



ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DEL LITORAL

Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar

“Tratamientos basados en alta temperatura y β -1,3-glucanos para disminuir la prevalencia de la enfermedad de la mancha blanca (WSD) en postlarvas de *Penaeus vannamei*”

Tesis de Grado

Previa a la obtención del título de:

MAGISTER EN CIENCIAS

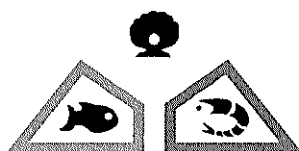
Presentada por:

Alejandra del Consuelo Valladares Sosa

Guayaquil – Ecuador

2006

TESIS ELABORADA CON EL SOPORTE DE:



FUNDACIÓN CENAIM-ESPOL



COOPERACIÓN TÉCNICA BELGA



**UNIVERSIDAD DE GANTE
BÉLGICA**



**UNIVERSIDAD CATÓLICA
DE LOVAINA – BÉLGICA**

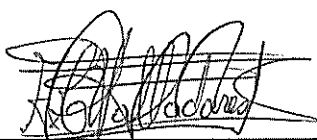
VITA

Alejandra del Consuelo Valladares Sosa nació el 11 de abril de 1979 en Santa Prisca, Quito. Inició sus estudios en la escuela San Francisco de Quito (1986-1991) y en el Conservatorio Nacional de Música (1985-2000) obteniendo el título de Bachiller Técnico Musical en la especialidad Piano. Los estudios de nivel secundario los realizó en el colegio Técnico, Fuerza Aérea Ecuatoriana (1992-1997), obteniendo el título de Bachiller en Ciencias Especialización Físico Matemáticas. Sus estudios superiores los realizó en la Escuela Politécnica del Ejército en los años 1997 al 2002, obteniendo el título de Ingeniera Agropecuaria. En agosto del 2002 tomó a cargo la cátedra del módulo de acuicultura trabajando con Trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) en cultivo intensivo durante 2 meses mientras continuaba con el desarrollo de trabajos en el Centro de Investigaciones Acuícolas Papallacta (CENIAC-P) desde julio del 2002 donde trabajó como Asistente de Investigación durante 1 año (30 de Julio 2003). En septiembre del 2003 ingresó al Programa de Maestría de Ciencias Acuícolas realizada por el Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas (CENAIM – ESPOL). culminando en Junio del 2006 y obteniendo el título de Master en Ciencias con especialidad en Acuicultura Marina.

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).



Alejandra del Consuelo Valladares Sosa

TRIBUNAL DE TESIS



Presidente del Tribunal



Jenny Rodríguez, Ph.D.

Directora de Tesis



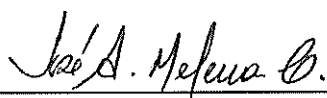
Bony Bayot, M.SC.

Miembro del Tribunal



Marcelo Muñoz, Ph.D.

Miembro del Tribunal



José Melena, Ph.D.

Miembro del Tribunal

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios quien siempre me ha acompañado en mi camino por la vida, y por permitirme estar rodeada de gente buena que me ha llenado de alegría y esperanza.

A Rafa gracias por esperarme, brindarme tu sonrisa, ternura y darme todo tu cariño en todo momento, que da luz a mi vida.

A Edward D. León C. quien me brindó un amor sincero y apoyo incondicional con quien compartí momentos inolvidables en mi vida.

A Yolanda Sosa quien en cada momento guió mis pasos, me impulsó a seguir adelante, compartió mis penas y alegrías, gracias por ser la mejor madre del mundo, y por apoyarme con tanto cariño con el cuidado de mí ser más amado Rafita.

A Luis Alejandro Valladares, por sus palabras de aliento, cariño, cuidado, alegría, entusiasmo que me brinda cada día de mi vida, gracias por ser el mejor padre del mundo, Janrito.

A Pierina y Concepción, por ser las mejores hermanas, con quien compartí todos los momentos de mi vida y quienes me aconsejaron para seguir adelante.

A Mary gracias por el cariño brindado y la preocupación por toda nuestra familia y especialmente para con mi pequeño ratón, y el pequeño Faustito.

A Faustito Alejandro, por ser un ser dulce que encanta a toda la familia, especialmente a Rafita.

A la Doctora, Jenny Rodríguez, quien dedicó su tiempo, dedicación y experiencia para guiarme en el desarrollo de mi tesis.

A Sulay Piedra, Gabriela Casco, Lucía Muñoz y Diego Mejía por ser amigos incondicionales, quienes han estado en los buenos y malos momentos y siempre tuvieron palabras de aliento en el trayecto del desempeño de mi tesis.

A mis amigos de la Escuela, Colegio y Universidad que siempre estuvieron apoyándome.

A mis compañeros de Maestría, gracias por los buenos momentos compartidos.

A todos quienes me brindaron su amistad en mi estadía en el CENAIM y quienes me apoyaron en el desempeño de mi tesis.

A la Doctora. Bonny Bayot por la asesoría brindada en la elaboración del proyecto de tesis y en el análisis de datos.

A todos los investigadores del Centro Nacional de Acuicultura Marina quienes aportaron con mi desarrollo profesional en el transcurso de estos 2 años.

A todos quienes aportaron para mi formación profesional en el transcurso de mi vida.

A la Cooperación Técnica Belga, y al Centro Nacional de Acuicultura e investigaciones Marinas (CENAIM) por permitirme realizar el programa de maestría.

DEDICATORIA

Tu llegaste como un regalo a mi vida para darle la razón a mi existir, te cante, acaricie, aun antes de nacer, me llenaste de alegría, ternura, dulzura y amor, por ti tuve la dicha de esa primera emoción, ser madre, y aunque por primera vez, fue la experiencia más grande, la que me hizo mujer. Por ti empecé a soñar, te vi crecer, caminar, hablar, correr, jugar, dormir como un ángel, y cada sonrisa que me brindas ha sido el motor para continuar, la fuerza de mi vida, el pilar de mi alegría.

A Dios le pido que me permita verte convertido en un gran ser humano con humildad, valor, dignidad, y con mucho amor para ofrecer a los demás. La vida no es fácil, pero llegarás tan lejos como te propongas, lucha contra todo y alcanza tus metas ¡llegaras si luchas por ello!. Todo problema tiene solución, la respuesta la encontrarás en el fondo de tu corazón. Y recuerda siempre que me siento muy orgullosa de ti y que en cualquier lugar que me encuentre mi amor estará para acompañarte cuidarte y guiarte en toda tu vida.

CON TODO EL AMOR PARA MI HIJO:

Rafael Santiago Freire Valladares

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS.....	X
LISTA DE TABLAS	XII
LISTAS DE ANEXOS	XIV
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XV
RESUMEN.....	XVI
1. <u>INTRODUCCIÓN</u>	1
2. <u>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</u>	4
2.1. <u>LA MAÑCHA BLANCA</u>	4
2.2. <u>HOSPEDEROS</u>	5
2.3. <u>FORMAS DE DIAGNÓSTICO Y DETECCIÓN</u>	6
2.4. <u>INFECCIONES CRÓNICAS DE WSSV</u>	8
2.5. <u>APOPTOSIS</u>	10
2.5.1. <u>Detección de apoptosis mediante microscopía óptica</u>	13
2.5.2. <u>Detección de apoptosis mediante microscopía electrónica</u>	14
2.5.3. <u>Detección de apoptosis mediante electroforesis de ADN</u>	14
2.5.4. <u>TdT – mediated dUTP – biotin Nick End Labeling (TUNEL)</u>	15
2.5.5. <u>Detección de apoptosis mediante citometría de flujo</u>	15
2.5.6. <u>Detección de apoptosis mediante tinciones con fluorescencia</u>	15
2.6. <u>RESISTENCIA</u>	16
2.6.1. <u>Resistencia basada en hipertermia</u>	17
2.6.2. <u>Resistencia basada en inmunomodulación: Inmunoestimulantes</u>	18
3. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	21
3.1. <u>MATERIAL BIOLÓGICO</u>	21
3.2. <u>PREPARACIÓN DE LA SALA DE EXPERIMENTACIÓN</u>	21
3.3. <u>DISEÑO EXPERIMENTAL</u>	23
3.4. <u>MUESTREO</u>	23
3.5. <u>ANÁLISIS MEDIANTE LA TÉCNICA DE PCR</u>	24
3.6. <u>ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO</u>	24
3.7. <u>DETECCIÓN DEL WSSV MEDIANTE HIBRIDACIÓN <i>In-situ</i> EN ANIMALES DE BAJO NIVEL DE INFECCIÓN</u>	26
3.8. <u>DETECCIÓN DE APOPTOSIS</u>	26

3.9. <u>ANÁLISIS ESTADÍSTICO</u>	26
3.9.1. <u>Análisis de varianza</u>	26
3.9.2. <u>Tablas de contingencia</u>	26
3.9.3. <u>Modelo de regresión logística binaria</u>	28
4. <u>RESULTADOS</u>	30
4.1. <u>PESO AL FINAL DEL BIOENSAYO (PL66)</u>	30
4.2. <u>ANÁLISIS DE PRESENCIA, RIESGO Y PROBABILIDAD DE WSSV EN MUESTRAS ANALIZADAS MEDIANTE PCR</u>	31
4.3. <u>ANÁLISIS DE PRESENCIA, RIESGO Y PROBABILIDAD DE WSD EN ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO.</u>	34
4.4. <u>RESULTADOS DE PRESENCIA DE WSSV EN ANIMALES DE BAJO NIVEL DE INFECCIÓN MEDIANTE HIBRIDACIÓN <i>In-situ</i>.</u>	37
4.5. <u>DETECCIÓN DE APOPTOSIS</u>	47
5. <u>DISCUSIÓN</u>	51
6. <u>CONCLUSIONES</u>	60
7. <u>RECOMENDACIONES</u>	63
8. <u>ANEXOS</u>	64
9. <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	78

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Posibles etapas de la apoptosis. 1: fase de inducción; 2,3 y 4. fases efectoras; 5,6,7 y 8. fase de degradación. (tomado de Pacher, 2006).	11
Figura 2. Apoptosis y Necrosis (tomado de Magno y Joris, 1995)	12
Figura 3. Unidades experimentales utilizadas en el bioensayo. A) Tanque cónico con tubo y malla, B) base de malla y conchilla	22
Figura 4. Sistema de filtración de Agua	23
Figura 5. Índices de WSD determinado por histología para los diferentes tratamientos (anexo 7).	36
Figura 6. Mandíbula de camarón A) Marcado mediante hibridación <i>in-situ</i> que indica la presencia de WSSV B) Corte histológico del mismo Tejido (H&E). Notar que las lesiones de WSD no son evidentes en el corte histológico. Barra = 271.74 μm	39
Figura 7. Nervio de la cabeza A) Marcado por hibridación <i>in-situ</i> , donde se observa señal para WSSV. B) Corte histológico del mismo tejido (H&E). Notar que las lesiones de WSD no son evidentes en el corte histológico. Barra = 320.5 μm .	40
Figura 8. Sistema Nervioso central de camarón, (tomado de Dall, 1990)	41
Figura 9. Señal positiva para WSSV en Sistema Nervioso. Barra = 43.1 μm	41
Figura 10.A) Glándulas Tegumentales de la región oral (H&E). Barra = 833 μm . B)Glándulas Tegumentales de la región oral por hibridación <i>in-situ</i> Barra = 43.1 μm	42
Figura 11. Índice de apoptosis e índice histológico de los animales sometidos a los cuatro tratamientos.	47
Figura 12. A) Señal de apoptosis en apéndice 40x ,barra = 271.74 μm B) Señal de apoptosis en apéndice 40x barra = 320.5 μm .	49
Figura 13. A) Señal de apoptosis en esferoides del órgano linfoide 100x barra =125 μm B) Señal de apoptosis en intestino 40x barra = 320.5 μm .	50
Figura 14. Gráfico esquemático de presunto quimiorreceptor antenular en <i>Paragrapsus gaimardii</i> , nótese que la cutícula es más delgada en el extremo y está en contacto estrecho con terminaciones nerviosas. (tomado de Atwood and Sandeman 1982).	57

Figura 15. Glándula tegumental, note la comunicación del tejido con el exterior y la ausencia de cutícula en las células glandulares. (tomado de Horst, 1993).....57

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Pesos obtenidos en PL 66 en dos condiciones de temperatura y alimentación (presencia y ausencia de β -1,3-glucanos).	31
Tabla 2. ANOVA para pesos finales	31
Tabla 3. Tabla de contingencia entre infección de WSSV y temperatura en las muestras analizadas mediante técnica de PCR	32
Tabla 4. Tabla de contingencia entre infección de WSSV y β -1,3-glucanos en las muestras analizadas por PCR	32
Tabla 5. Modelo de regresión logística que explica la contribución de la temperatura y β -1,3-glucanos sobre la infección de WSSV en las muestras analizadas mediante PCR.....	33
Tabla 6. Probabilidad de ocurrencia de infección de WSSV en función de temperatura y β -1,3-glucanos obtenidas de muestras analizadas con la técnica de PCR.	34
Tabla 7. Tabla de Contingencia entre presencia y ausencia de Mancha Blanca por análisis histológico y temperaturas.	34
Tabla 8. Tabla de contingencia entre presencia y ausencia de mancha blanca y β -1,3-glucanos por análisis histológico.....	35
Tabla 9. Probabilidad de ocurrencia de WSD en función de temperatura y β -1,3-glucanos en análisis histopatológico.	35
Tabla 10. Animales positivos y negativos en histología e hibridación <i>in-situ</i>	38
Tabla 11. Tabla de contingencia entre presencia y ausencia de mancha blanca en tejido nervioso y temperaturas por análisis de hibridación <i>in-situ</i>	43
Tabla 12. Tabla de contingencia entre presencia y ausencia de mancha blanca en tejido nervioso y β -1,3-glucanos por análisis de hibridación <i>in-situ</i>	43
Tabla 13. Análisis de regresión logística binaria de señal para WSSV mediante hibridación <i>in-situ</i> en tejido nervioso, utilizando temperatura y β -1,3-glucanos.	44
Tabla 14. Probabilidad de ocurrencia de señal positiva a WSSV en tejido nervioso en función de temperatura y β -1,3-glucanos mediante hibridación <i>in-situ</i>	44

Tabla 15. Tabla de contingencia de presencia y ausencia de señal para WSSV en glándulas tegumentales bajo condiciones de 2 temperaturas en análisis de hibridación <i>in-situ</i>	45
Tabla 16. Tabla de contingencia de presencia y ausencia de señal positiva para WSSV en glándulas tegumentales bajo el factor β -1,3-glucanos en hibridación <i>in-situ</i>	45
Tabla 17. Análisis de regresión logística binaria de señal para WSSV mediante hibridación <i>in-situ</i> en glándulas tegumentales, utilizando temperatura y β -1,3-glucanos	46
Tabla 18. Probabilidades de que ocurra la infección, detectada mediante hibridación <i>in situ</i> , en glándulas tegumentales para los factores temperatura y β -1,3-glucanos.	46
Tabla 19. Nivel de apoptosis detectado mediante TUNEL en diferentes tejidos.....	48

LISTAS DE ANEXOS

ANEXO 1. TAMAÑO DE MUESTRA NECESARIO PARA OBSERVAR DIFERENCIAS EN LAS PROPORCIONES DE DOS POBLACIONES	64
ANEXO 2. PROTOCOLO PARA ANALISIS HISTOLÓGICO	65
ANEXO 3. EXTRACCIÓN DE ADN POR MEDIO DE CTAB	67
ANEXO 4. PROTOCOLO DE HIBRIDACIÓN <i>in-situ</i>	69
ANEXO 5. PROTOCOLO PARA DETECTAR APOPTOSIS MEDIANTE TUNEL ...	72
ANEXO 6. PRUEBAS PARA DETECTAR NORMALIDAD Y HOMOGENEIDAD DE VARIANZA	76
ANEXO 7. ÍNDICE HISTOLÓGICO DE WSSV DETERMINADO POR CADA TRATAMIENTO.....	77

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análisis de Varianza
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AP	Fosfatasa Alcalina
CENAIM	Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas
g	gravedad
gl	Grados de libertad
H&E	Hematoxilina-Eosina
HIS	Hibridación <i>in-situ</i>
IHHNV	Virus de la Necrosis Infecciosa Hipodérmica y Hematopoyética.
L	Litro
LOS	Esferoides del órgano linfoide
mg	miligramo
ml	mililitro
ng	nano gramo
OL	Órgano linfoide
p	Probabilidad
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
P-K	Picknosis - Kariorrhesis
PL	Post larva
proPO	Pro-fenol oxidasa
TdT	Enzima Terminal Deoxynucleotidyl Transferasa
TSV	Virus del Síndrome de Taura
µm	Mícra
WSD	Enfermedad de la mancha blanca
WSSV	Virus del Síndrome de la Mancha Blanca
χ^2	Prueba de chi cuadrado
YHV	Virus de la cabeza amarilla

RESUMEN

Con la presencia del virus del síndrome de la mancha blanca se han reportado altas mortalidades en sistemas productivos de camarón cultivado. En el presente trabajo se planteó la hipótesis de que las larvas de camarón, son portadoras del virus de la mancha blanca a niveles indetectables y que la enfermedad se desarrolla en los estanques en función de las condiciones ambientales, especialmente la temperatura. Por ello en este estudio, larvas detectadas como negativas al virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV) fueron confinadas en un sistema experimental a fin de investigar la presencia del virus de la mancha blanca luego de un tiempo razonable de cohabitación en un estadio de alta susceptibilidad (PL 45 – PL66). Se utilizaron dos condiciones de temperatura 24°C y 31°C. Además se empleó β -1,3-glucanos en dos niveles, presencia y ausencia en la alimentación. En total hubo 4 tratamientos cada uno con combinación de temperatura e inmunoestimulante en un diseño factorial. Se realizó además un análisis de cohorte para determinar el riesgo y probabilidad de presencia de WSSV en los tratamientos.

Los parámetros evaluados en este estudio fueron presencia de animales infectados detectados mediante la técnica de PCR, presencia de lesiones de la enfermedad de la mancha blanca (WSD) utilizando la técnica de histología y la utilización de hibridación *in-situ* como prueba confirmatoria de la presencia o ausencia de la infección en muestras negativas para histología, considerando además los animales de bajo nivel de infección. Se observó además el nivel de apoptosis en los animales infectados mediante TdT – mediated dUTP – biotin Nick End Labeling. (TUNEL).

En el análisis de cohorte para ausencia y presencia de animales portadores de WSSV, no se observó ningún efecto de la temperatura en tanto que los β -1,3-glucanos tuvieron un efecto significativo, encontrándose además una menor probabilidad de infección en la combinación de temperatura a 31°C y la utilización de β -1,3-glucanos. Al realizar el análisis de las muestras evaluadas por histología se determinó que ninguno de los factores tuvo un efecto significativo. Sin embargo, la menor probabilidad de que aparezcan lesiones fue utilizando β -1,3-glucanos y 31°C. Al comparar los resultados de hibridación *in-situ* con los resultados de histología por medio de tablas de contingencia se determinó que no existió concordancia entre ellos, siendo independientes. Tejidos reportados negativos por histología, resultaron positivos en hibridación *in-situ*. Además se observó que la mayoría de tejidos marcados positivamente con la sonda para WSSV en animales no mostraron lesiones, fueron el tejido nervioso de la cabeza y las glándulas tegumentales de la región oral. El tejido nervioso se vio más afectado cuando se empleó β -1,3-glucanos y no hubo influencia de la temperatura, mientras que las glándulas tegumentales se vieron más afectadas cuando se empleó temperatura de 31°C. Los β -1,3-glucanos tuvieron un efecto protector sobre este tejido, neutralizando de alguna manera el efecto de la temperatura en el tratamiento que combinó 31°C y β -1,3-glucanos.

La detección de apoptosis fue puesta en evidencia a nivel de epitelios de los apéndices. Esta observación sugiere que este proceso podría funcionar como un mecanismo de defensa para impedir la replicación viral en los tejidos más expuestos. En tejido nervioso no se detectó apoptosis. Este tejido podría constituirse en un refugio para el virus.

1. INTRODUCCIÓN

Con la presencia del Virus del Síndrome de la Mancha Blanca (WSSV por sus siglas en inglés) en Ecuador, se reportaron mortalidades superiores al 80% en cultivos comerciales (Sonnenholzner, 2004, Aqua Bounty Pacific, 2005). La aparición de brotes, ocurrencia y severidad de la mancha blanca depende de varios factores tales como: temperatura, estadio de muda, edad, carga viral, forma de transmisión. Esta última puede ser influenciada por la presencia de otros crustáceos portadores del virus como es el caso de cangrejos, *Sesarma sp*, *Scylla serrata* y *Uca pugilato*, los cuales según investigaciones realizadas por Kanchanaphum *et al.* (1998) transmitieron WSSV a *Penaeus monodon*. Sin descartar que las larvas de camarón también sean una vía de entrada del virus en los cultivos (Chou *et al.* 1995). Las rutas de transmisión horizontal mencionadas por Wu *et al* (2001) son la ingestión (favorecida por el canibalismo) y el agua funcionando como vehículo. Siendo importante en estos dos últimos casos la densidad de siembra.

