaplan, E.L. y P. Meier. 1958. Nonparametric estimation from incomplete observations, Journal of the American Statistical Association, Volume 53, pp. 457-481.

Khayat, M., B. Funkestein, A. Tietz y E. Lubzens. 1995. *In vivo, in vitro* and cell-free synthesis of hemocyanin in the shrimp *Penaeus semisculatus* (de Haan). Comparative Biochemistry Physiology, Volume 112B, No. 1, 31-38 p.

Le Moullac, G., y P. Haffner. 2000. Environmental factor affecting immune responses in Crustacean. Aquaculture 191: 121-131

Le Moullac, G., L.P. de Laborie, D. Saulnier, C. Goarant, y M. Dehasque. 1998. Principles and problems involved in the evaluation of immunostimulants on juvenile shrimp. IV Simposium Internacional de Nutrición Acuícola, La Paz, B.S.C, México.

Lee, K.K., Y.L. Chen, y P. Ch. Liu. 1999. Hemostasis of tiger prawn *Penaeus monodon* affected by *Vibrio Harvey*, extra cellular products and toxic cysteine protease. Blood Cells, Molecules, and Diseases 25 (13): 180-192

Lee, S.Y., y K. Söderhäll. 2002. Early events in crustacean innate immunity. Fish and Shellfish Immunology 12, 421-437.

Lemaire, P. E. Bernard, J.A. Martínez-Paz, y L. Chim. 2002. Combined effect of temperature and salinity on osmoregulation of juvenile and sub adult *Penaeus stylirrostris.* Aquaculture 209: 307-317

Lightner, D.V. 1996. A handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures for diseases of cultured penaeid shrimp. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA. 304 p.

Lightner, D.V., K.W. Hasson, B.L. White, y R.M. Redman. 1998. Experimental infection of western hemisphere penaeid shrimp with Asian white spot syndrome virus and Asian yellow head virus. Journal of Aquatic Animal Health 10:271-281.

Lignot, J.H., C. Spanings-Pierrot, y G. Charmantier. 2000. Osmoregulatory capacity as a tool in monitoring the physiological condition and the effect of stress in crustaceans. Aquaculture 191: 209-245

López, N., G. Cuzon, G. Gaxiola, G. Taboada, M. Valenzuela, C. Pascual, A. Sánchez, y C. Rosas. 2003. Physiological, nutritional, and immunological role of dietary β-1,3-glucan and ascorbic acid 2-monophosphate in *Litopenaeus vannamei* juveniles. Aquaculture 224:223-234.

Lotz, J.M., y M.A. Soto. 2002. Model of white spot syndrome virus (WSSV) epidemics in *Litopenaeus vannamei*. Diseases of Aquatic Organisms Vol. 50:199-209.

Lowry, O.H., N.J. Rosenbrough, A.L Farr, y R.J Randall. 1951. Protein measurement with the Folin-phenol reagents. Journal of Biology and Chemistry 193: 265-275

Maldonado, M., 2003. Respuesta inmunitaria en familias de *Litopenaeus vannamei* bajo condiciones de infección con WSSV el efecto de la adición de β-1,3 glucanos. Tesis de Maestría Escuela Superior Politécnica del Litoral, Guayaquil, Ecuador. pp. 104.

Montesdeoca, M., 2001. Parámetros inmunitarios en camarones juveniles *Litopenaeus vannamei* en piscinas camaroneras infectadas con el white spot syndrome (WSSV). Tesis de Pre-grado Universidad Técnica de Manabí, Ecuador. pp. 92.

Montesdeoca, M., Amano, Y., Echeverría, F., Betancourt, I., Panchana, F., Sotomayor, M., y Rodríguez, J. 2002. La respuesta inmunitaria celular del camarón *Litopenaeus vannamei* al WSSV y su utilidad en el control de la enfermedad en los estanques. El mundo Acuícola, Vol. 8, No. 1.