El riesgo de llevar animales positivos para WSSV a los estanques es alto en sistemas de cultivos extensivos y semi-intensivos. La presencia de WSSV incide disminuyendo la supervivencia y la densidad de cosecha debido a la transmisión horizontal, la cual en situaciones de estrés (cambios de temperatura) aumentaría la prevalencia en el cultivo (Rodríguez, 2003a). En un estudio realizado por Peng *et al.* 1998, se observó una rápida diseminación de WSSV en camarones *P. monodon* cuando fueron sometidos a factores estresantes, como fue la excisión de periopodos. De la misma manera en estudios realizados por De la Vega *et al.* 2004, se observó mediante cuantificación por PCR en tiempo real (RT-PCR) que el estrés por manipuleo (inyecciones repetidas) puede estimular la proliferación del virus asociado a las branquias (GAV) en camarones *P.*

monodon infectados crónicamente. Este riesgo es aún mayor en sistemas intensivos, ya que éstos se caracterizan por poseer una mayor densidad de animales.

La temperatura del agua parece ser uno de los factores de riesgo más críticos para la evolución de la enfermedad (Bayot 2005, Vidal *et al.* 2001, Granja *et al.* 2003). A partir de temperaturas inferiores a 27°C se incrementa la prevalencia, en tanto que la patogenicidad de la enfermedad se reduce con el incremento de la temperatura (Sonnenholzner *et al.* 2002a). Esta situación ha motivado que la hipertermia (Temperatura > 31°C) sea utilizada en sistemas intensivos de cultivo bajo invernadero (Sonnenholzner *et al.* 2002c)

Además de la hipertermia un factor que podría ayudar a la prevención, disminuyendo la patogenicidad en las piscinas son los β -1,3-glucanos. En ensayos de desafío se ha visto que estos proporcionan un aumento en la resistencia al WSSV en postlarvas (PL15) o juveniles ($5,5 \pm 0,5$ g) (Chang *et al.* 1999).

Los programas de prevención son los únicos controles efectivos para manejar las enfermedades virales. Estos, en conjunto con el manejo del ambiente del estanque, pueden minimizar el impacto de las patologías virales.

En el presente estudio se han utilizado los factores temperatura y β -1,3-glucanos como alternativas para disminuir la presencia del WSSV en postlarvas de *Penaeus vannamei* antes de su ingreso en los estanques de cultivo. Por lo tanto, se evaluó el efecto de la temperatura y los β -1,3-glucanos como tratamientos de limpieza sobre el WSSV en diferentes tejidos de post larvas sometidas a estos factores. El resultado esperado será

encontrar una alternativa para disminuir la prevalencia de WSSV en las larvas, fortalecer el sistema inmune, disminuyendo la probabilidad de transmisión horizontal del WSSV en piscinas de engorde. Este estudio ayudaría a obtener un protocolo de manejo de salud de los animales en estanques. El beneficio sería disminuir el riesgo de brotes de WSD e incrementar la densidad de cosecha.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. LA MANCHA BLANCA

El agente causante de la mancha blanca el WSSV es un virus de doble cadena de DNA (Tsai *et al.* 1999, Sangamaheswaran and Jeyaseelan 2001, OIE 2003). Este es de replicación nuclear, afectando los tejidos de origen ectodérmico y mesodérmico de muchos crustáceos (Rajendran *et al.* 1999).

El WSSV ocasiona una alta y rápida mortalidad (Chou *et al.* 1998), ocasionando grandes pérdidas para los productores de camarón, que puede ser del 100% entre el tercer y décimo día de brote (Sangamaheswaran and Jeyaseelan 2001, Wang *et al.* 1999).

La enfermedad de la mancha blanca (WSD) en el camarón se caracteriza por presentar inclusiones o manchas blancas circulares en la cutícula. Éstas a veces pueden ser causadas por alta alcalinidad y otras condiciones ambientales, por ello es necesario realizar un diagnóstico que incluye exámenes histopatológicos (OIE 2003). Otros signos son la coloración roja del cuerpo, letargia, nado errático, en tanto los animales dejan de comer. En pocos días se observa animales moribundos nadando en la superficie de las piscinas (OIE 2003, Sangamaheswaran and Jeyaseelan 2001, Rodríguez *et al.* 2003, Calderón *et al.* 1999).

Existen dos clasificaciones del tipo de infección causada por el virus del WSSV. En la primera clasificación se han definido dos tipos (Wang *et al.* 1998):

- Tipo 1 (infección aguda). Causa alta mortalidad en un corto período de tiempo como se ha observado en especies de *P. monodon*, *Penaeus indicus* y *Penaeus penicillatus* (Chou *et al.* 1995).
- Tipo 2 (infección latente). Los individuos mantienen el virus y no mueren como es el caso de *Macrobrachium sp*, *Scylla serrata* y *Panulirus homarus* (Peng *et al.* 1998).

La segunda clasificación divide los brotes en tres tipos en base a manifestaciones clínicas (Sudha *et al.* 1998):

- Brote de Tipo 1 (agudo o subagudo). La severidad de la infección a nivel del tejido es de media a alta. Las mortalidades significativas ocurren dentro de siete a diez días y los camarones afectados tienen puntos blancos prominentes en el cutícula como principal signo clínico.
- Brote de Tipo 2. El camarón afectado presenta un enrojecimiento masivo a nivel del tejido, la infección es muy alta y mortalidades totales ocurren en el plazo de dos a tres días.
- Brote Tipo 3 (crónico). Tiene una severidad baja a nivel del tejido. Las manchas blancas y enrojecimiento están ausentes, y las mortalidades del camarón se extienden entre 15 a 28 días.

2.2. HOSPEDEROS

Las aguas estuarinas usadas en sistemas de cultivos llevan consigo millones de microorganismos por ml de agua/gramo de suelo. Estos microorganismos pueden ser benéficos, patógenos oportunistas o virulentos (Sangamaheswaran and Jeyaseelan. 2001).

Por otra parte, las aguas estuarinas poseen una amplia gama de portadores potenciales de patógenos. Utilizando PCR, histología, microscopía electrónica de transmisión e hibridación *in situ* se ha podido confirmar la presencia de WSSV en otras especies como cangrejos, langostas, copépodos y larvas de insectos (Sangamaheswaran and Jeyaseelan 2001, Supamattaya *et al* 1998, Rajendran *et al.* 1999, Peng *et al.*1998, Chang *et al.* 1998, Wang *et al.* 1998). En algunos casos se ha observado que estos organismos pueden ser portadores asintomáticos (Rajendran *et al.* 1999). Ellos son comunes en los sistemas de cultivo y pueden permanecer en las piscinas, así se realice una limpieza profunda de las mismas luego de cada cosecha, por lo que constituyen una fuente de transmisión del virus en cultivos de camarón. Además de la presencia de hospederos que transmitan horizontalmente el virus a los camarones durante el cultivo (Chou *et al.* 1995), algunos autores no descartan la posible transmisión vertical del WSSV, es decir la transmisión del virus desde los padres a la descendencia (Mohan *et al.* 1997, Huang *et al.* 1999, Lo *et al.* 1997).

2.3.FORMAS DE DIAGNÓSTICO Y DETECCIÓN

Las técnicas más empleadas para diagnóstico son observación de signos externos, histología y PCR. Pudiendo utilizarse hibridación *in-situ*, western blot y microscopía electrónica de transmisión (OIE 2003, Tsai *et al.*1999).

Con la utilización de la histología se pueden apreciar a nivel celular las lesiones, y la extensión de estas. Mientras que, con las técnicas moleculares como el PCR, se detecta la presencia del ADN viral pero no se llega a conocer la extensión de las lesiones. Las ventajas que ofrecen estas últimas son la alta sensibilidad y especificidad (Quintero *et al.*1999).

Para determinar los tejidos que son afectados con WSSV se han analizado algunos órganos mediante PCR, histología, hibridación *in-situ*, microscopía electrónica. Entre ellos, corazón, estómago, intestino medio, hepatopáncreas, músculo abdominal, integumento que cubre las branquias, nervio ventral, órgano linfoide, hemolinfa, testes u ovarios, espermatóforos, pleópodos, periópodos, y pedúnculo ocular. Sin embargo, se ha observado que no todos los individuos que son positivos a WSSV por PCR, son positivos a un análisis histológico (Lo *et al.* 1997), pudiendo ocurrir también lo contrario (de Blas 2002). Estas diferencias podrían presentarse debido a la sensibilidad de las técnicas, empleadas o el tipo de tejido muestreado.

Por histología se observan núcleos infectados e hipertrofiados en tejidos de origen ectodérmico y mesodérmico. Los núcleos presentan un diámetro 2 a 3 veces mayor que el núcleo normal Wang *et al.* (1999), Lightner (1996). Sin embargo Lo *et al.* (1997) han reportado la presencia de núcleos de talla normal, pero homogéneamente teñidos como los núcleos infectados por WSSV. En las lamelas de branquias se observó deformación y una marcada hipertrofia del núcleo con marginación de la cromatina e inclusiones intranucleares. Estas lesiones también se han observado en órgano linfoide, tejido hematopoyético, tejido conectivo, corazón y glándula antenal (Rodríguez *et al.* 2003). Además se ha reportado la presencia de cuerpos de inclusión como signos de WSD que en estadios tempranos son eosinofílicos con un núcleo central, muy parecido a IHHNV (Lightner 1996) por lo que se requiere de técnicas como inmunohistoquímica e hibridación *in situ* para diferenciar al virus causante de la lesión. Además en animales infectados con WSSV se ha detectado la presencia de esféroides en el órgano linfoide (Vidal *et al.*, 2001, Rodríguez *et al.* 2003, Van de Braak *et al.* 2002).

Por hibridación *in situ* se ha confirmado que la replicación del WSSV ocurre en tejidos y órganos como pleópodos, branquias, estómago, músculo, hemolinfa, intestino medio, corazón, periópodos, órgano linfoide, integumento, tejido nervioso, hepatopáncreas, testes, ovarios, espermátóforos y pedúnculo ocular (Lo *et al.* 1997).

Un signo patológico observado en ocasiones en animales afectados por WSSV es la presencia de núcleos picnóticos y de kariorrhexis (Pantoja y Lightner 2003, Rodríguez *et al.* 2003). Por microscopía electrónica de transmisión se ha observado WSSV en el citoplasma de las células con núcleos picnóticos, en la hipodermis del estómago (Rodríguez 2003).

2.4. INFECCIONES CRÓNICAS DE WSSV

La literatura ha reportado la presencia de WSSV en infecciones no letales (Quintero *et al.* 1999) indicando que al igual que en otros síndromes virales como Parvovirus hepatopancreático (HPV) y Virus de la Necrosis Infecciosa Hipodérmica y Hematopoyética (IHHNV), este virus puede presentarse en infecciones crónicas, es decir, existiendo una alta prevalencia del virus, con ausencia de lesiones histológicas visibles (Flegel *et al.* 2004). Por otra parte, en las infecciones con WSSV se ha podido detectar la presencia de esferoides en el órgano linfoide (Rodríguez *et al.* 2003). Es decir, habría evidencia de que las infecciones crónicas con WSSV pueden ser similares a las ocasionadas por el virus del Síndrome de Taura (TSV). Según estudios realizados en el modelo TSV, no se observaron signos clínicos en la fase aguda, pero sí la formación y morfogénesis de esferoides en el órgano linfoide (Hasson *et al.* 1999).

El órgano linfoide y los esferoides juegan un rol importante en la eliminación de patógenos invasores, incluyendo los virus, lo que se realiza por endocitosis. Los esferoides del órgano linfoide se asemejan a las gigantes células formadas en mamíferos por activación de macrófagos residentes o migrantes durante una respuesta inflamatoria crónica (Cotran *et al.* 1989).

Los tipos de esferoides encontrados descritos en infecciones con TSV son tres (Hasson *et al.* 1999) :

Tipo A. Se desarrollan por la activación de los fagocitos en el túbulo del órgano linfoide, quienes secuestran al TSV.

Tipo B. Este tipo de esferoide ha sido analizado por hibridación *in-situ*, observándose reacción positiva para TSV. La persistencia de la señal positiva por largos periodos de tiempo sugiere que el virus se replica en los esferoides tipo B, considerándose por lo tanto a esta patología como una característica de infección crónica.

Tipo C (terminal). Estos esferoides son negativos a TSV. Se caracterizan por tener células con condensación nuclear basofílica, reducción del tamaño de las células y progresiva atrofia que conduce a la degradación, sin respuesta inflamatoria. Estos cambios son característicos de células apoptóticas (Thompson 1995, Hasson *et al.* 1999), lo que sugiere que en infecciones con TSV, los esferoides del órgano linfoide se autodestruyen, resultando en la eliminación del virus (Hasson *et al.* 1999).

2.5. APOPTOSIS

Morfológicamente existen dos formas comunes de muerte celular en tejidos, la apoptosis y la necrosis. La necrosis es la más frecuente y se presenta cuando las células mueren de un severo y repentino daño, provocado por ejemplo por hipertermia, traumas físicos o químicos. En la necrosis existen cambios tempranos en la forma y función mitocondrial. La célula es incapaz de mantener la homeostasis. La membrana plasmática puede ser el mayor sitio de peligro, perdiendo la habilidad para regular la presión osmótica, la célula se infla y se rompe (Cohen 1993). El contenido celular es esparcido en los espacios de los tejidos provocando una respuesta inflamatoria.

La apoptosis es un proceso extenso y morfológicamente distinto de muerte celular jugando un rol importante en varios procesos fisiológicos incluyendo los aspectos inmunitarios (Cohen 1993). La muerte de la célula puede ser programada y aleatoria. Por ejemplo, como en el desarrollo de linfocitos B, cerca de 95 % células morirán por diversas razones, pero es imposible predecir de antemano cuales serán. Frecuentemente, la señal de muerte viene dada por el medio ambiente, como durante la exposición o retiro de hormonas o factores de crecimiento. Los cambios morfológicos celulares en apoptosis son numerosos y distintos a la necrosis. La membrana plasmática en apoptosis comienza a doblarse de manera más pronunciada que en la necrosis. Este fenómeno ha sido llamado zeiosis. Luego los procesos de zeiosis rompen la célula apoptótica dejando pequeñas piezas (cuerpos apoptóticos). Por microscopía electrónica se observa una extremada condensación del citoplasma con una apariencia normal de los organelos. Se ha observado así mismo hinchazón de las cisternas del retículo endoplasmático. (Cohen 1993, Tsujimoto 1997). El DNA en la cromatina condensada presenta hiperchromasia y se marca intensamente con sondas fluorescentes. La envoltura nuclear se desintegra, la

laminina sufre degradación proteolítica y por último, se produce la fragmentación nuclear (Abbas *et al.* 2000, Duvall *et al.* 1985). En la apoptosis, a diferencia de la necrosis, las células no se hinchan ni revientan. Un paso temprano en apoptosis *in vivo* es el reconocimiento de las células y fragmentos celulares por células fagocíticas no profesionales (Savill 1994, Cohen 1993). Las células no liberan su contenido intracelular y no inducen una respuesta inflamatoria (Redondo *et al.* 2005)

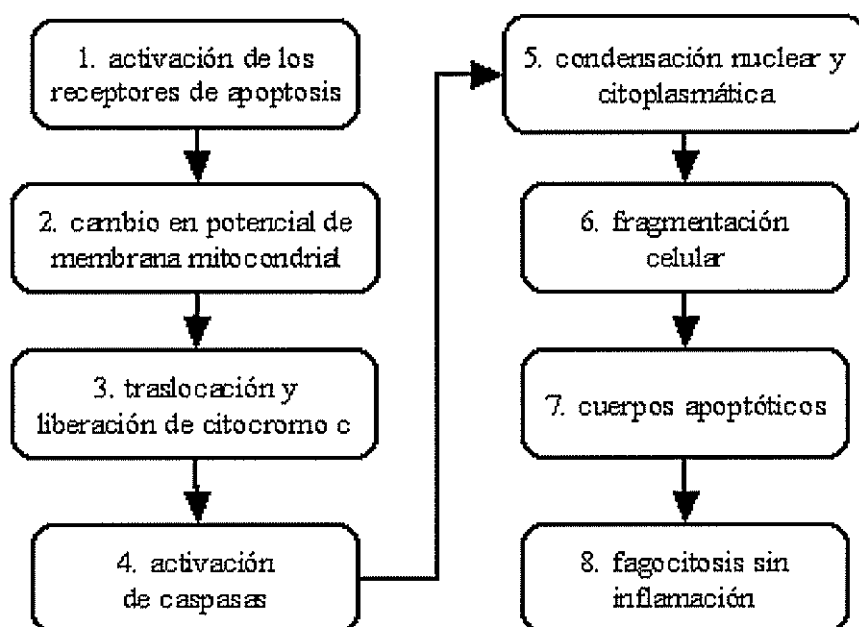


Figura 1. Posibles etapas de la apoptosis. 1: fase de inducción; 2,3 y 4. fases efectoras; 5,6,7 y 8. fase de degradación. (tomado de Pacher, 2006).

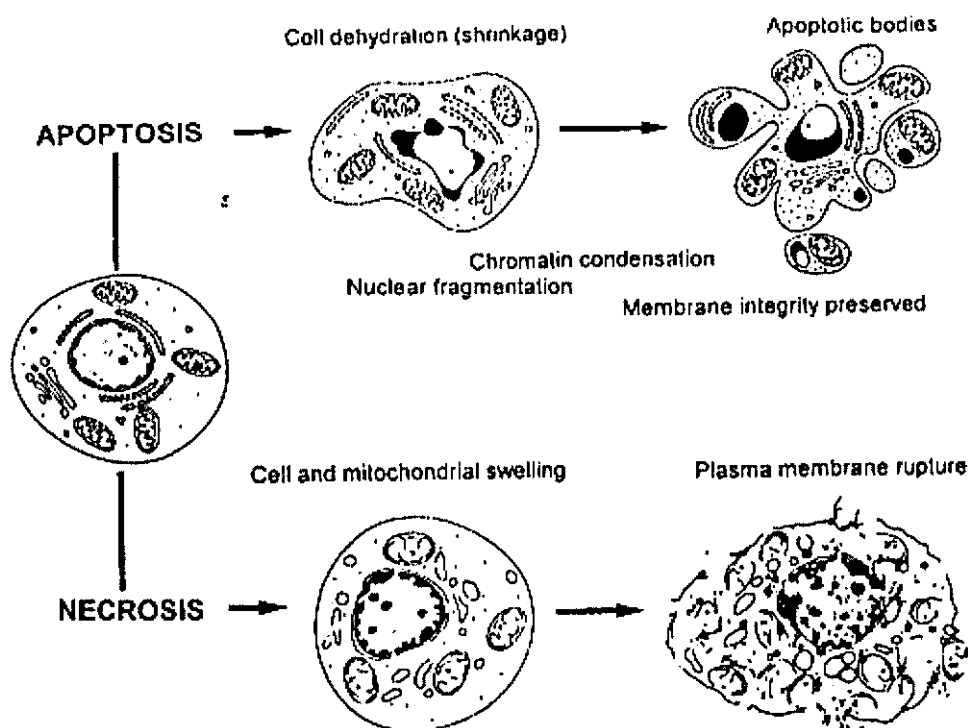


Figura 2. Apoptosis y Necrosis (tomado de Magno y Joris, 1995)

La apoptosis en parte se encuentra mediada por la activación de las caspasas. Estas proteasas son sintetizadas como proenzimas que pueden ser activadas mediante autoproceso por otros miembros de la familia de las caspasas. La apoptosis es un punto importante para el estudio de la respuesta del camarón ante patógenos virales. Phongdara *et al.* (2006), usando una secuencia genética conservada aislaron el gen de la caspasa-3 (cap-3) de *P. Merquiensis* infectado con WSSV. Además se observó que existió un alto nivel de expresión producto de este gen en animales infectados con WSSV.

En *P. japonicus* se realizó un estudio en el cual se inyectó dosis altas y bajas de WSSV y se detectó apoptosis por medio de TdT – mediated dUTP – biotin Nick End Labeling. (TUNEL). A altas dosis de WSSV se observó una alta incidencia de apoptosis con un 100% de mortalidad, mientras que a baja dosis la mortalidad fue del 0%. A una misma dosis de WSSV, los camarones inmunizados tuvieron menor apoptosis que los camarones

no inmunizados, sugiriendo que la apoptosis no es el principal protector contra infecciones virales en camarón. (Wu and Muroga 2004).

Wongprasert *et al.* 2003 han encontrado también que en *P. monodon* el nivel de apoptosis se incrementa en las células infectadas por WSSV. Por otra parte, en estudios realizados en *P. monodon* infectado con el virus de la cabeza amarilla (YHV, por sus siglas en inglés) han observado que la apoptosis está relacionada a una alta mortalidad (Khanobdee *et al.* 2002).

Por el contrario, Granja *et al.* 2003 proponen a la apoptosis como el principal mecanismo antiviral del camarón. Ellos han observado que existe mayor índice de apoptosis en juveniles de *P. vannamei* que se encontraban a 32°C con relación a los que se encontraban a 25°C. Por lo tanto consideran a la apoptosis como un controlador del virus en condiciones de hipertermia. Sin embargo, la apoptosis no sería suficiente para eliminar el virus. Cuando la temperatura en el agua disminuye se observan altas mortalidades.

Según Blake (2004), la apoptosis puede ser considerada una de las primeras respuestas de los camarones a la infección viral debido a que esta fue más fuerte en animales que sobrevivieron a infección subletales por baño que en los que desarrollaron una infección aguda.

2.5.1. Detección de apoptosis mediante microscopía óptica

En la apoptosis la condensación y/o fragmentación de la cromatina y los cuerpos apoptóticos puede observarse con el microscopio óptico utilizando la tinción

convencional de hematoxilina-eosina (H&E). Sin embargo, estas modificaciones pueden observarse también en la necrosis.

2.5.2. Detección de apoptosis mediante microscopía electrónica

En microscopía electrónica las características ultraestructurales incluyen la preservación temprana de los organelos intracelulares, así como de las membranas nuclear y plasmática. La condensación o fragmentación de la cromatina, la cual debe aparecer extremadamente electrodensa y homogénea, observándose negra en la microfotografía de microscopía electrónica con bordes bien definidos, localizándose de manera subyacente a la membrana nuclear o marginada dentro del espacio nuclear.

La necrosis se caracteriza por la floculación moderada de la cromatina nuclear y su marginación en pequeños e indefinidos agregados, así como por la hinchazón de todos los compartimientos citoplasmáticos con ruptura y/o disolución del citoplasma, de los organelos y membrana nuclear.

2.5.3. Detección de apoptosis mediante electroforesis de ADN

Wyllie (1980) demostró que el criterio morfológico de identificación de la apoptosis se relacionaba con la activación de una enzima endonucleasa endógena, Caspasa. Esta enzima corta el ADN genómico durante el proceso de condensación de la cromatina y crea un patrón en escalera de fragmentos internucleosomales de ADN, de aproximadamente 180-200 pares de bases visualizados en un gel de agarosa por electroforesis.

El ADN de las células necróticas se fragmenta de forma irregular o al azar en numerosas partículas sin un patrón definido por endonucleasas, y se visualiza en forma de mancha por electroforesis en gel de agarosa.

2.5.4. TdT – mediated dUTP – biotin Nick End Labeling (TUNEL).

Gavrieli *et al.* 1992, desarrollaron la técnica de marcaje *in situ* denominada TUNEL (TdT – mediated dUTP – biotin Nick End Labeling). TUNEL consiste en la incorporación de nucleótidos marcados con biotina en los grupos hidroxilos (3'OH) terminales que han quedado expuestos durante el proceso de fragmentación de la doble cadena de ADN por activación de la endonucleasa endógena. Este grupo hidroxilo es utilizado como sustrato por la enzima transferasa terminal de deoxinucleótidos (TdT), la cual incorpora un polímero de dUTP – biotina, que a su vez, es reconocido por la avidina conjugada a la peroxidasa y visualizado por una reacción con peróxido de hidrógeno y el cromóforo 3-amino-9-etil-carbazol (AEC). Los núcleos se observan con una coloración café-rojiza, indicativa de marcaje TUNEL positivo.

2.5.5. Detección de apoptosis mediante citometría de flujo

Olano *et al.*(2004), aplicaron la citometría de flujo para cuantificar núcleos fragmentados (apoptóticos) y marcados con dUTP– biotinilado utilizando TdT, e identificados con estravidina conjugada o FITC (Flourescent intensity of TUNEL-labeled cytometry)- (TUNEL). Aunque esta técnica ofrece la posibilidad de una búsqueda más precisa de núcleos fragmentados entre millones de núcleos en el tejido cerebral, presenta el mismo principio de marcaje de las técnicas de Gavrieli (Servet 2005. Flores 2002)

2.5.6. Detección de apoptosis mediante tinciones con fluorescencia

Para la observación de las células teñidas con colorantes fluorescentes pueden emplearse los colorantes Hoechst 33258 o el colorante denominado DAPI, mediante ellas se pueden identificar fácilmente características como la condensación de la cromatina y la

fragmentación nuclear, así mismo se pueden evaluar y cuantificar un número considerable de células.

La desventaja de esta técnica radica en que se necesita un sistema de detección de la fluorescencia y por lo tanto son de un alto costo (Flores 2002).

2.6. RESISTENCIA

Siendo el WSSV uno de los patógenos más letales para el camarón de cultivo, se han realizado diferentes investigaciones sobre resistencia. Considerando resistencia genética, los resultados encontrados señalan una baja heredabilidad (Gitterle *et al.* 2005) y una relación inversa entre crecimiento y resistencia al WSSV (Gitterle *et al.* 2005). Por otra parte, en el plano inmunitario, varios estudios demuestran que el camarón es capaz de desarrollar una resistencia contra el WSSV Wu *et al.* (2002) encontraron en el camarón *P. vannamei* resistencia al WSSV a partir de la tercera o cuarta semana después de una exposición, persistiendo durante un mes más a condiciones de temperatura de 24 °C. La resistencia observada fue ocasionada por un factor neutralizante humoral en el plasma del camarón. Por otra parte varios desafíos realizados en animales individualizados muestran una baja mortalidad, indicando que los animales son capaces de enfrentar un primer encuentro con el virus, siendo la reinfección la causante de las mortalidades. (Sonnenholzner, *et al.*, 2002b)

Otros factores que inciden sobre la expresión de la resistencia al WSSV son las condiciones ambientales, las cuales en los sistemas de cultivo pueden traducirse en estrategias de manejo. En este sentido la temperatura es el factor ambiental de efecto más impactante sobre la resistencia del camarón al WSSV (Bayot 2005,).

2.6.1. Resistencia basada en hipertermia

La especie de camarón *P. vannamei* es mundialmente cultivada en aguas con un amplio rango de temperaturas (18° - 33°C), considerándose el rango óptimo entre 28° a 31°C (Wyban *et al.* 1995), siendo 35 ° C el límite máximo de resistencia a altas temperatura por parte de el camarón *P. vannamei*. A esta temperatura se observó altas supervivencias (Sonnenholzner 2002a). Lo que no ocurrió a 38°C, temperatura a la cual la mortalidad fue del 100% de los animales (Sonnenholzner 2002a). Además se ha observado que la aplicación de hipertermia incrementa la expresión de la proteína de estrés 70 (HSP70, por sus siglas en inglés), la misma que tendría un efecto protector para el camarón disminuyendo la tasa de replicación del GAV (de la Vega *et al.* 2006).

Según pruebas realizadas por varios autores se ha observado que la resistencia al WSSV mejora al existir condiciones de hipertermia 32°-33°C, generándose a esta temperatura una respuesta inmune en el camarón, correlacionada a una alta supervivencia (Sonnenholzner *et al.* 2002a, Vidal *et al.* 2001). Resultados similares se han reportado en el caso de TSV (Montgomery-Brock *et al.* 2003). La alta supervivencia ante desafíos con WSSV observada en condiciones de hipertermia parece guardar relación con el grado de infección, y no con la prevalencia. La técnica de PCR, sugiere que el virus es capaz de infectar a los camarones a cualquier temperatura y que las supervivencias a 33°C, no serían causadas por inactivación viral, sino por alguna modificación fisiológica del camarón a esa temperatura (Sonnenholzner *et al.* 2002a).

Según estudios realizados en el periodo posterior a la aparición de WSSV se reporta una relación significativa entre la temperatura superficial del mar con la producción camaronera del Ecuador. Estos resultados indican que la alta variabilidad climática

afecta a la producción camaronera y a la ocurrencia de las enfermedades virales, especialmente durante los episodios fríos como La Niña (Chavarría 2003). En la época seca-fría es menor la temperatura superficial del mar mientras que en la época húmeda-cálida, la temperatura es mayor, existiendo entonces una menor presencia de WSD (Rodríguez *et al.* 2002). Temperaturas bajas en los cultivos permiten al WSSV propagarse y causar severas mortalidades a partir del segundo día posterior a la disminución de este parámetro en los estanques (Sonnenholzner *et al.* 2002a). Considerando que la alta temperatura disminuye la incidencia del WSSV, la utilización de invernaderos es hasta la fecha la alternativa más prometedora para intensificar los cultivos (Sonnenholzner *et al.* 2002c.)

2.6.2. Resistencia basada en inmunomodulación: Inmunoestimulantes

Los inmunoestimulantes son sustancias químicas las cuales activan a los glóbulos blancos (leucocitos). Pueden inducir la resistencia de los animales a infecciones, y disminuir el riesgo de enfermedades ocasionadas por estrés. Los inmunoestimulantes deben ser administrados especialmente cuando los organismos son particularmente susceptibles a agentes infecciosos. El más prometedor grupo de inmunoestimulantes son los β -1,3 /1-6 glucanos ya que tienen una buena definición estructural química y un modo de acción en el sistema inmune (Raa 2000). Se los obtiene de hongos (*Maitake*, *Lentinan*, *Schizophyllan*) y de la pared celular de levaduras, especialmente de la levadura de pan *Saccharomyces cerevisiae* (Raa 2000).

Se ha observado que los β -1,3-glucanos pueden actuar como inmunoestimulantes ya que actúan sobre la actividad de la fenoloxidasa (Sung *et al.*1993, Sung *et al.* 1996, Devaraja *et al.* 1998), incrementándose la actividad fagocítica, la adhesión celular y

Generación de O_2^- (Chang *et al.* 2000). Encontrándose que inducen la resistencia ante patógenos como vibrios en *P. monodon* (Sung *et al.* 1993, Sung *et al.* 1996, Devaraja *et al.* 1998) y sobre la resistencia al WSSV. Según estudios realizados por Huang and Song 1999 esta resistencia puede transmitirse de forma vertical (madre a hijos) observándose una resistencia al virus tanto por parte de las madres, como de las larvas. Proporcionando altas tasas de supervivencias (Chang *et al.* 2000).

Otras sustancias como las vitaminas pueden mejorar la respuesta inmune al influir sobre la eficacia del funcionamiento celular, pero no pueden ser definidos como inmunoestimulantes ya que no provocan una situación de alerta en el sistema inmune (Rodríguez, 2005a).

López *et al.* (2003) establecieron ciertos efectos de la utilización de β -1,3-glucanos y pequeñas dosis de vitamina C (ácido ascórbico), en la alimentación y el sistema inmune en juveniles de *P. vannamei*. Después de 40 días de alimentación con dieta específica y durante 48 horas después un cambio brusco de salinidad (35 – 0%), se observó una significativa tasa de crecimiento en camarones tratados con β -1,3-glucanos o con vitamina C. Con la utilización de vitamina C se observó altos niveles de proteína en la hemolinfa, altos niveles de hemocitos granulados y actividad profenol oxidasa (proPO), en comparación con los demás tratamientos. El estrés de salinidad indujo un rápido uso de reservas de triacylglyceroles (TAGs), el colesterol fue reducido en la hemolinfa, y probablemente usado como un recurso de energía o síntesis en la glándula digestiva. El incremento en la glándula digestiva de glicógeno 24 horas después de el cambio brusco de salinidad evidenció el uso de las reservas del camarón. En general, después del cambio brusco de salinidad, las células en la hemolinfa se incrementaron en camarones

tratados con β -1,3-glucanos y decrecieron en los camarones tratados con vitamina C, mientras que el sistema proPO fue menor en todos los camarones después del cambio brusco de salinidad (López *et al.* 2003).

2.6.3. Otras alternativas de Resistencia basada en inmunomodulación

La pre exposición al WSSV en *P. japonicus* puede permitir una “respuesta quasi-inmuno” que permitiría al camarón enfrentar con mayor éxito un segundo encuentro con el virus (Venegas *et al.* 2000). Se han realizado estudios con “vacunas” para resistencia al WSSV, usando WSSV inactivado, proteínas recombinantes de WSSV (VP 26, VP 28) o estimulantes (β -1,3-glucanos o *Vibrio penaeicida*) en *P. japonicus*. Los resultados mostraron que las proteínas recombinantes de WSSV otorgan una alta resistencia al WSSV (50% y 95% de supervivencia) (Namikoshi *et al.* 2004). Un estudio similar se ha realizado en *P. monodon*, inmunizando los animales con proteínas recombinantes de WSSV (VP 19, VP 28) obteniendo también mejores supervivencia (Witteveldt *et al.* 2004). El uso de proteínas recombinantes con fines de inmunización podría considerarse una nueva estrategia de control viral en camarón y otros crustáceos.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se realizó en el Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas (Fundación CENAİM-ESPOL) del 29 de Julio del 2005 hasta el 25 de enero del 2006

3.1. MATERIAL BIOLÓGICO

Se utilizaron post larvas (PL) 25 de *P. vannamei*, cuyo peso promedio inicial fue de 0.27 g. Las larvas fueron levantadas en el centro y cultivadas siguiendo el protocolo CENAİM, el mismo que incluye la adición de probiótico *V. alginoliticus* (ili) desde Nauplio 5 a PL 4 y descarta el uso de agentes quimioterapéuticos. Desde PL 4 los animales fueron transferidos a tanques exteriores cubiertos con plástico, a fin de mantener la temperatura alrededor de 27 ± 1 °C. Inicialmente, la alimentación se realizó cada 3 horas con 1 gramo/día de Molino 50 # 1 (Alimentsa), incrementando la cantidad de alimento a 4 gramos/día al cabo de 7 días. Posteriormente, los animales (PL 45) fueron llevados a la sala 23 a fin de iniciar el experimento.

3.2. PREPARACIÓN DE LA SALA DE EXPERIMENTACIÓN

La preparación de la sala se inició con la limpieza del reservorio de agua y de los 16 tanques de 250 litros a ser utilizados. A fin de contar con un sistema “air lift” de circulación de agua, a los tanques cónicos se les implementó, una base constituida por una malla negra gruesa y una malla fina roja sobre la que se colocó conchilla. La manguera de aire y la piedra difusora se colocaron al interior de un tubo central, el cual tenía perforaciones en la base (Figura 3), permitiendo oxigenar y recircular el agua del fondo, creando un sistema de circulación a través de la conchilla.

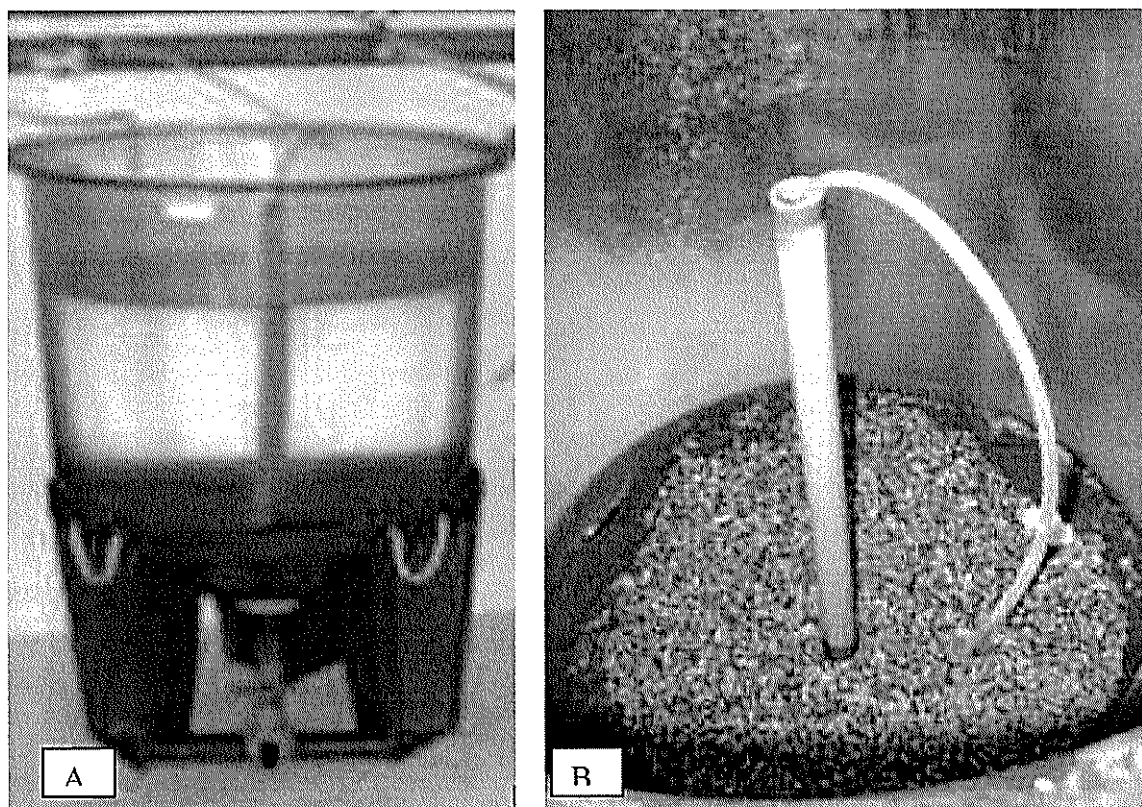


Figura 3. Unidades experimentales utilizadas en el bioensayo. A) Tanque cónico con tubo y malla, B) base de malla y conchilla

El agua de mar utilizada para el experimento estuvo a 35 ppt de salinidad y fue almacenada en el reservorio donde se realizó un tratamiento de clorinación y declorinación antes de iniciar el experimento (500 ml de cloro para 5 toneladas de agua de mar, y 125 ml de tiosulfato). El agua pasó por un filtro de piola de 200 μm , antes de ser distribuída en los tanques, (Figura 4).

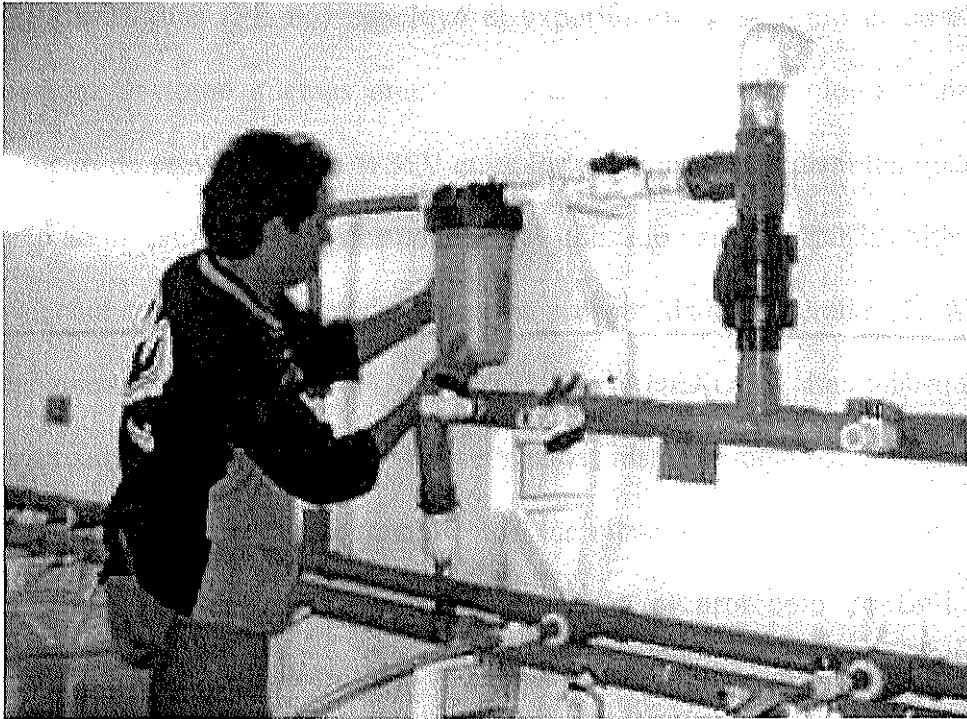


Figura 4. Sistema de filtración de Agua

3.3. DISEÑO EXPERIMENTAL

El diseño del experimento fue factorial. Los factores fueron, temperatura con dos niveles (24°C y 31°C) y el segundo factor β -1,3-glucanos con dos niveles (incluidos en la alimentación y no incluidos en la alimentación, a razón de 150 mg/kg de alimento).

En total hubo cuatro tratamientos con 4 réplicas por cada tratamiento y una población de 37 animales por tanque ($n = 37$; $N = 148$ por tratamiento).

3.4. MUESTREO

Se realizó un primer muestreo en PL 25 para evaluar la prevalencia inicial de WSSV en la población, para lo cual se utilizó una muestra de 100 individuos para PCR (tamaño necesario para determinar la prevalencia de infección de WSSV en una población con un 95% de confianza y un error del 12%) y 10 individuos para análisis de histología.

Luego de 21 días (PL 66) concluyó el experimento y se tomó el peso de toda la población. Se tomó además muestras para realizar histopatología y para detectar diferencias de prevalencia de WSSV entre los animales de los distintos tratamientos. El tamaño de muestra (32 animales por tanque) utilizado para detectar las diferencias en la prevalencia se determinó considerando las probabilidades esperadas de WSSV en las poblaciones estudiadas, según Des Clers (1994) (ANEXO 1). Las muestras para PCR fueron fijadas en etanol al 95%. Para el análisis histopatológico se tomaron 5 animales por tanque (20 animales por tratamiento), los mismos que fueron fijados en solución Davidson y analizados histológicamente según el protocolo de Bell y Lightner (1998)(ANEXO 2). Las mismas muestras sirvieron para detectar WSSV mediante hibridación *in situ* (HIS) y para detectar apoptosis mediante TUNEL System (Promega, 2005).