Moriarty, J.D.W., 1999. Disease Control in Shrimp Aquaculture with Probiotic Bacteria. Microbial Biosystems: New Frontiers, Proceedings of the 8th International Symposium on Microbial Ecology, Bell CR, Brylinsky M, Johnson-Green P (eds.), Atlantic Canada Society for Microbial Ecology, Halifax, Canada.

Muñoz, M., R. Cedeño, J. Rodríguez, W.P.W. van der Knaap, E. Mialhe, y E. *Bachère.* 2000. Measurement of reactive oxygen intermediate production in haemocytes of the penaeid shrimp, *Penaeus vannamei*. Aquaculture. 191: 89-107

Muñoz, M., F. Vandenbulcke, D. Saulnier, y E. Bachère. 2002. Expression and distribution of peneidin antimicrobial peptides are regulated by haemocyte reactions in microbial challenged shrimp. European Journal of Biochemistry, 269: 2678-2689

OIE. 2000. Diagnostic Manual for Aquatic Animal Diseases, Third Edition, 2000. Office International des Epizooties, Paris, France.237p.

Okumura, T., y A. Katsumi. 2000. Fluctuation in hemolymph ecdyesteroid levels during the reproductive and non-reproductive molt cycles in the giant freshwater prawn *Machrobrachium rosenbergii.* Fisheries Science 66: 876-883

Perazzolo, L.M., R. Gargioni, P. Ogliari, y M.A.A. Barracco. 2002. Evaluation of some hemato-immunological parameters in the shrimp *Farfantepenaeus paulensis* submitted to environmental and physiological stress. Aquaculture, 214-19-33.

Persson, M., A. Vey, y K. Söderhäll. 1987. Encapsulation of foreign particles *in vitro* by separated blood cells form crayfish, *Astacus leptodactylus* Cellular. Tissue Research 247: 303-409.

Pramod Kiran, R.B., K.V. Rajendran, S.J. Jung, y M.J. Oh. 2002. Experimental susceptibility of different life-stages of the giant freshwater prawn, *Machrobrachium rosembergii* (de Man), to white spot syndrome virus (WSSV). Journal of Fish Diseases 25:201-207

Rao, P.V. 1998. Statistical research methods in the life sciences. Brooks/Cole Publishing Company, U.S.A.

Rengpipat, S., S. Rukpratanporn, S. Piyatiratitivorakul, P. Menasaveta. 2000. Immunity enhancement in black tiger prawn (*Penaeus monodon*) by a Probiotic bacterium (Bacillus S11). Aquaculture 191: 271-288

Rodríguez, J., y G. Le Moullac. 2000. State of the art of immunological tools and health control of penaeid shrimp. Aquaculture 191: 109-119.

Sánchez, A., C. Pascual, A. Sánchez, F. Vargas-Albores, G. Le Moullac, G., y C. Rosas. 2001. Hemolymph metabolic variables and immune response in *Litopenaeus setiferus* adult males: the effect of acclimation. Aquaculture 198: 13-28.

Sierra, C., J. Guevara, R. Lascurain, A. Pérez, C. Agundis, E. Centeno, y L. Vásquez. 2001. Sialylation is modulated through maturation in hemocytes from *Macrobrachium rosenbergii.* Comparative Biochemistry and Physiology Part C 130, 179-189.

Smith, V.J., y K. Söderhäll. 1983. β-1,3-Glucan activation of crustacean hemocytes *In Vitro* and *In Vivo*. Biology Bulletin. 164:299-314.

Smith, V.J., K. Söderhäll, M. Hamilton. 1984. β-1,3-glucan induced cellular defense reactions in the shore crab, *Carcinus maenas*. Comparative. Biochemistry and Physiology Vol. 77 A:635-639

Söderhäll, K., y L. Cerenius. 1992. Crustacean immunity. annual revision, Fish Diseases 3-23.