3.5. ANÁLISIS MEDIANTE LA TÉCNICA DE PCR

Para la utilización de esta técnica se realizó la extracción de tejido de la cabeza por medio del Método de CTAB descrito por Lo *et al.* (1996). Habiendo realizado la extracción se procedió al análisis de detección de WSSV con la técnica del PCR anidado, utilizando los iniciadores de Kimura *et al.* (1996). Para el control interno del ADN del camarón se utilizó los iniciadores de 441-bp 18S rRNA (Tang and Lightner 2000).

3.6. ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO

Las observaciones en microscopio óptico incluyeron:

- Nivel y tejidos con lesiones típicas de WSD
- La presencia de otra patología
- Necrosis

- Picnosis
- Kariorrhexis
- Infiltración de hemocitos en:
 - Tejido conectivo del estómago
 - Órgano linfoide
 - Región oral
 - Músculo
 - Espacios hemales
 - Glándula antenal
- Esferoides :
 - Ectópicos
 - Tipo de esferoides A, B, C, en el órgano linfoide y la degradación del mismo
- Encapsulaciones

Con estas observaciones se estableció un índice histopatológico para WSD. Para construir este índice se consideró: glándula antenal (GA), epitelio cuticular (EC), epitelio del estómago (Estmg), tejido conectivo (TC), branquias (BRQ), tejido hematopoyético (TH), órgano linfoide (OL), intestino (INT), corazón (CRZ) y ojo. El nivel de severidad se realizó considerando el número de células infectadas por 5 campos, tal como ha sido descrito por Lightner (1996).

3.7. DETECCIÓN DEL WSSV MEDIANTE HIBRIDACIÓN *In-situ* EN ANIMALES DE BAJO NIVEL DE INFECCIÓN

Este análisis se realizó en todas las muestras que dieron nivel 1 de infección por histología y en cuatro muestras negativas por tratamiento, tomando aleatoriamente una por unidad experimental. Los cortes fueron colocados en placas cargadas positivamente (Fisher Scientific) y se procedió a realizar la hibridación *in-situ* para WSSV utilizando un kit comercial (DIAGXOTICS), siguiendo las recomendaciones del fabricante (ANEXO 4).

3.8. DETECCIÓN DE APOPTOSIS

Los cortes para detección de apoptosis también se colocaron en placas cargadas positivamente y se utilizó el Kit de Apoptosis DeadEnd™ Colorimetric TUNEL System, siguiendo el protocolo descrito por el fabricante (Promega) (ANEXO 5).

3.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

3.9.1. Análisis de varianza

Los pesos obtenidos de los tratamientos, fueron sometidos a prueba de normalidad con la utilización del programa Data Desk, y la gráfica de “Normal probability plot”. Se determinó la homogeneidad de varianza utilizando la prueba de Fmax.

3.9.2. Tablas de contingencia

Se realizó un estudio observacional de cohortes para los datos obtenidos con las diferentes técnicas de diagnóstico empleadas (PCR, histología, hibridación *in-situ*). Para cada uno de los niveles para los factores temperatura (24°C y 31 °C) y β -1,3-glucanos (ausencia y presencia), se analizó la presencia posterior de la infección y enfermedad al

cabo de 21 días de iniciado el experimento, para lo cual se construyeron tablas de contingencia. Con el uso de estas tablas se determinó los residuos normalizados de Pearson, que se observaron en cada una de las celdas de la tabla de contingencia. Donde valores mayores a 1.96 y menores a -1.96 mostraron evidencias a favor del rechazo de la hipótesis nula, en la cual las frecuencias observadas y esperadas en un determinado nivel de la variable explicatoria son iguales, sugiriendo una asociación entre ocurrencia de la enfermedad y el nivel de la variable en cuestión. Además se calcularon los riesgos relativos (RR), donde los valores significativamente mayores de 1 indicaron un incremento del riesgo de presentación de la enfermedad en los animales en el nivel de exposición, equivalente a tantas veces dicho valor, comparados con los animales en el nivel de referencia. En este caso el nivel de exposición se denomina **Factor de riesgo**. Los valores menores de 1 indicaron una disminución del riesgo de la enfermedad en los animales en el nivel de exposición, equivalente a tantas veces el inverso del factor, comparado con los animales en el nivel de referencia. En este caso se denomina **Factor de Protección**. En esta tesis, en la mayoría de los casos, los animales sometidos a 31°C se colocaron en el nivel 1 exposición. Mientras que, los animales a los que no se adicionó β -1,3-glucanos (ausencia), se colocó en el nivel 1 exposición. Se calculó un margen de error representado por un intervalo de confianza. Cuando el valor 1 estuvo incluido en el intervalo, se consideró que no existieron elementos de juicio suficientes para afirmar que el factor influye en la enfermedad. Los intervalos de confianza (IC) (95%) y sus límites inferiores y superiores son reportados en el documento como IC (límite inferior – límite superior). Para probar la hipótesis de que las prevalencias en las dos poblaciones que se compararon fueran las mismas se utilizó la prueba de significancia de chi-cuadrado (χ^2), utilizando el programa SPSS versión 11.0. Además se calculó el coeficiente de Cohen's

Kappa para determinar el valor de concordancia entre los resultados obtenidos por histología, e hibridación in-situ.

3.9.3. Modelo de regresión logística binaria

El objetivo primordial que resuelve este procedimiento estadístico es el de modelar como influye la presencia o no de diversos factores y el valor o nivel de los mismos en la probabilidad de aparición de un suceso, habitualmente dicotómico ya que la regresión logística permite:

1. Estimar la relación entre dos variables teniendo en cuenta la presencia de otros factores. Sin embargo, se debe cumplir como asunción que la relación entre la variable independiente y la probabilidad del suceso no cambie de sentido, ya que en ese caso no sirve el modelo logístico.
2. Construir un modelo que permita predecir el valor de la variable dependiente (probabilidad del suceso) Molinero (2001).

Con la utilización de la regresión logística se determinó las probabilidades de ocurrencia de WSSV bajo distintas condiciones de tratamiento. Ello se basó en la formula:

$$\text{Probabilidad } (X_1, X_2) = (e^{\alpha + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2}) / [1 + (e^{\alpha + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2})]$$

Donde:

X_1 = representa la ausencia o presencia de β -1,3- glucanos

X_2 = representa las dos temperaturas empleadas.

α y β = variables proporcionadas por la regresión logística.

El “odds” de un evento ocurriendo es la razón de la probabilidad de que ocurra versus la probabilidad de que no ocurra, y esta representado por el exponente de Beta en la regresión logística.

Mediante este análisis se evaluó el efecto de los dos factores, temperatura y β -1,3-glucanos en la presencia o ausencia de WSSV, utilizando los datos de PCR, histología e hibridación *in-situ*.

4. RESULTADOS

El estudio realizado tuvo 2 fines: 1) Determinar si la aparición de larvas positivas al WSSV en una población aparentemente negativa es solo una cuestión de tiempo. Entendiéndose como tiempo al lapso que tardaría el virus en transmitirse a través del agua, desde individuos positivos presentes desde la larvicultura, o al tiempo que emplea el virus en replicarse dentro de cada individuo hasta alcanzar niveles detectables mediante PCR. 2) Determinar si tratamientos como β -1,3-glucanos y temperatura son capaces de influir tanto sobre el nivel de infección dentro de cada animal, como sobre la capacidad de los individuos para limitar la propagación viral.

La prevalencia de WSSV en la población inicial antes del bioensayo (PL 45) determinada por PCR e histología fue del 0%. A los 21 días (PL 66), cuando se concluyó el ensayo, se evaluó peso y presencia de WSSV por análisis de PCR en todos los tratamientos. Se observó lesiones de mancha blanca por histología, hibridación in-situ, y apoptosis.

4.1. PESO AL FINAL DEL BIOENSAYO (PL66)

Los datos de peso por tratamiento y réplica se presentan en la tabla 1. Al verificar las asunciones del ANOVA se determinó que los datos obtenidos fueron normales y homogéneos (anexo 6). Sin embargo, en la tabla 2 se observa que a un 95% de confianza no existió diferencias significativas en los pesos por efectos de los tratamientos ($P > 0.05$). Tampoco se observó interacción entre los dos factores ($P > 0.05$).

Tabla 1. Pesos obtenidos en PL 66 en dos condiciones de temperatura y alimentación (presencia y ausencia de β -1,3-glucanos).

TEMPERATURA °C	β -1,3-glucanos	TANQUE	PESOS (g)
31	Presencia	T2	1.75
		T4	1.44
		T5	1.21
		T15	1.32
31	Ausencia	T8	1.46
		T10	1.74
		T12	1.60
		T14	1.65
24	Presencia	T1	1.41
		T7	1.19
		T9	1.14
		T13	1.48
24	Ausencia	T3	1.30
		T6	0.98
		T11	1.29
		T16	1.65

Tabla 2. ANOVA para pesos finales

	df	SC	MS	F -ratio	Prob
Constante	1	31.9508	31.9508	750.20	≤ 0.0001
β -1,3-glucanos	1	0.033306	0.033306	0.78203	0.3939
Temperatura	1	0.187056	0.187056	4.3921	0.0580
β -1,3-glucanos * Temperatura	1	0.033306	0.033306	0.78203	0.3939
Error	12	0.511075	0.042590		
Total	15	0.764744			

4.2. ANÁLISIS DE PRESENCIA, RIESGO Y PROBABILIDAD DE WSSV EN MUESTRAS ANALIZADAS MEDIANTE PCR

En lo concerniente al factor temperatura, en la Tabla 3 se observa que de 264 animales mantenidos a 24°C, 21 se encontraron infectados, mientras que a 31 °C, de 264 animales empleados en el experimento, 15 se encontraron infectados. Ninguno de los residuos fue mayor de 1.96 o menor de -1.96 , por lo que no se detectó diferencias significativas en la presencia o ausencia de WSSV entre los camarones tratados a las temperaturas de 24 y 31°C.

Tabla 3. Tabla de contingencia entre infección de WSSV y temperatura en las muestras analizadas mediante técnica de PCR

VARIABLE	NIVEL	ESTADISTICO	INFECCIÓN		TOTAL
			No infectados	Infectados	
TEMPERATURA (°C)	24	n Residuos	243 -1.00	21 1.00	264
	31	n Residuos	249 1.00	15 -1.00	264
TOTAL			492	36	528

No se encontró evidencias para rechazar la hipótesis de que la prevalencia de infección en los dos niveles de temperatura fueron iguales ($\chi^2 = 1.073$, Gl = 1, P = 0.3). En el mismo sentido, no se encontró diferencias significativas a un 95% de confianza en el riesgo relativo de infección en los animales sometidos a 24°C con respecto a los de 31°C (RR≈1).

En lo concerniente al factor β -1,3-glucanos, en el análisis con tablas de contingencia se pudo observar una diferencia significativa existiendo menor presencia de animales con WSSV cuando se utilizó β -1,3-glucanos (Tabla 4).

Tabla 4. Tabla de contingencia entre infección de WSSV y β -1,3-glucanos en las muestras analizadas por PCR

VARIABLE	NIVEL	ESTADISTICO	INFECCIÓN		Total
			No infectados	Infectados	
B-1,3-glucanos	Ausencia	n Residuos	234 -4.10	30 4.10	264
	Presencia	n Residuos	258 4.10	6 -4.10	264
Total			492	36	528

Realizando la prueba de χ^2 se pudo determinar que existió un incremento significativo en la prevalencia de WSSV al no utilizar β -1,3-glucanos ($\chi^2 = 17.171$; Gl = 1; p = 0.000)

El análisis de riesgo mostró que el riesgo de que los camarones se infecten con WSSV cuando no se usa β -1,3-glucanos en la alimentación es 5 veces mayor que cuando se usa β -1,3-glucanos en la alimentación (RR = 5.0, IC = 2.1-11.8).

Utilizando el modelo de regresión logística se determinó que al cabo de 21 días con la utilización de β -1,3-glucanos se disminuyó de manera altamente significativa (P < 0.001) la probabilidad de incidencia de WSSV (Tabla 5). En tanto que, la temperatura no influyó significativamente sobre la probabilidad de incidencia (P = 0.294) (Tabla 5).

Tabla 5. Modelo de regresión logística que explica la contribución de la temperatura y β -1,3-glucanos sobre la infección de WSSV en las muestras analizadas mediante PCR.

	Beta	Error estándar de Beta	Wald	gl	Sig P-value	Exp (Beta) = Odds ratio	IC 95% para Exp (Beta)	
							Limite inferior	Limite superior
β -1,3-glucanos	-1.710	0.456	14.028	1	0.000	0.181	0.074	0.443
Temperatura	0.373	0.356	1.100	1	0.294	1.452	0.723	2.915
const	-2.254	0.281	64.257	1	0.000	0.105		

IC= Intervalo de confianza

El nivel de referencia para β -1,3-glucanos es la presencia y para la temperatura es 24°C

Los β -1,3-glucanos y la temperatura fueron modelados como variables categóricas

Calculando la probabilidad de ocurrencia de infección, se obtuvo que ésta es menor cuando se combinan los dos factores, β -1,3-glucanos en la alimentación y alta temperatura (31 °C) (Tabla 6).

Tabla 6. Probabilidad de ocurrencia de infección de WSSV en función de temperatura y β -1,3-glucanos obtenidas de muestras analizadas con la técnica de PCR.

TEMPERATURA (°C)	β -1,3-glucanos	PROBABILIDAD DE OCURRENCIA
31	Presencia	0.0186
24	Presencia	0.0270
31	Ausencia	0.0950
24	Ausencia	0.1323

4.3. ANÁLISIS DE PRESENCIA, RIESGO Y PROBABILIDAD DE WSD EN ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO.

Considerando el factor temperatura se observó mediante análisis con tablas de contingencia que de 39 animales bajo condiciones de temperatura a 24°C, 21 presentaron lesiones de WSD (Tabla 7). Mientras que, a 31°C, de 40 animales, 13 tuvieron lesiones de WSD. Sin embargo, la prueba de χ^2 no mostró diferencias significativas ($\chi^2 = 3.670$; $gl = 1$; $P = 0.055$) para el factor temperatura.

Tabla 7. Tabla de Contingencia entre presencia y ausencia de Mancha Blanca por análisis histológico y temperaturas.

VARIABLE	NIVEL	ESTADISTICO	WSD		TOTAL
			No lesiones de WSD	Lesiones de WSD	
TEMPERATURA °C	24	n Residuos	18 -1.90	21 1.90	39
	31	n Residuos	27 1.90	13 -1.90	40
TOTAL			45	34	79

El riesgo relativo de infección a 24°C comparado con 31°C fue de 1.66, es decir que existió un 66% más ocurrencia de enfermedad a 24°C que a 31°C. Sin embargo, los intervalos de confianza incluyeron al 1. Por lo tanto se concluyó que no existió una diferencia significativa en el riesgo de infección entre las dos temperaturas.

Considerando el factor β -1,3-glucanos, tampoco se observó un efecto significativo ($X^2=1.602$, $gl = 1$, $P = 0.206$) sobre la presencia o ausencia de WSD (Tabla 8). El riesgo de que se presente las lesiones de WSD fue mayor al no usar β -1,3-glucanos, pero las diferencias no fueron significativas ($RR \approx 1$). Estos resultados fueron confirmados realizando la regresión logística, que indicó que, tanto la temperatura ($P = 0.057$), como los B-1,3-glucanos ($P = 0.206$), no influyeron en la presencia de lesiones causadas por el WSSV. Sin embargo, evaluando el efecto de los dos factores mediante regresión logística la menor probabilidad de que ocurra la enfermedad fue con el uso de β -1,3-glucanos a 31° C de temperatura (Tabla 9).

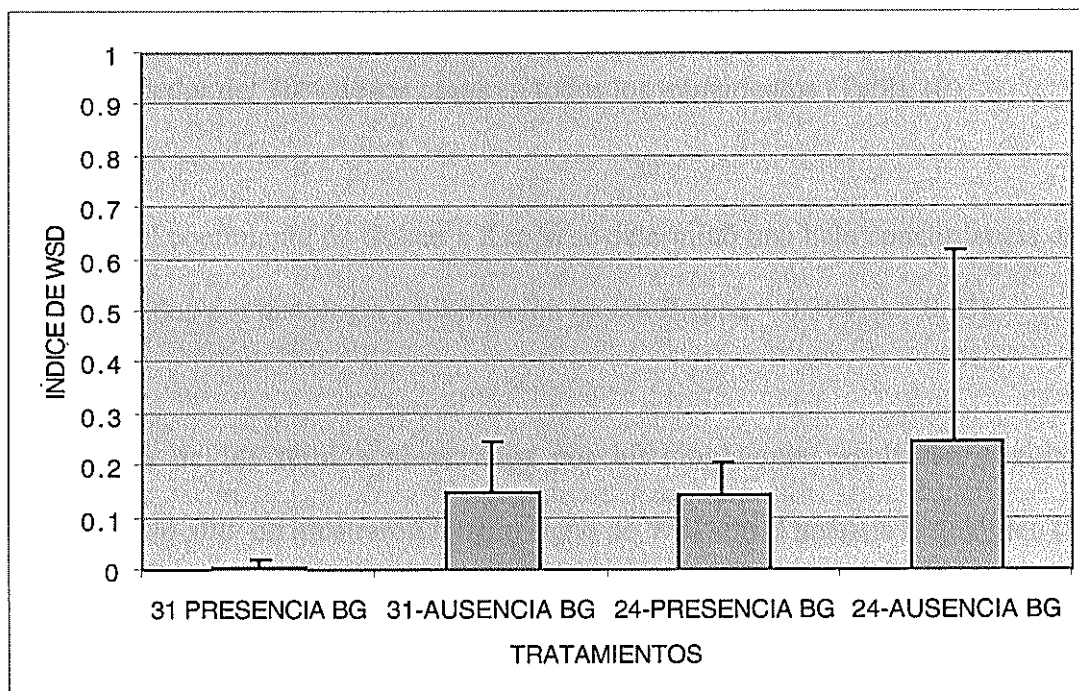
Tabla 8. Tabla de contingencia entre presencia y ausencia de mancha blanca y β -1,3-glucanos por análisis histológico.

VARIABLE	NIVEL	ESTADISTICO	WSD		TOTAL
			No lesiones de WSD	Lesiones de WSD	
B-1,3-glucanos	Ausencia	n Residuos	20 -1.30	20 1.30	40
	Presencia	n Residuos	25 1.30	14 -1.30	39
TOTAL			45	34	79

Tabla 9. Probabilidad de ocurrencia de WSD en función de temperatura y β -1,3-glucanos en análisis histopatológico.

TEMPERATURA ($^\circ$ C)	β -1,3-glucanos	PROBABILIDAD DE OCURRENCIA
31	Presencia	0.260
31	Ausencia	0.390
24	Presencia	0.462
24	Ausencia	0.610

Estos resultados coinciden con los índices de WSD obtenidos a partir del análisis histológico, en los cuales se observó mayor nivel de infección a 24°C sin la utilización de β -1,3-glucanos y el menor nivel de infección a 31°C sin la utilización de β -1,3-glucanos (Figura 5).



BG= β -1,3-glucanos

31 y 24 representan las temperaturas a las cuales se trabajó.

Las barras representan la desviación estándar considerando una muestra de 20 animales por tratamiento.

Figura 5. Índices de WSD determinado por histología para los diferentes tratamientos (anexo 7).

4.4. RESULTADOS DE PRESENCIA DE WSSV EN ANIMALES DE BAJO NIVEL DE INFECCIÓN MEDIANTE HIBRIDACIÓN *In-situ*

Se empleó esta técnica como prueba confirmatoria de la presencia o ausencia de WSSV en animales negativos o de bajo nivel de infección. Se observó que los animales reportados por histología como negativos fueron marcados positivos por hibridación *in-situ* en alrededor del 50% de los casos en todos los tratamientos (Tabla 10).

Mediante el coeficiente de Cohen's Kappa se determinó una baja concordancia entre los datos obtenidos por histología e hibridación *in-situ* ($\kappa = 0.389$, $p = 0.03$).

La mayoría de los tejidos observados por histología que resultaron positivos por hibridación *in-situ* no mostraron ningún signo de WSD en el análisis histológico (Figuras 6 y 7). Por otra parte, la mayoría de los tejidos marcados con la sonda para WSSV en animales sin lesiones detectadas por histología fueron el tejido nervioso de la cabeza, escala antenal (ANS o AS), flagelo antenular (ANF), flagelum antenal (AF), nervio del pedúnculo ocular y cerebro (figura 8 y 9) y las glándulas tegumentales de la región oral (figura 10). Por lo tanto, se consideró estos dos tejidos para observar si los factores temperatura y β -1,3-glucanos tuvieron algún efecto sobre la señal positiva de WSSV.

Tabla 10. Animales positivos y negativos en histología e hibridación *in-situ*

TEMPERATURA (°C)	B-1,3-glucanos	HISTOLOGÍA	HIBRIDACIÓN <i>IN-SITU</i>
24	Presencia	-	1
24	Presencia	-	1
24	Ausencia	-	1
24	Ausencia	-	1
24	Ausencia	-	1
24	Ausencia	-	1
31	Presencia	-	1
31	Presencia	-	1
31	Ausencia	-	1
31	Ausencia	-	1
31	Ausencia	-	1
24	Presencia	1	1
24	Presencia	1	1
24	Presencia	1	1
24	Presencia	1	1
24	Presencia	1	1
24	Presencia	1(2)	1
24	Presencia	1	1
24	Ausencia	1	1
24	Ausencia	1	1
24	Ausencia	1(2)	1
24	Ausencia	1(3)	1
31	Presencia	1	1
31	Ausencia	1	1
31	Ausencia	1(2)	1
31	Ausencia	1	1
31	Ausencia	1	1
31	Ausencia	1	1
31	Ausencia	1	1
24	Presencia	-	-
24	Presencia	-	-
24	Ausencia	-	-
24	Ausencia	-	-
31	Presencia	-	-
31	Presencia	-	-
31	Ausencia	-	-

- = ausencia de WSSV

1 = presencia de wssv y nivel de infección muy leve

2-3 entre paréntesis = niveles de infección leve y medio de algunos tejidos

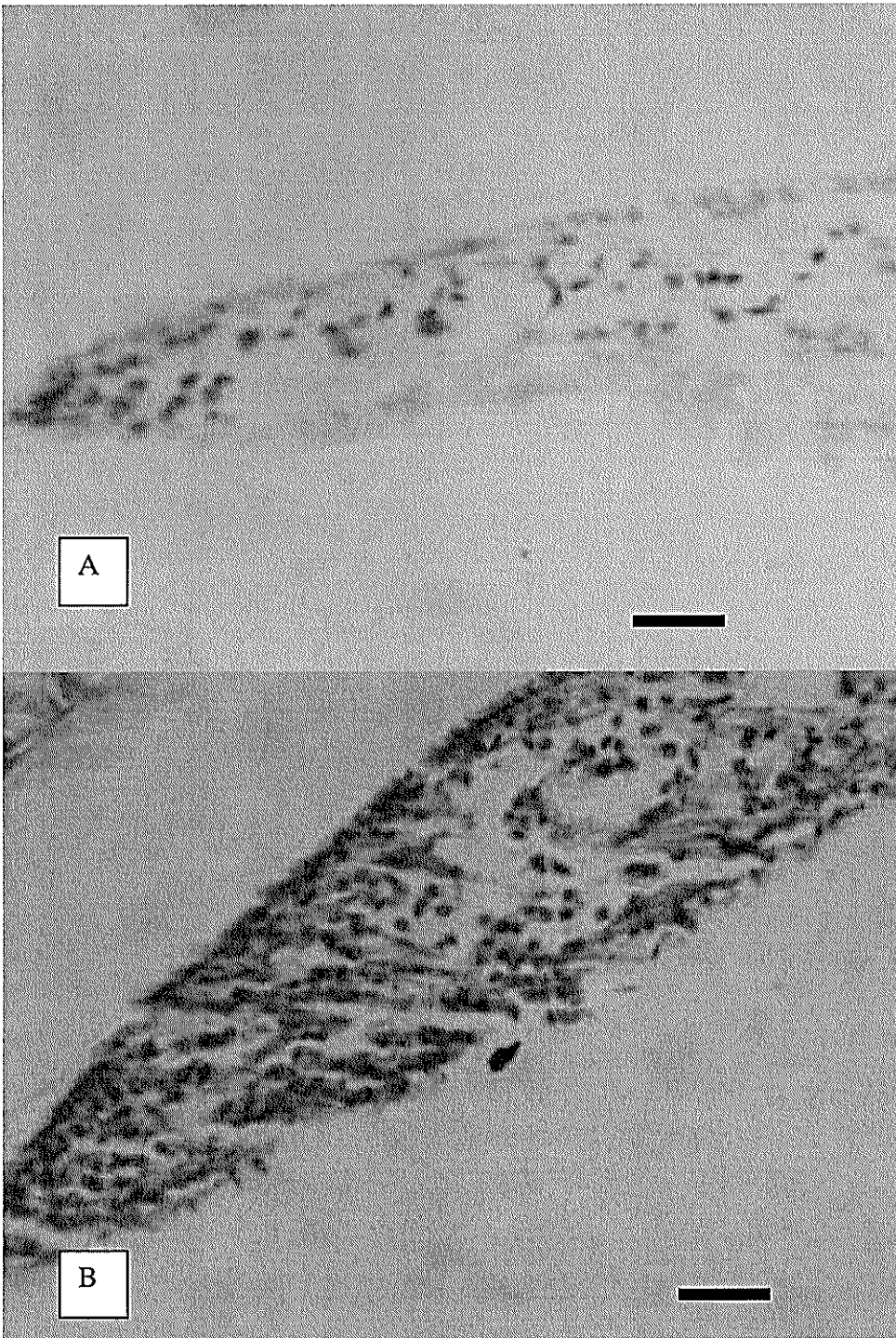


Figura 6. Mandíbula de camarón A) Marcado mediante hibridación *in-situ* que indica la presencia de WSSV B) Corte histológico del mismo Tejido (H&E). Notar que las lesiones de WSD no son evidentes en el corte histológico. Barra = 271.74 μm

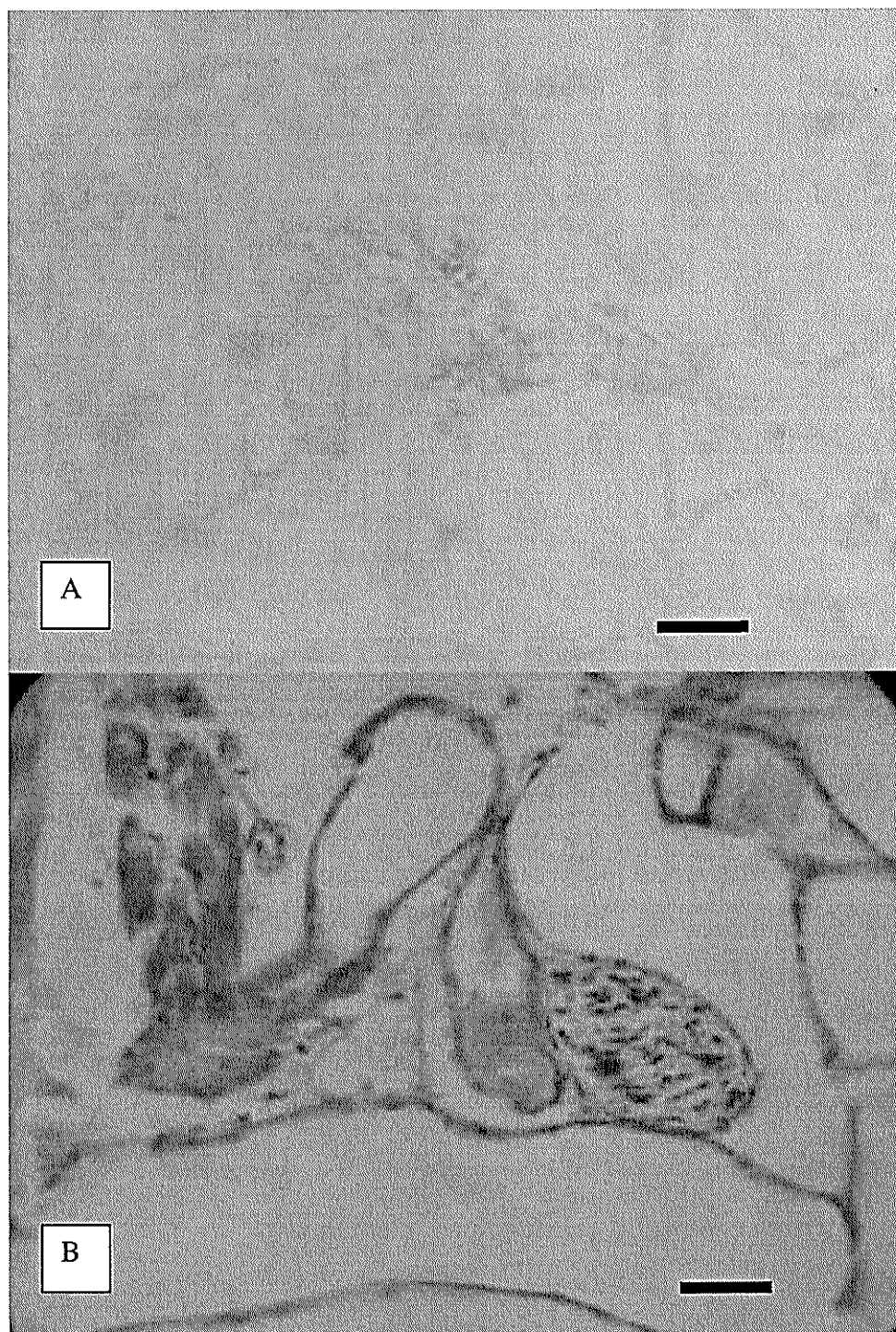


Figura 7. Nervio de la cabeza A) Marcado por hibridación *in-situ*, donde se observa señal para WSSV. B) Corte histológico del mismo tejido (H&E). Notar que las lesiones de WSD no son evidentes en el corte histológico. Barra = 320.5 μm .

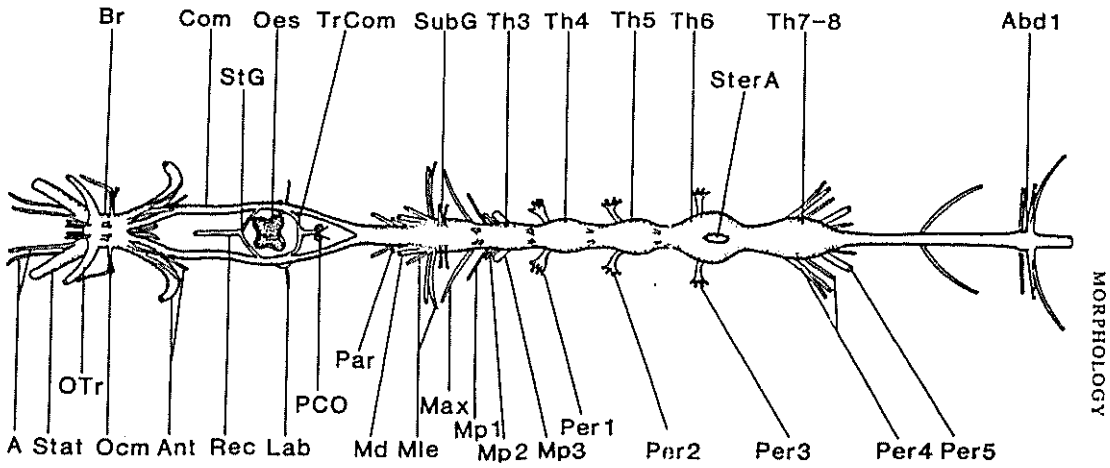


FIG. 2.30. Anterior central nervous system of *Penaeus*. A, antennular nerves; Abd1, abdominal ganglion 1; Ant, antennal nerves; Br, brain; Com, circumoesophageal commissures; Lab, labial nerve; Max, maxillary nerve; Md, mandibular nerve; Mle, maxillary nerve; Mp1-3, nerves to maxillipeds 1-3; Ocm, oculomotor nerve; Oes, oesophagus; OTr, optic tract; Par, paragnathal nerve; PCO, post-commissure organ; Per1-5, nerves to pereopods 1-5; Rec, recurrent nerve; Stat, statocyst nerve; StG, stomogastric ganglion; SubG, suboesophageal ganglion; Th3-8, thoracic ganglia 3-8; SterA, foramen for sternal artery; TrCom, tritocerebral commissure. (Redrawn from Young, 1959)

Figura 8. Sistema Nervioso central de camarón, (tomado de Dall, 1990)

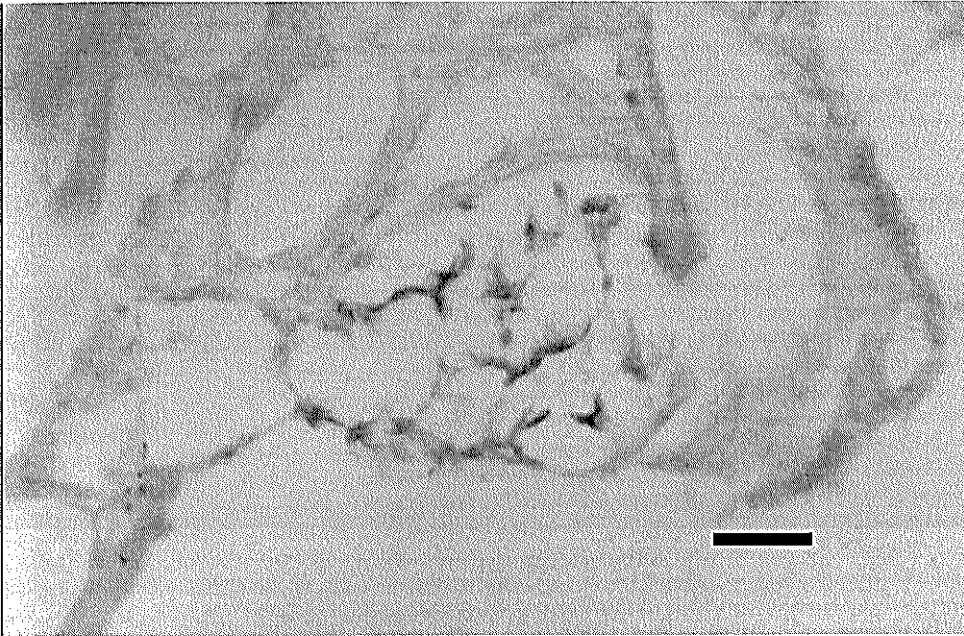


Figura 9. Señal positiva para WSSV en Sistema Nervioso. Barra = 43.1 μm

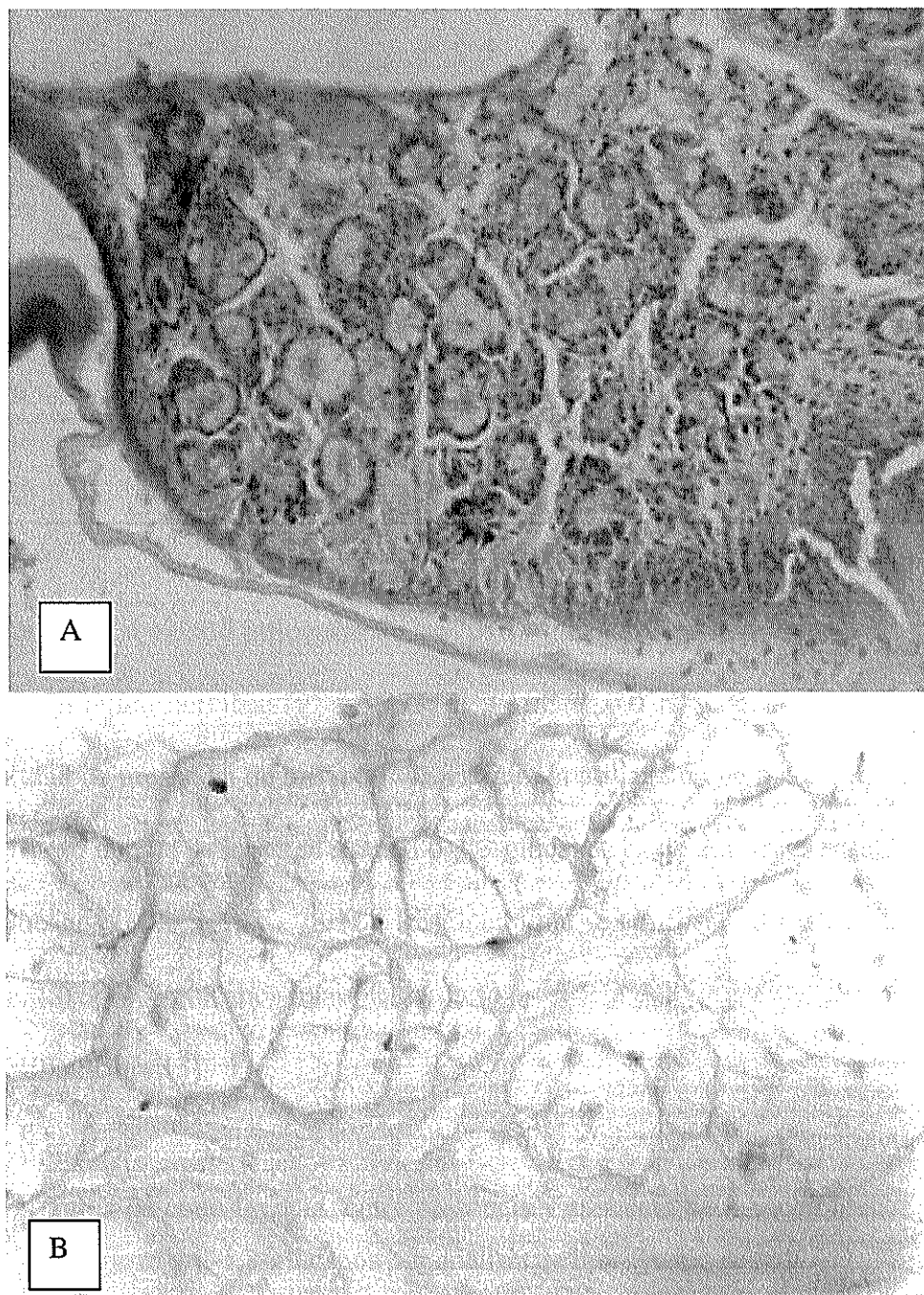


Figura 10. A) Glándulas Tegumentales de la región oral (H&E). Barra = 833 μm .
B) Glándulas Tegumentales de la región oral por hibridación *in-situ* Barra = 43.1 μm

En el tejido nervioso no hubo efecto significativo de la temperatura sobre la presencia de señal para WSSV ($\chi^2 = 0.994$; gl = 1; P = 0.319) (Tabla 11)

Tabla 11. Tabla de contingencia entre presencia y ausencia de mancha blanca en tejido nervioso y temperaturas por análisis de hibridación *in-situ*

VARIABLE	NIVEL	ESTADISTICO	INFECCIÓN EN TEJIDO NERVIOSO		TOTAL
			No infectados	infectados	
TEMPERATURA (°C)	24	n Residuos	12 -1.00	9 1.00	21
	31	n Residuos	11 1.00	4 -1.00	15
TOTAL			23	13	36

Por el contrario si existió influencia de los β -1,3-glucanos en la presencia de señal para WSSV en el tejido nervioso ($\chi^2 = 5.063$; gl = 1; P = 0.024), encontrándose una mayor probabilidad de presencia de señal de WSSV con la utilización de β -1,3-glucanos (Tabla 12). El riesgo de que se infecten usando β -1,3-glucanos es de 2.8 veces más que sin usar β -1,3-glucanos (IC = 1.128 - 7.012). Resultado que se confirmó al realizar la regresión logística. Los β -1,3-glucanos incrementaron la presencia del virus en el sistema nervioso (P = 0.040). (Tabla 13).

Tabla 12. Tabla de contingencia entre presencia y ausencia de mancha blanca en tejido nervioso y β -1,3-glucanos por análisis de hibridación *in-situ*

VARIABLE	NIVEL	ESTADISTICO	INFECCIÓN		TOTAL
			No infectados	infectados	
B-1,3-glucanos	Ausencia	n Residuos	16 2.3	4 -2.3	20
	Presencia	n Residuos	7 -2.3	9 2.3	16
TOTAL			23	13	36

Tabla 13 Análisis de regresión logística binaria de señal para WSSV mediante hibridación *in-situ* en tejido nervioso, utilizando temperatura y β -1,3-glucanos

	Beta	Error estándar de Beta	Wald	gl	Sig P-value	Exp (Beta) = Odds ratio	IC 95% para Exp (Beta)	
							Limite inferior	Limite superior
Temperatura	0,495	0,785	0,397	1	0,528	1,641	0,352	7,645
β -1,3-glucanos	-1,566	0,761	4,229	1	0,040	0,209	0,047	0,929
const	-0,087	0,736	0,014	1	0,906	0,917		

IC= Intervalo de confianza

El nivel de referencia para β -1,3-glucanos es la ausencia y para la temperatura es 24°C

Los β -1,3-glucanos y la temperatura fueron modelados como variables categóricas

La mayor probabilidad de encontrar una señal positiva para WSSV en el tejido nervioso fue utilizando β -1,3-glucanos a 24 °C, en tanto la menor probabilidad de detectar una señal positiva para WSSV fue a 31°C sin β -1,3-glucanos (Tabla 14).

Tabla 14. Probabilidad de ocurrencia de señal positiva a WSSV en tejido nervioso en función de temperatura y β -1,3-glucanos mediante hibridación *in-situ*

TEMPERATURA (°C)	β -1,3-glucanos	PROBABILIDAD DE OCURRENCIA
31	Ausencia	0,16
24	Ausencia	0,24
31	Presencia	0,47
24	Presencia	0,60

Al analizar estadísticamente la presencia de señal positiva para WSSV en glándulas tegumentales se encontró una mayor probabilidad de detectar señal positiva para WSSV en alta temperatura (Tabla 15) ($P = 0.028$; $\chi^2 = 4.822$; $gl = 1$). Se observó 2.5 veces más protección en los animales sometidos a 24 °C que a 31°C. (RR= 0.397 CI = 0.166-0.947).