Söderhäll, K., L. Cerenius, M.W. Johansson, 1996. The Prophenoloxidase Activating System in Invertebrates. E*n*: New Directions in Invertebrate Immunology , Kenneth Söderhäll , Sadaaki Iwanaga, Vasta Editors, SOS Publications N.J. USA: pp. 229-253

Song, Y.L., y Y.T. Hsieh. 1994. Immunostimulation of tiger shrimp (*Penaeus monodon*) hemocytes for generation of microbicidal substances: Analysis of reactive oxygen species. Developmental and Comparative Immunology, Vo.. 18. No. 3: 201-209

Soto, M.A., Shervette, V.R., and Lotz, J.M., 2001. Transmission of white spot syndrome virus (WSSV) to *Litopenaeus vannamei* from infected cephalotorax, abdomen, or whole shrimp cadaver. Diseases. Aquatic. Organisms. Vol. 45:81-87

Sritunyalucksana, K., y K. Söderhäll. 2000. The proPO and clotting system in crustaceans. Aquaculture 191: 53-69.

Subasinghe, R.P., M.G. Bondad-Reantaso, y. S.E. McGladdery. 2001. Aquaculture development, health and wealth. *En:* R.P. Subasinghe, P. Bueno, M.J. Phillips, C. Hough, S.E. McGladdery y J.R. Arthur, eds. Aquaculture in the Third Millennium. Technical Proceedings of the Conference on Aquaculture in the Third Millennium, Bangkok, Thailand, 20-25 February 2000.NACA, Bangkok and FAO, Rome. (in press)

Tapia, F. 1997. Optimización de ensayos antibacterianos y estudios sobre la inducción de la actividad antibacteriana en la hemolinfa del camarón *P. vannamei*. Tesis de Acuicultura. Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar. ESPOL, Guayaquil, Ecuador.

Thörnqvist, P.O., y K. Söderhäll. 1997. Crustacean immune reactions, a short review. diseases in Asian aquaculture III, published by the Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Philippines.

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.

van de Braak, C.B.T. 2002 Haemocytic defense in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*).PhD thesis, Wageningen University dissertation no.3218 – with ref. – with summary in Dutch.ISBN 90-5808-651-8

van de Braak, C.B.T., M.H.A. Botterblom, E.A. Huisman, J.H.W. Rombout, W.P.W. van der Knaap. 2002. Preliminary study on haemocyte response to white spot syndrome virus infection in black tiger shrimp *Penaeus monodon*. Diseases of Aquatic Organisms Vol.51:149-155

Van Hulten, M.C., J. Witteveldt, S. Peters, N. Kloosterboer, R. Tarchini, M. Fiers, H. Sandbrink, R.K. Lankhorst, y J.M. Vlak. 2001 The white spot syndrome virus DNA genome sequence. Virology 286 (1):7-22.

Vargas-Albores, F., F. Jiménez-Vega., y K. Söderhäll. 1996. A plasma protein isolated from brown shrimp (*Penaeus californiensis*), which enhances the activation of prophenoloxidase system by β-1,3-glucan. Developmental and Comparative Immunology Vol. 20 No. 5:299-306.

Vásquez, L., C. Sierra, S. Juárez, C. Agundis, A. Zavala, y E. Centeno. 1998. Mecanismos de inmunidad en crustáceos. Interciencia, Vol.. 23, No. 6. Nov.- Dic.

Vidal, O.M., C.B. Granja, y F. Aranguren. 2001. A profound effect of hyperthermia on survival of *Litopenaeus vannamei* juveniles infected with white spot syndrome Virus. Journal of the World Aquaculture Society. Vol. 32, No. 4

Wang, Y.T., W. Liu, J.N. Seah, C.S. Lam, J.H. Xiang, V. Korzh, y J. Kwang. 2002. White spot syndrome virus (WSSV) infects specific hemocytes of the shrimp *Penaeus merguiensis*. Diseases of Aquatic Organisms Vol.52:249-259.

Yip, E.C.H., y J.T.Y. Wong. 2002. Fluorescence activated cell sorting of haemocytes in Penaeids prawns. Aquaculture, 204 25-31.

Zar, J. 1999. Biostatistical Analysis. 4ta. Edición, Simon y Shuster USA.

Zherdmant, M.T., L. San Miguel, J. Serrano, E. Donoso, y E. Mialhe. 1997. Estudio y utilización de probióticos en el Ecuador, Panorama Acuícola 2, 28.