Tabla 15. Tabla de contingencia de presencia y ausencia de señal para WSSV en glándulas tegumentales bajo condiciones de 2 temperaturas en análisis de hibridación *in-situ*.

VARIABLE	NIVEL	ESTADISTICO	INFECCIÓN		TOTAL
			No infectados	infectados	
TEMPERATURA (°C)	24	n Residuos	15 2.2	5 -2.2	21
	31	n Residuos	6 -2.2	9 2.2	15
TOTAL			22	14	36

Por otra parte, la utilización de β -1,3-glucanos influyó significativamente en la ausencia de WSSV ($P = 0.000 \chi^2 = 12.910$; $gl = 1$). Considerando que la mayor probabilidad de que la enfermedad se presente en glándulas tegumentales se da cuando no se usa β -1,3-glucanos (Tabla 16). El riesgo de que se presente señal positiva para WSSV en glándulas tegumentales es de 10.40 veces mayor que si se usa β -1,3-glucanos ($IC = 1.517-71.278$).

Tabla 16. Tabla de contingencia de presencia y ausencia de señal positiva para WSSV en glándulas tegumentales bajo el factor β -1,3-glucanos en hibridación *in-situ*.

VARIABLE	NIVEL	ESTADISTICO	INFECCIÓN		TOTAL
			No infectados	infectados	
B-1,3-glucanos	Ausencia	n Residuos	7 -3.6	13 3.6	20
	Presencia	n Residuos	15 3.6	1 -3.6	16
TOTAL			22	14	36

Al evaluar la probabilidad de ocurrencia mediante regresión logística se observó que existieron diferencias significativas ($P = 0.005$) solo para la utilización de β -1,3-glucanos. (Tabla 17).

Tabla 17. Análisis de regresión logística binaria de señal para WSSV mediante hibridación *in-situ* en glándulas tegumentales, utilizando temperatura y β -1,3-glucanos

	Beta	Error estándar de Beta	WALD	gl	Sig p-value	Exp (Beta)= Odds ratio	IC 95% para Exp (Beta)	
							Limite inferior	Limite superior
Temperatura	-1.715	0.954	3.230	1	0.072	0.180	0.028	1.168
β -1,3-glucanos	3.421	1.207	8.032	1	0.005	30.614	2.873	326.240
const	-1.830	1.104	2.747	1	0.097	0.160		

BG= β -1,3-glucanos

IC= Intervalo de confianza

El nivel de referencia para β -1,3-glucanos es la ausencia y para la temperatura es 24°C

Los β -1,3-glucanos y la temperatura fueron modelados como variables categóricas

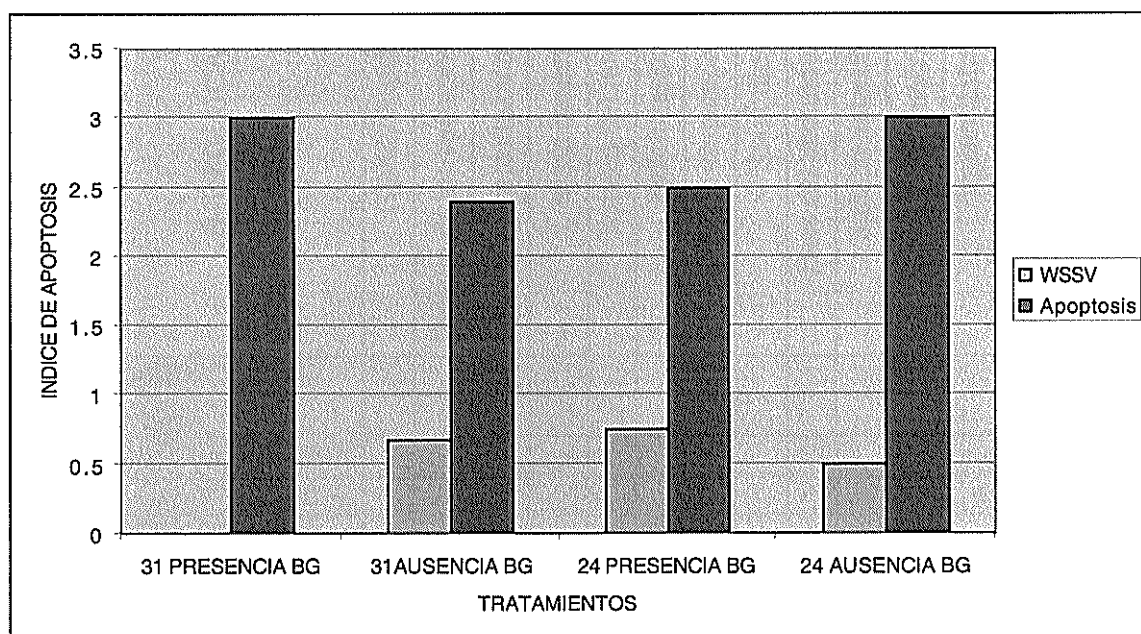
El análisis de probabilidad de ocurrencia presentado en la tabla 18 indica que la mejor condición para que no se presente señal positiva para WSSV mediante hibridación *in-situ* en glándulas tegumentales se da utilizando β -1,3-glucanos y 24°C y la mayor probabilidad de detectar señal en glándulas tegumentales en la región oral se da en animales tratados a alta temperatura sin β -1,3-glucanos.

Tabla 18. Probabilidades de que ocurra la infección, detectada mediante hibridación *in situ*, en glándulas tegumentales para los factores temperatura y β -1,3-glucanos

TEMPERATURA (°C)	β -1,3-glucanos	PROBABILIDAD DE OCURRENCIA
24	Presencia	0.028
31	Presencia	0.138
24	Ausencia	0.469
31	Ausencia	0.830

4.5. DETECCIÓN DE APOPTOSIS

Se analizó aleatoriamente el nivel de apoptosis en diferentes animales de los 4 tratamientos. Observándose una relación inversa entre incidencia de WSSV encontrada mediante Histología y el nivel para la señal de apoptosis. Estos datos no fueron sometidas a análisis estadístico.



BG= β -1,3-glucanos

Figura 11. Índice de apoptosis e índice histológico de los animales sometidos a los cuatro tratamientos

La mayor cantidad de células en apoptosis se observó a nivel de epitelios en los apéndices de la cabeza (Tabla 19) y (Figura 12 A y B). Además se pudo detectar apoptosis en otros tejidos como esferoides del órgano linfoide (Figura 13 A), epitelio del estómago, tejido hematopoyético, tejido conectivo, glándula antenal, epitelio general, branquias, base del pedúnculo ocular, cordón nervioso e intestino (Figura 13 B).

Tabla 19. Nivel de apoptosis detectado mediante TUNEL en diferentes tejidos

TEMPERATURA °C	B-1,3-GLUCANOS												
		Glándula autenal	Epitelio de los apéndices de la cabeza	hepatopáncreas	tejido conectivo	Epitelio del intestino	Epitelio general	tejido hematopoyético	Branquias	Base del pedúnculo ocular	Epitelio del estómago	Cordón nervioso	organo linfoide
31	PRESENCIA		3	2		2							
			2		2	4							
			4		3					3			
											4		1
	AUSENCIA	3	3	4		2							
			2						1				
			3										
24	PRESENCIA		2										
			3										
			3									2	
			2					1					
	AUSENCIA	4	3		3		3						
			3	4									

1= nivel de apoptosis muy leve

2= nivel leve de apoptosis

3= nivel medio de apoptosis

4= Alto nivel de apoptosis.

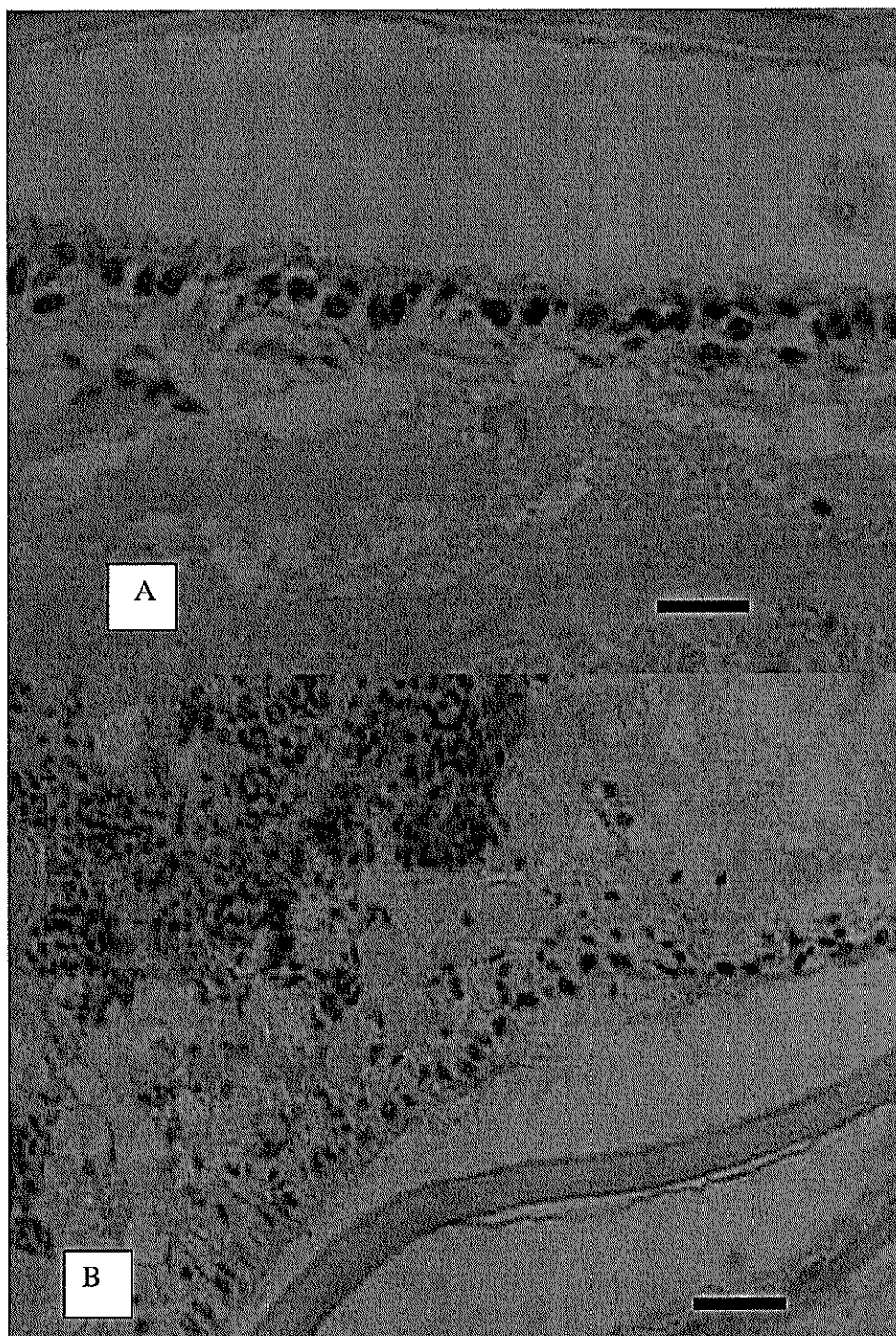


Figura 12. A) Señal de apoptosis en apéndice 40x ,barra = 271.74 μm B) Señal de apoptosis en apéndice 40x barra = 320.5 μm .

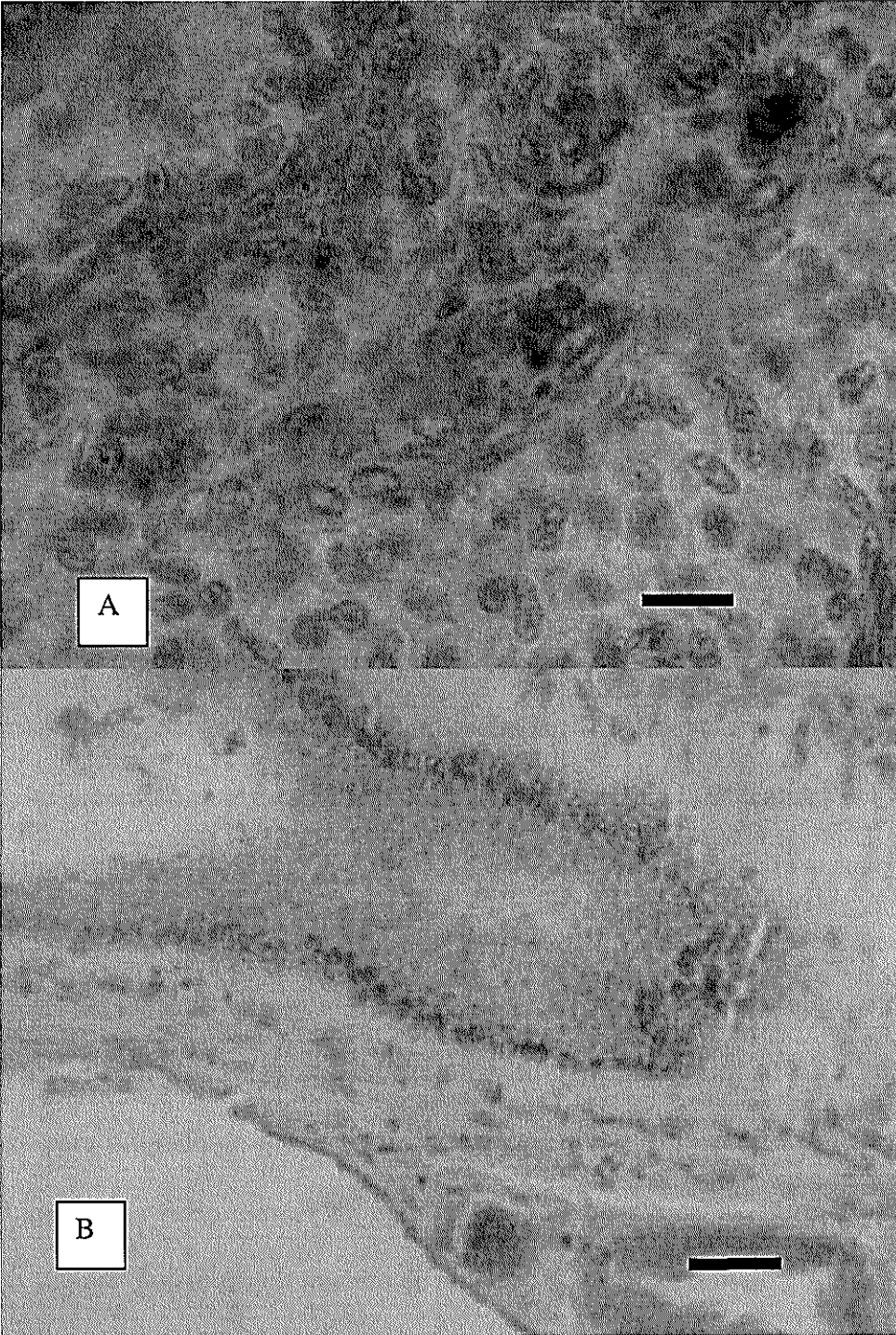


Figura 13. A) Señal de apoptosis en esferoides del órgano linfoide 100x barra =125 μ m B) Señal de apoptosis en intestino 40x barra = 320.5 μ m.

5. DISCUSIÓN

La prevalencia inicial para el WSSV en el tanque exterior donde permanecieron los animales antes de iniciar el bioensayo fue del 0%. Posteriormente se llevó a los animales a un sistema cerrado de recirculación de agua, aislado de otras salas experimentales. Previamente, el agua fue tratada con cloro. Por medio de esto se quiso recrear las condiciones de los estanques en los cuales hay un limitado recambio de agua, lo cual teóricamente debe favorecer el incremento de la carga viral en el ambiente. Al cabo de 21 días se detectó la presencia de WSSV mediante PCR e histología en todos los tanques. Por lo que se puede asumir que el virus ingresó al sistema a través de las larvas. Este resultado concuerda con las observaciones de Bayot (2005) quien menciona que el agua es un agente de riesgo para la transmisión del virus de la mancha blanca. En este estudio también se consideró que la transmisión puede ser influenciada por las condiciones ambientales presentes en el estanque. En este caso las variables ambientales consideradas fueron: temperatura (24 vs 31°) y β -1,3-glucanos en la dieta (presencia vs ausencia).

En las muestras tomadas luego de 21 días de bioensayo la primera variable de respuesta considerada fue el peso, para el cual no hubo diferencias significativas a un 95% de confianza para ninguno de los factores temperatura y β -1,3-glucanos. Sin embargo, el factor temperatura pudo ejercer un efecto significativo a un 90% de confianza. Este resultado sugiere que un mayor número de réplicas, hubieran permitido posiblemente ver un efecto positivo de la temperatura alta sobre el peso.

En cuanto a la información concerniente a salud, el análisis de datos debe tomarse con precaución. A nivel estadístico tuvieron mayor peso a los resultados obtenidos por la

técnica de PCR, ya que para este análisis se utilizó un tamaño adecuado de muestra, lo que no se puede decir con respecto al tamaño de muestra para histología. Esta última técnica es de mayor costo y más laboriosa de realizar, lo que limitó el número de muestras analizadas. En el caso de este estudio, estas muestras representaron el 13% de la población. Sin embargo, el análisis histológico nos permitió observar el nivel de infección con WSD y los tejidos comprometidos. Lesiones de WSD se detectaron en el tejido conectivo, glándula antenal, apéndices, corazón, tejido hematopoyético, branquias, mandíbula, epitelio cuticular, intestino, órgano linfoide y ojo. Muchos animales no presentaron lesiones. Pero en los que sí se presentaron, el nivel fue insipiente en la mayoría de casos (nivel 1), obteniéndose índices de WSD muy bajos en cada tratamiento. La variabilidad no permitió observar diferencias significativas, a pesar de que en los animales cuyo tratamiento combinó alta temperatura y β -1,3-glucanos las lesiones fueron prácticamente inexistentes.

En las muestras analizadas para WSSV mediante PCR, la temperatura fue un factor que no actuó de forma significativa sobre la presencia de animales positivos, ni sobre el riesgo de infección, en tanto que los β -1,3-glucanos sí ejercieron un efecto significativo.

Estudios realizados tanto en campo como en laboratorio reportan mejores producciones en los meses de invierno, obteniéndose una baja prevalencia del virus y rendimientos más altos que en el verano (Rodríguez *et al.* 2003, Sonnenholzner *et al.* 2002). Sin embargo, nuestros resultados indican que la temperatura alta no protege a los animales de la entrada del virus. El efecto protector de la temperatura se daría a nivel de desarrollo de la enfermedad o la mortalidad, corroborando los resultados de Sonnenholzner *et al.* 2002b quien menciona que en un desafío realizado a una temperatura de 33 °C por 8 días resultó

en una alta supervivencia a pesar de que la prevalencia alcanzó al 90% de los animales. En otras palabras, la infección puede permanecer latente bajo condiciones de alta temperatura diseminándose en la población de manera asintomática. Sin embargo, si la temperatura disminuye, el riesgo de detectar animales positivos es mayor (Rodríguez 2003). Estos resultados explicarían las mortalidades observadas en invernaderos en periodos prolongados de baja temperatura.

En este caso se pudo observar que fue menor el riesgo de que los animales se infecten con WSSV cuando se usó los β -1,3-glucanos. Además se observó que la interacción de los dos factores minimizó la probabilidad de ocurrencia del virus. Al respecto Raa (2000) señala que, los β -1,3-glucanos tienen una buena definición estructural química actuando sobre el sistema inmune. En ensayos en *P. monodon*, se ha reportado que los β -1,3-glucanos actúan de manera positiva sobre el sistema inmune (Sung *et al.* 1993, Sung *et al.* 1996) incrementando la resistencia contra vibrios. Además cabe resaltar que según un estudio realizado por Chang *et al.* (2000) se han obtenido mejores tasas de supervivencia en desafíos con WSSV, en animales tratados con β -1,3-glucanos.

Investigaciones desarrolladas en el CENAIM muestran que el éxito de los animales a la inmunoestimulación, dependerá también de la capacidad inmunoestimulable del camarón y que ante la carencia de animales con esta cualidad, se pueden explorar dos estrategias para potenciar los resultados. La primera es la combinación de estimulación con hipertermia, y la segunda es la inmunoestimulación desde los estadios larvarios a fin de promover un mejor desarrollo de los tejidos inmunes (Rodríguez *et al.* 2003).

En bioensayos realizados, se determinó que el hecho de utilizar hipertemia, favorece la supervivencia en piscinas de cultivo de camarón, en tanto que utilizando β -1,3-glucanos en precría podría manejarse la prevalencia de WSSV. De hecho empleando esta estrategia se obtuvo producciones de camarón similares a las registradas antes de la aparición de la mancha blanca en Ecuador (Rodríguez *et al.* 2004).

Con la utilización de β -1,3-glucanos se observó que el índice de WSD en los tratamientos con β -1,3-glucanos presentan una menor dispersión en relación a los tratamientos que no los emplearon. En los sistemas productivos este efecto de los inmunoestimulantes garantizaría resultados más homogéneos.

La técnica de hibridación *in-situ* se utilizó para confirmar y verificar la presencia del WSSV en animales que tuvieron un nivel de infección incipiente. De manera sorprendente se detectó señal en tejidos de apariencia normal por histología, indicando que aparentemente el virus estaría presente pero no habría replicación. Para dilucidar este punto sería conveniente la utilización de microscopía electrónica de transmisión para observar ultraestructuralmente las células, o hibridación *in-situ* buscando ARNm para detectar expresión viral. Mas del 50 % de los animales analizados mediante hibridación *in-situ* fueron positivos, es decir falsos negativos en histología, indicando la alta sensibilidad de la técnica de hibridación *in-situ*.

La mayor cantidad de señal positiva para WSSV en animales falsos negativos, se encontró en tejido nervioso de la cabeza (especialmente en nervios que inervan los apéndices) y en las glándulas tegumentales de la región oral. Los apéndices de la cabeza están muy expuestos al virus debido al contacto que tienen con el ambiente para la

búsqueda de alimento, existiendo en ellos además gran cantidad de neuroreceptores y terminaciones nerviosas. Por otra parte, los extremos de los apéndices están escasamente calcificados y los tejidos son muy finos (Atwood and Sandeman 1982)(Figura 13).

Por otra parte, la región oral es rica en glándulas tegumentales, estas se encuentran relacionadas a la superficie cuticular, son estructuralmente grandes y con diversas funciones. Existe 6 tipos morfológicos de glándulas, unicelulares, bicelulares, tricelulares, roseta, lóbulo y syncytial. Se ha observado que las glándulas tegumentales sintetizan gránulos secretores que contienen mucopolisacáridos, glicoproteínas, fenoloxidasa, catecolaminas, tubulina y quizás lípidos. Las células secretoras de algunos tipos de glándulas en el animal pueden producir diferentes productos secretores, indicando que en cada región en particular están especializadas para una función específica. Las glándulas tegumentales parecen realizar una amplia gama de funciones y algunas todavía no se han identificado. Las funciones posibles de las glándulas tegumentales incluyen endurecer y teñir la cutícula durante la muda, mediante esclerotización, utilizando actividad fenoloxidasa, la defensa contra depredadores, la formación del epicutícula, la generación de la luminiscencia, además de secretar sustancias que ayudan en la alimentación, y en la osmoregulación (Horst and Freeman 1993). Estas glándulas tegumentales no presentan cutícula (Figura 14). El animal explora el ambiente y busca alimento utilizando estos apéndices. En investigaciones anteriores, Cárdenas(2004), y Blake (2004), detectaron señal homogénea positiva para WSSV en las glándulas tegumentales comprometiendo todo el tejido glandular, empleando la técnica de inmunohistoquímica. En este estudio, mediante la utilización de hibridación *in situ* se observa señal positiva en los núcleos celulares de las glándulas

tegumentales indicando que en este tejido no sólo habría acumulación del virus, sino que también podría haber replicación viral.

El análisis estadístico mostró que la señal positiva en tejido nervioso, no se vio afectada por el uso de alta temperatura, pero sí por la utilización de β -1,3-glucanos. En tanto que, en las glándulas tegumentales ocurre lo contrario, la alta temperatura influyó positivamente en la presencia de señal de WSSV y los β -1,3-glucanos ejercieron un efecto protector. Por lo tanto, suministrar β -1,3-glucanos en el alimento puede inducir un incremento de la respuesta inmune a nivel oral, dejando desprotegido de alguna forma al sistema nervioso. Futuros trabajos de investigación deben realizarse para determinar si esta hipótesis es válida o no.

Por otra parte, a alta temperatura los animales necesitan más alimento y utilizan los mecanismos de mecanorecepción y quimiorrecepción (Atwood and Sandeman 1982) para buscarlo, aumentando así la probabilidad de ingreso viral por la región oral. En este caso el utilizar los β -1,3-glucanos minimiza este riesgo ya que incrementa la respuesta inmune a este nivel. Este resultado por sí solo explicaría la menor probabilidad de ocurrencia de animales positivos para WSSV combinando temperatura y β -1,3-glucanos

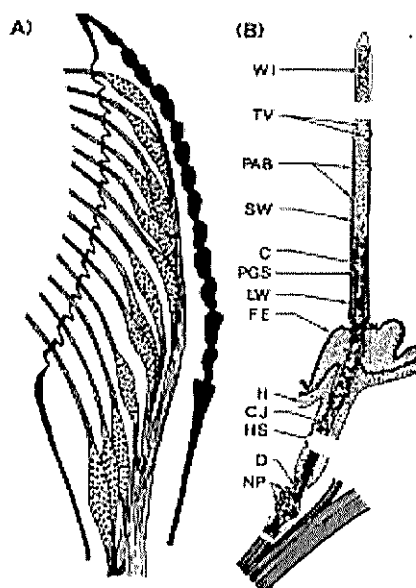


Figura 14. Gráfico esquemático de presunto quimiorreceptor antenular en *Paragrapsus gaimardii*, nótese que la cutícula es más delgada en el extremo y está en contacto estrecho con terminaciones nerviosas. (tomado de Atwood and Sandeman 1982).

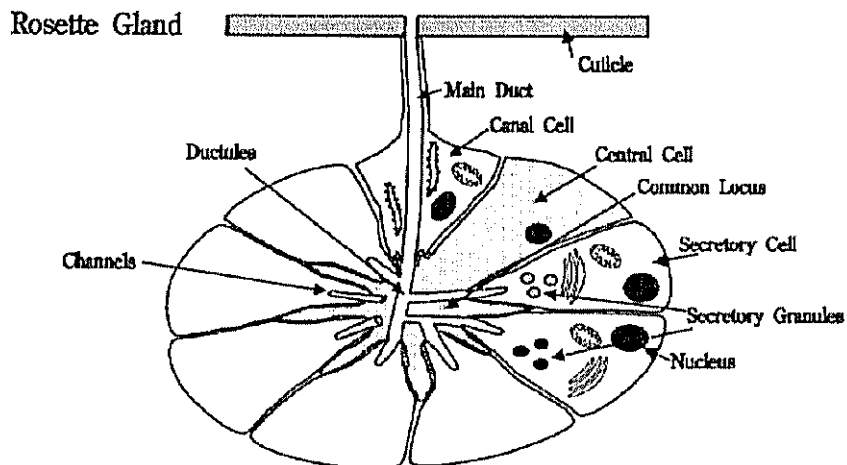


Figura 15. Glándula tegumental, note la comunicación del tejido con el exterior y la ausencia de cutícula en las células glandulares. (tomado de Horst, 1993)

Se detectó señal positiva para apoptosis a nivel de epitelios de los apéndices. Esta observación sugiere que este mecanismo de muerte programada puede ser interpretado como una forma de defensa ante el virus para tratar de frenar su entrada impidiendo la

replicación en los tejidos más expuestos. Sin embargo, este mecanismo fallaría si el virus alcanza el sistema nervioso. En este tejido la apoptosis no podría funcionar sin provocar serios trastornos al animal y por lo tanto el tejido nervioso podría constituirse en un refugio para el virus. Esto sería corroborado por el hecho de haberse detectado señal muy escasa para WSSV y en la mayoría de los casos ausente, en los epitelios cercanos a terminaciones nerviosas positivas al WSSV y al hecho de que en ningún caso se detectó apoptosis en el sistema nervioso.

Por otra parte, también dieron señal positiva para apoptosis los núcleos picnóticos de los esferoides corroborando las afirmaciones de Hasson *et al.* 1999, quien afirma que las células fagocitarias de los esferoides del órgano linfoide se autodestruyen resultando en la eliminación del virus, en ese caso del TSV.

En conclusión, aparte de los vectores para WSSV presentes en los estanques las propias larvas llevarán el WSSV al cultivo y el agua actuaría como vehículo de transmisión horizontal. Por lo tanto, deben diseñarse estrategias para minimizar el riesgo de transmisión del virus de la Mancha blanca. Se ha visto que la temperatura tiene un efecto positivo en cuanto al nivel de infección, actuando sobre la morbilidad y la mortalidad, pero no sobre la susceptibilidad, mientras que la utilización de inmunoestimulantes en este caso los β -1,3-glucanos, permiten que el virus no ingrese por vía oral (efecto sobre transmisión horizontal). La combinación de estos dos factores para tratar las larvas antes de la siembra, permitirían minimizar los riesgos de infección.

La combinación de estas dos estrategias puede optimizarse. En este trabajo se procuró trabajar con una temperatura superior a 31°C, considerando que el rango óptimo para el

desarrollo del camarón sin presencia de brotes en los estanques se ubica entre 28 y 31°C (Rodríguez 2003a; Wyban 1995, Sonnenholzner 2002a, Ponce-Palafox *et al.* 1997). En el futuro se puede ensayar temperaturas más altas, mayores de 32°C (hipertermia) o inmunoestimulación por baño a fin de verificar si esta forma de suministrar β -1,3-glucanos tiene un efecto protector sobre las terminaciones nerviosas de la cabeza.

6. CONCLUSIONES

Una de las rutas de ingreso del WSSV a los sistemas de producción sería a través de las larvas de camarón.

Ni la temperatura ni los β -1,3-glucanos ejercieron un efecto significativo sobre el peso, debido a la alta variabilidad existente en los tratamientos.

El análisis de los datos de PCR permitió observar que la temperatura no tuvo un efecto significativo en la presencia de WSSV ni sobre el riesgo de infección. Los β -1,3-glucanos tuvieron un efecto protector contra la infección. La interacción de los dos factores, alta temperatura y β -1,3-glucanos minimizaron la probabilidad de ocurrencia (o detección) del virus.

Los tejidos que reportaron positivos para WSD mediante análisis histopatológico fueron el tejido conectivo, glándula antenal, apéndices, corazón, tejido hematopoyético, branquias, mandíbula, epitelio cuticular, intestino, órgano linfoide, ojo, todos en nivel 1. Muchos animales no presentaron lesiones. Los índices de WSD en los diferentes tratamientos fueron muy bajos y no se observó diferencias significativas entre tratamientos, talvez debido a la variabilidad existente, sin embargo en los animales en los que se combinó alta temperatura y β -1,3-glucanos, no se observó prácticamente lesiones de WSD.

La técnica de hibridación *in-situ* fue más sensible que la técnica de histología, ya que se encontró señal positiva para WSSV, en animales reportados como negativos mediante histología.

La ausencia de lesiones detectables en tejidos con señal positiva para WSSV sugiere que el virus se encuentra presente pero no existe replicación, esto se podría confirmar utilizando microscopía electrónica de transmisión e hibridación *in-situ* buscando ARNm.

La mayor señal positiva para WSSV en animales falsos negativos, se encontró en tejido nervioso de la cabeza y en las glándulas tegumentales de la región oral. Estos tejidos serían susceptibles debido a su utilidad en la exploración del ambiente y la búsqueda de alimento por medio de mecanismos de quimiorrepción y mecanorrepción.

En este estudio se pudo observar la presencia de núcleos marcados positivamente para WSSV en la glándula tegumental.

La alta temperatura no influyó ni positiva ni negativamente sobre la presencia de señal para WSSV en el tejido nervioso, pero los β -1,3-glucanos si influyeron de manera positiva. En tanto que en las glándulas tegumentales la temperatura influyó positivamente en la señal de WSSV, mientras que los β -1,3-glucanos tuvieron un efecto protector.

La combinación de temperatura alta y β -1,3-glucanos potenciaron los resultados obtenidos de forma individual con cada factor. La alta temperatura actúa negativamente para el desarrollo de la enfermedad mientras que los β -1,3-glucanos actúan como protectores de portales de entrada, limitando la transmisión horizontal del WSSV.

Se observó apoptosis a nivel de epitelios de los apéndices, por lo que se podría considerar como un mecanismo de defensa ante la presencia del virus en los tejidos mas expuestos. En el sistema nervioso no se detectó apoptosis pero si señal positiva para WSSV, por lo tanto este sistema podría constituirse en un refugio para el virus.

Se detectó apoptosis en los núcleos picnóticos de los esferoides confirmando las afirmaciones de Hasson *et al.* (1999) en el sentido de que las células de los esferoides se autodestruyen para eliminar el virus.

7. RECOMENDACIONES

Al no ejercer ningún efecto significativo de la utilización de β -1,3-glucanos ni la temperatura por la alta variabilidad se recomienda la utilización de un mayor número de réplicas en un próximo ensayo.

Se recomienda el uso de la combinación de temperatura alta y presencia de β -1,3-glucanos en la alimentación para sistemas productivos con el fin de incrementar la resistencia a WSSV.

La utilización de microscopía electrónica de transmisión e hibridación in-situ buscando ARNm, podría confirmar la presencia de replicación viral para WSSV en tejidos que no se observan lesiones de WSD por histología, pero que por hibridación in-situ se observa la presencia de la infección.

En el futuro la combinación de estos dos factores (temperatura y β -1,3-glucanos) puede optimizarse. Pudiendo ensayarse temperaturas mayores a 32°C o inmunostimulación por baño a fin de verificar si esta forma de suministrar β -1,3-glucanos tiene un efecto protector sobre las terminaciones nerviosas de la cabeza.

8. ANEXOS

ANEXO 1. TAMAÑO DE MUESTRA NECESARIO PARA OBSERVAR DIFERENCIAS EN LAS PROPORCIONES DE DOS POBLACIONES

Cálculo tomado de Sophie des Clers (1994), Sampling to detect infections and estimate prevalence in aquaculture y De Blas *et al.* (2006) Manual de Epidemiología Veterinaria

$$7.8 [P_1(1-P_1)+P_2 (1-P_2)]/(P_1-P_2)^2$$

Donde:

$P_1 = 5\%$, proporción esperada de WSSV en la población de animales sometidos a 31°C .

$P_2 = 30\%$ proporción esperada de WSSV en la población de animales sometidos a 27°C

Entonces:

$$N= 7.8 [(0.05(1-0.05)+0.3 (1-0.3)]/(0.05-0.3)^2$$

$$N= 7.8 [(0.05(0.95)+0.3 (0.7)]/(-0.25)^2$$

$$N= 7.8 (0.0475+0.21)/(0.0625)$$

$$N= 32.136$$

$N = 32$ animales por tanque para los animales que se van hacer PCR.

ANEXO 2. PROTOCOLO PARA ANALISIS HISTOLÓGICO

Las muestras primeramente fueron recogidas en envases con fijador Davidson (cuyos componentes son alcohol 330ml, ácido acético 115ml, formol 220ml, agua destilada 335ml) que sirve para desnaturalizar las proteínas y preservar los tejidos, una vez fijadas deben ser pasadas a alcohol etílico al 50%.

Luego se realizo una deshidratación la misma que consiste en :

- Etanol al 70% por una hora
- Etanol al 80% por una hora
- Etanol al 90% por una hora
- Etanol al 95% por una hora
- Etanol al 100% (I, II, III)por una hora
- Xilol (I, II) por una hora

Se continuo con la inclusión en parafina (I, II, III) para cada una, una hora y se procedió a la formación del bloque, con lo cual se realizó los cortes en el micrótomo, donde cada corte era pasado por agua fría y agua caliente para extenderlo. Se colocaba en las placas realizando un adecuado montaje procediéndolas a dejarlas en una plancha térmica por dos horas. Para poder realizar el desparafinado el cual tiene el siguiente procedimiento:

- Xilol I 10 minutos
- Xilol 2 10 minutos
- Xilol 3 10 minutos
- Alcohol al 100% 3 minutos
- Alcohol al 100% 3 minutos
- Alcohol al 100% 3 minutos
- Alcohol al 90% 3 minutos
- Alcohol al 80% 3 minutos

- Alcohol al 50% o 75% 3 minutos

Con ello se procedió a realizar la tinción la que consiste en la utilización de:

- Agua destilada 1 minuto
- Hematoxilina si es la que se vende 2 minutos, si la preparamos 18 minutos
- Se abre la llave de Agua potable y se deja caer sobre las muestras durante 3 minutos mientras se lavan.
- Agua destilada 1 minuto
- Eosina 1 minuto
- Alcohol al 70% 1 minuto
- Alcohol al 90% 1 minuto
- Alcohol al 100% 1 minuto
- Alcohol al 100% 1 minuto
- Xilol I 7 minutos
- Xilol II 7 minutos
- Montaje de las placas. Luego de el xilol se coloca en la placa una gota de solución pegante estellan, la cual sirve para pegar y se coloca el cubreobjetos, y se la deja secar, para poder observarla.

ANEXO 3. EXTRACCIÓN DE ADN POR MEDIO DE CTAB

- Colocar 4 ul de Proteínasa K (concentración 20 mg/ml) y 500 ul de CTAB en los tubos de 1.5 ml
- Cojer el tejido de las muestras (de la cabeza) y se coloca en los tubos con proteínasa y CTAB
- Dejar las muestras en baño maría a 57°C por 2 horas
- Macerar las muestras
- Volver a colocar en baño maría a 37 °C y se los deja durante toda la noche.
- Sacar del baño maría y se coloca 250 ul de fenol y 250ul de cloroformo en los tubos donde se encuentran las muestras.
- Las muestras se agitan con la ayuda del vortex.
- Centrifugar las muestras por 10 minutos a 13400 g, con este proceso se obtendrá dos soluciones
- Sacar el sobrenadante (450 ul) y se coloca en 500 ul de cloroformo que se colocarán en tubos de 1.5 ml
- Luego centrifugar por 5 minutos a 13400 g
- Sacar el sobrenadante (400 ul)
- El sobrenadante se coloca en 600 ul de isopropanol y se lo coloca a -20°C y se lo deja durante toda la noche
- Se procede a centrifugar las muestras por 10 minutos a 13400 g, luego se elimina el contenido y se deja el sedimento.
- Luego se realiza un lavado del pellet con alcohol al 70% se lo agita y posterior a ello se centrifuga por 5 minutos.

- Luego se elimina el alcohol dejando solo el pelet para realizar el proceso de secado.
- Luego de haber secado el pellet se coloca 100 ul de agua milli-Q.
- Tomando 100 ng/ μ l para la amplificación.

ANEXO 4. PROTOCOLO DE HIBRIDACIÓN *in-situ*

Se procedió a realizar la hibridación in situ de las 80 muestras obtenidas de los cuatro tratamientos y sus respectivas réplicas para lo cual se utilizó los siguientes reactivos y soluciones (Protocolo modificado laboratorio de Inmunología Echeverría 2005):

- PBS: 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, 3 mM KCL, 137 mM ClNa. Ajustar el pH a 7.4
- Proteinasa K (100 ug/ ml en PBS)
- Tampon de hibridación: 50% de formamide, solución de Denhart (1% en concentración final), 10% de dextran, SSC (4% en concentración final), 0,5 mg/ml de ADN de esperma de salmón, EDTA 1 mM, Tris HCl 50 mM, pH 8.
- SSC 20X: 3 M NaCl, 300 mM citrato de sodio, pH 7.
- Tampón TBS: 100 mM Tris HCl, p H 7.4; 150 mM ClNa.
- Solución de bloqueo: 2% de suero de oveja, 0.3% de Triton 100X
- Anticuerpo anti-digoxigenina (1/500).
- Tampón de la fosfatasa alcalina: 100 mM de Tris HCl pH 9.5; 100 mM NaCl; 50 mM Cl₂Mg.
- Solución de revelado: Tampón de la fosfatasa alcalina conteniendo (BCIP 0.19 mg/mL ; NBT 0.4 mg/mL; levamisol 0.24 mg/mL).
- Solución inhibidora de la reacción: 1 mM Tris HCl, 0.1 mM EDTA pH 8
- Solución de contracoloración: Bismack Brown Y.

Procedimiento:

- hidratación. Las secciones de tejidos montadas en placas positivas pasan por 2 baños sucesivos de Xilol (5 minutos cada uno) y etanol, 100, 95, 75 y 50% (1 minuto cada uno). Finalmente por un baño de agua destilada de 5 minutos.
- Una vez listas las placas, se lavan en PBS 1X por 5 minutos. En cámara húmeda.

- Las placas se escurren y se aplica Proteinasa K (100 ug/ml en PBS1X, lo que equivale a 2.5ul de Sol Stock de PK/500 ul de Solución de trabajo) por cada placa se usa 500 ul de solución y se incuba durante 15 minutos a 37°C. Debe considerarse mucho el tiempo de incubación.
- Los cortes son bañados durante 5 minutos a temperatura ambiente en Glicyne/PBS 1X Buffer (1 ml/placa).
- Se retira la Glicina y se coloca las placas a 4 °C (en una hielera) donde aplicamos una solución de PBS paraformaldehído 0,4% (1ml / placa) durante 10 minutos. Al mismo tiempo se coloca en un microtubo el volumen de sonda necesario (50-75 ul por placa) poniéndolo a ebullición durante 10 minutos, luego del cual se retira el baño maría y se lo coloca directamente en hielo.
- Se realiza un lavado de agua milli-Q. Durante 5 minutos a 4°C
- Luego se coloca la sonda en el cubre objetos y se ubica el tejido, posterior a ello se la pone a ebullición durante 6 minutos con la finalidad de desnaturalizar el ADN en la muestra. Todo este proceso a 4°C
- Luego las placas son llevadas al incubador durante toda la noche a 37°C en una cámara húmeda.
- Las placas reciben 3 baños sucesivos de 5 minutos cada uno en SSC (SSC 2X, SSC1X, Y SSC 0,5X respectivamente).
- Se escurre bien la placa y se coloca 1 ml por placa de solución de bloqueo 1X durante 10 minutos en cámara húmeda.
- Bien escurrida la placa se aplica el anticuerpo antidigoxigenina 400-500ul en cada placa y se incuba durante 30 minutos en cámara húmeda.
- Se realizan 3 lavados de 5 minutos en tampón TBS

- Se escurre bien y se enjuaga la placa en tampón de la fosfatasa alcalina. Durante 1-3 minutos.
- Secando lo máximo posible se aplica 400 ul de solución de revelado (NBT-BCIP). Incubando en cámara húmeda a temperatura ambiente, en cuarto oscuro durante 3 horas
- Se escurren las placas y se detiene la reacción aplicando la solución inhibidora de la reacción (1ml / placa) durante 5 minutos
- Aplicar BISMARCK Brown (1 ml /placa) 1 minuto
- Enjuagar con agua mili Q un lavado rápido y luego volver hacer el lavado con agua mili Q durante 5 minutos
- Hacer una revisión de las placas usando PBS-glicina (40 ul / placa) se coloca dos gotitas en el cubreobjeto y se le pone sobre la placa con el tejido. Y se puede observar, las placas se pueden guardar en cámara húmeda por un pequeño tiempo antes de realizar el montaje, para el cual primero debe pasarse por agua destilada y sacar los cubreobjetos.
- Luego (pasar por alcoholes primero de 50%, 75%, 80%, 90%,100%,durante 1 minuto, y al finalizar 2 baños de xileno durante 7 minutos cada uno) y luego realizar el montaje para su observación
- Con este análisis se observo los tejidos que fueron afectados por WSSV y sirvió de confirmación de los individuos que por histología se reporta WSSV en grado 1 y los reportados negativos.

ANEXO 5. PROTOCOLO PARA DETECTAR APOPTOSIS MEDIANTE TUNEL

1. Se realizó los cortes de los bloques de animales que presentaran mayor cantidad de tejido y fueron colocadas en placas cargadas, luego se considero el protocolo descrito por PROMEGA, que se detalla a continuación para la utilización del kit de apoptosis DeadEnd™ Colorimetric TUNEL System.
2. Se procedió a desparafinar mediante inmerión en xileno por 5 minutos a temperatura ambiente, y luego se repitió el proceso una vez más.
3. Luego se lavó en etanol al 100% por 5 minutos, y se volvió a repetir el lavado en etanol al 100% pero por 3 minutos, posterior a ello se rehidrataron las muestras, sumergiendo las placas en lavados graduales de etanol 95%, 85%, 70%, 50%, por 3 minutos cada uno a temperatura ambiente.
4. Se realiza un lavado de las placas sumergiendo en NaCl al 0,85% por 5 min a temperatura ambiente.
5. Se hace un lavado sumergiendo las placas en PBS por 5 minutos a temperatura ambiente.
6. Fijar la sección de tejido mediante inmersión de las placas en paraformaldehído al 4% (o usar un buffer formalina al 10% en PBS) por 15 minutos a temperatura ambiente.
7. Sumergir las placas en PBS por 5 minutos a temperatura ambiente
8. Remover el líquido de los tejidos y colocar las placas en una superficie plana. Preparar una solución Proteinasa K 20 ug/ml de la solución de Proteinasa K 10 mg/ ml de la reserva, diluyendo 1:500 en PBS. Añada 100 ul de los 20 ug/ml de la

solución de Proteinasa K a cada placa, e incube las placas a temperatura ambiente durante 10 a 30 minutos.

9. Lavar mediante inmersión las placas en PBS por 5 minutos en una jarra coplin.
10. Refijar la sección de tejido después, lavando mediante inmersión las placas en una solución de paraformaldehído al 4% (o una solución buffer formalina en PBS al 10%) por 5 minutos a temperatura ambiente.
11. Lavar mediante inmersión las placas en PBS Por 5 minutos a tempera ambiente, y repetir. Si requiere prepare un control positivo mediante tratamiento de una muestra con Dnasa 1 que causa una fragmentación del DNA
12. TRATAMIENTO CON Dnasa para control positivo (observar sección III punto D del protocolo)
13. Remueva el exceso de líquido mediante golpecitos de las placas, y luego cubra el tejido con buffer equilibrado con 100ul durante 5 a 10 minutos a temperatura ambiente.
14. Mientras las secciones de tejido están equilibrándose. Descongele la mezcla de Biotinylated Nucleotide en hielo y prepare suficiente mezcla de reacción TdT para todo el experimento y reacciones de control, manténgalo en hielo. 100 ul de la mezcla por placa van adecuar la cubierta del tejido. Observar la tabla 1 para hacer el cálculo de la preparación de TdT.
15. Para el control negativo: prepare un buffer control en incubación sin Enzima TdT por combinación 98 ul de buffer de equilibrio, 1ul de Biotinylated Nucleotide Mix y 1 ul de Agua dehionizada y Autoclavada, y luego procese desde los pasos 14 al

16. Secar alrededor de las áreas equilibradas con papel de tejido y añada 100 ul de la mezcla de reacción TdT a la sección en una placa, no permita que la sección se seque
17. Cubra la sección con cobertor plástico para asegurar una buena distribución del compuesto, incubar las placas a 37°C durante 60 minutos dentro de una cámara húmeda para permitir que la reacción de revelado ocurra.
18. Diluir la 20X SSC 1 en 10 con agua desionizada, remueva el cobertor plástico y termine la reacción mediante la inmersión de placas en 2X SSC por 5 minutos a temperatura ambiente.
19. Lavar mediante inmersión de las placas en PBS durante 5 minutos a temperatura ambiente, repetir este lavado 2 veces para remover biotinylated nucleotides.
20. Bloquear la peroxidasa endogena mediante inmersión de las placas en peróxido de hidrógeno al 0,3% por 3 a 5 minutos a temperatura ambiente. (no usar el peróxido de hidrógeno que viene en este kit para este paso).
21. Lavar en PBS por 5 minutos a temperatura ambiente, repetir 2 veces.
22. Diluir la solución de Streptavidin HRP 1:500 en PBS. Adicionar 100 ul en cada placa e incubar por 30 minutos a temperatura ambiente.
23. Lavar mediante inmersión en PBS por 5 minutos a temperatura ambiente y repetir 2 veces.
24. Combinar los componentes DAB justo antes de usar. Preparar 1 ml, añadir 50 ul de sustrato DAB, 20X buffer a 950 ul de agua desionizada. Entonces añada 50 ul de DAB 20X cromogen y 50 ul de peróxido de hidrógeno 20X. Añada 100 ul a cada placa y revele hasta que haya un ruido de fondo ligero, típicamente 10 minutos pero el tiempo necesario puede ser optimizando. No permita que el fondo se torne oscuro.

25. Enjuague muchas veces en agua desionizada
26. Coloque las placas en un medio acuoso o un medio de montaje permanente (100% de glicerol o medio de montaje permount para el medio acuoso, sellar los bordes de la cubierta con nail polish)
27. Observar en el microscopio.

ANEXO 6. PRUEBAS PARA DETECTAR NORMALIDAD Y HOMOGENEIDAD DE VARIANZA

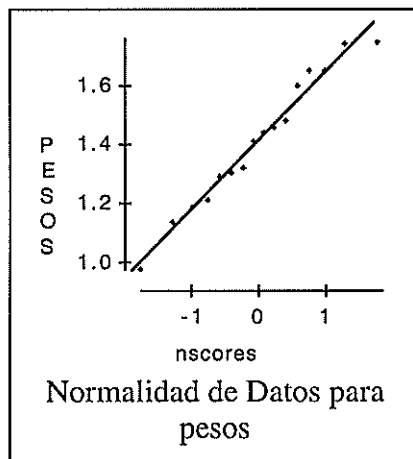
Normalidad de los datos de pesos, con la utilización del programa Data Desk, y la gráfica de normal probability plot, y se determinó la homogeneidad de varianza utilizando la prueba de Fmax para lo cual se obtuvo:

$$F_{o \max} = S^2_{\max} / S^2_{\min} = (0,27)^2 / (0,12)^2$$

$$F_{o \max} = 5.0625$$

Para $\alpha = 0,05$, con $t = 4$ y $v = 3$ $F_{\max \text{ tabulado}} = 39,2$

Como $F_{o \max} < F_{\max \text{ tabulado}}$, las varianzas de los datos observados son homogéneas.



ANEXO 7. ÍNDICE HISTOLÓGICO DE WSSV DETERMINADO POR CADA TRATAMIENTO

TRATAMIENTO	ÍNDICE	TOTAL POR TRATAMIENTO
31 °C + B-1,3-glucanos	0,025	0,025
31 °C + B-1,3-glucanos	0	
31 °C + B-1,3-glucanos	0	
31 °C + B-1,3-glucanos	0	
31 °C	0,25	0,6
31 °C	0,2	
31 °C	0,025	
31 °C	0,125	
24°C + B-1,3-glucanos	0,1	0,56875
24°C + B-1,3-glucanos	0,075	
24°C + B-1,3-glucanos	0,2188	
24°C + B-1,3-glucanos	0,175	
24°C	0	1
24°C	0,1	
24°C	0,8	
24°C	0,1	

9. BIBLIOGRAFÍA

- Abul, A. and A. Lichtman. 2000. Inmunología Celular y Molecular (Apoptosis). McGraw-Hill, 4 ed, España.
- Aqua Bounty Pacific. 2005. The SYBR Shrimp Kit Line.
<http://www.aquabounty.com/virus.htm>
- Atwood, A. and C. D. Sandeman. 1982. Neurobiology Structure and Function capitulo 8
- Bayot, B. 2005. Dinámica de la epidemia de WSSV. Parte 2: Análisis a 33 °C. CENAIM INFORMA, Boletín informativo No 127.
- Bell, T. and D. Lightner. 1988. A Handbook of Normal Penaeid Shrimp Histology. The World Aquaculture Society. State of Hawaii, Arizona. USA. 2-3.
- Blake, S. 2004. Contribución al estudio de los mecanismos celulares empleados por el camarón *Litopenaeus vannamei* para eliminar el virus del síndrome de la mancha blanca (wssv) Tesis CENAIM.
- Blas, I. 2002. CENAIM INFORMA. Boletín informativo No 68
- Calderón, J.V., B. Bayot, I. Betancourt, and A. de Graindorge V. 1999, Monitoreo del virus de la mancha blanca en Ecuador. El Mundo acuícola 5, 211-214
- Cárdenas, G. 2004. Determinación del comportamiento hemocitario en los tejidos de *Litopenaeus vannamei*, inmunoestimulados desde la fase larvaria y desafiados con WSSV. CENAIM INFORMA, Boletín informativo 102
- CENAIM. 2000. Programa de manejo en camaroneras para atenuar el impacto del WSSV... resultados preliminares. CENAIM INFORMA, Boletín informativo quincenal 15 de marzo.
- Cohen, J. 1993. Apoptosis review, Elsevier Science Publishers Ltd, UK. Vol.14 No. 3.

- Cotran, R.S., V. Kumar and S.L. Robbins.** 1989. Inflammation and repair. In: Sanders W.B. ed Robbins pathologic basis of disease. 4th edn. Harcourt Brace Jovanovich Inc, Philadelphia, PA, p 39-86
- Cruz, J.** 2003. CENAIM INFORMA, Boletín informativo No 76
- Chang, C.F., Su M.S., Chen H.Y., Lo C.F., Kou G.H. and Liao I.C.** 1999. Effect of dietary β -1,3-glucan on resistance to white spot syndrome virus (WSSV) in postlarval and juvenile *Penaeus monodon*. Diseases of Aquatic Organisms, 36:163-168
- Chang, C.F., Y. C Houng., S.S. Mao and I. C. Liao.** 2000. Immunomodulation by dietary β -1, 3-glucan in the brooders of the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. Fish and Shellfish Immunology, 10, 505-514.
- Chang, P.S., H.C. Chen and Y.C. Wang.** 1998. Detection of white spot syndrome associated baculovirus in experimentally infected wild shrimp, crab and lobsters by in situ hybridization. Aquaculture 164:233-242
- Chavarría, J.** 2003. Desarrollo de un sistema de alerta climática para acuicultura - Parte I: Las evidencias de la relación clima-producción. Boletín informativo No. 81, Fundación CENAIM-ESPOL, Guayaquil, Ecuador.
- Chou, H.Y., C.Y. Huang, C.F. Lo and G.H. Kou.** 1998. Studies on transmission of white spot syndrome associated baculovirus (WSBV) in *Penaeus monodon* and *P. Japonicus* via waterborne contact and oral ingestion. Aquaculture 164: 263-276
- Chou, H.Y., C.Y. Huang, C.H. Wang, H.C. Chiang and C.F.Lo.** 1995. Pathogenicity of a baculovirus infection causing White Spot Syndrome in cultured penaeid shrimp in Taiwan. Diseases of Aquatic Organisms. 23:165-173.
- des Clers, S.** 1994. Sampling to detect infections and estimate prevalence in aquaculture, Centre for Environmental Technology, London UK, pp: 39-44

- Dall, W., B.J. Hill, P.C. Rothlisberg and D.J. Staples.** 1990. The Biology of the *Penaeidae*. Marine Biology, Volume 27, pp: 39
- Duvall, E., A.H. Wyllie., R.G. Morris.** 1985. Macrophage recognition of cells undergoing programmed cell death (apoptosis). Immunology 56: 351-358
http://www.medonline.com.br/med_ed/med2/apoptose.htm
- Devaraja, T.N., S.K. Otta, G. Shubha, Indrani Karunasagar, P. Tauro and I. Karunasagar.** 1998. Immunostimulation of shrimp Through Oral Administration of Vibrio Bacterin and Yeast Glucan. Advances in shrimp biotechnology, mircen@ giasbg01. vsnl.net.in
- Echeverria, F., V. Otero, F. Cornejo, M. Montesdeoca, I. Betancourt, and J. Rodríguez.** 2001. WSSV y el ciclo de muda de *Litopenaeus Vannamei*. Que relación hay.?, CENAIM informa, boletín Informativo Quincenal, 30 de octubre
- Flegel, T., L. Nielsen, V. Thamavit, S. Kongtim and T. Pasharawipas.** 2004. Presence of múltiple viruses in non-diseased, cultivated shrimp at harvest., Aquaculture 240:55-68
- Flores, I.** 2002. ¿Es la muerte importante para la vida?. Universidad Nacional Autónoma de México, Vet.Méx., 33(2). http://www.ejournal.unam.mx/vet_mex/vol33-02/RVM33207.pdf
- Gavrieli, Y., Y. Sherman and S.A. Ben-Sasson.** 1992. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. J Cell Biol, 119(3):493-501 <http://www.bcm.edu/rosenlab/protocols/TUNEL.pdf>
- Granja, C., L. F. Aranguren., O. M. Vidal, L. Aragón, and M. Salazar.** 2003. Does hypertermia increase apoptosis in white spot syndrome virus (WSSV) infected *Litopenaeus vannamei*. Diseases of Aquatic Organisms 54: 73-78.

- Gitterle, T., R. Salte, B. Gjerde, J. Cock, H. Johansen, M. Salazar, C. Lozano and M. Rye.** 2005. Genetic (co) variation in resistance to White Spot Syndrome Virus (WSSV) and harvest weight in *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*. *Aquaculture* 246,139-149
- Greeting, L.** 2004. CENAIM INFORMA. Boletín informativo No 98
- Hasson, K., D. V. Lightner, L. Mohny, R. M. Redman and B. M. White.** 1999. Role of lymphoid organ spheroids in chronic Taura syndrome virus (TSV) infections in *Penaeus vannamei*. *Diseases Aquatic Organisms*, vol.38: 93-105
- Horst, M. and J. Freeman.** 1993. Crustacean Integument. Morphology and Biochemistry, capitulo 5:151:186
- Huang, C. C. and Y. L. Song.** 1999. Maternal transmission of immunity to white spot syndrome associated virus (WSSV) in shrimp (*Penaeus monodon*). *Developmental and Comparative Immunology PERGAMON*, 23: 545-552
- Kanchanaphum, P., C. Wongteerasupaya, N. Sitidilokratana, V.Boonsaeng, S.Panyim, A. Tassanakajon, B. Withyachumnarnkul, and T.W.Flegel.** 1998. Experimental transmission of White Spot Syndrome Virus (WSSV) from crabs to shrimp *Penaeus monodon*. *Diseases Aquatic Organisms Vol.34:1-7*
- Khanobdee, K., C. Soowannayan, T. W. Flegel, Sukathida Ubol and B. Withyachumnarnkul.** 2002. Evidence for apoptosis correlated with mortality in the giant black tiger shrimp *Penaeus monodon* infected with Yellow Head virus. *Diseases of Aquatic Organism*, vol 48: 79-90
- Kimura T., K. Yamano, H.Nakano, K. Momoyama, M.Hiraoka., K. Inouye,** 1996, Detection of Penaeid Rod-shaped DNA Virus (PRDV) by PCR, *Fish Pathology*, 31(2), 93-98

- Lightner, D. V.** 1996. Handbook of Pathology y Diagnostic Procedures for Diseases of Penaeid Shrimp. World Aquaculture Society, Baton Rouge, L.A., EE.UU.
- Lightner, D. and K. Tang,** 2000. Quantification of white spot síndrome virus DNA through a competitive polymerase Chain reaction. *Aquaculture*. 189:11-21
- Lightner, D. V., and R. M. Redman.** 1998. Shrimp diseases y current diagnostic methods. *Aquaculture* 164: 201-220
- Lo, C.F., J.H Leu., C.H Ho, S.E Peng., Y.T Chen., C.M Chour., P.Y Yeh., C.J Huang., H.Y.Chou., C.H Wang. and G.H Kou.** 1996. Detection of baculovirus associated with white spot síndrome (WSBV) in penaeid shrimps using polymerase Chain reaction. *Diseases Aquatic Organisms*. 25,133-41.
- Lo, C.F., C.H. Ho, C.H. Chen, K.F. Liu, Y.L. Chiu, P.Y. Yeh, S.E. Peng, H.C. Hsu, H.C. Liu, C.F. Chang, M.S. Su, C.H. Wang and G.H. Kou.** 1997. Detection and tissue tropism of white spot síndrome baculovirus (WSBV) in captured brooders of *Penaeus monodon* with a special emphasis on reproductive organs. *Diseases Aquatic Organisms*, Vol. 30: 53-72
- Lopez N., G. Cuzon, G. Gaxiola, G. Tabeada, M. Valenzuela, C. Pascual, A. Sanchez and C. Rosas.** 2003. Physiological, nutricional, and immunological role of dietary b 1-3 glucan and ascorbic acid 2-monophosphate in *Litopenaeus vannamei* juveniles. *ELSEVIER, Aquaculture* 224 223-243.
- Magno, G., and I. Joris.** 1995. Apoptosis, oncosis y necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol* 146: 3-16.
<http://www2.uah.es/daviddiaz/Apoptosis/caracteristicas.htm>
- Mohan, C.V, P.M. Sudha, K.M. Shankar and A. Hegde.** 1997. Vertical transmission of white spot baculovirus in shrimps-a possibility? *Current Science* 73 (2):109-110

- Molinero, L.** 2001. La Regresión Logística. Asociación de la Sociedad Española de Hipertensión. <http://www.seh-lclha.org/rlogis2.htm>
- Montgomery-Brock, D., Shimojo R.Y. and Cochrane kimber.** 2003. Increased Water Temperature Improves Survival of TSV- exposed Shrimp, Global Aquaculture Advocate brock002@hawaii.rr.com
- Moss, S.M.** 2002. Marine shrimp farming in the western hemisphere; past problems, present solutions, and future visions. *Rev. Fish. Sci.* 10, 601-602
- Namikoshi, A., J.L. Wu, T. Yamashita, T.Nishizawa, T. Nishioka, M. Arimoto and K. Muroga.** 2004. Vaccination trials with *Penaeus japonicus* to induce resistance to white spot syndrome virus. *Aquaculture* 229:25-35
- OIE. 2003. manual de diagnostico de enfermedades de animales acuáticos. http://www.oie.int/eng/normes/fmanual/a_00041.htm
- Olano, J.** 2004. Formación práctica en citometría de flujo aplicada al estudio de enfermedades infecciosas. www.minsa.gob.pe/PortalMINSA/capacitacion/informes/InformeHNCHAGUILAROLANO.doc
- Pacher, A.** 2006. Prof. Titular de Fisiopatología, Bioingeniería. Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de Entre Ríos. Courreges 40. (3100) Paraná, Entre Ríos, Argentina.e-mail: apacher@satlink.com
http://www.medonline.com.br/med_ed/med2/apoptose.htm
- Pantoja, C.R. and D.V. Lighner.** (2003).Similarity between the histopathology of White Spot Syndrome Virus and Yellow Head Syndrome Virus and its relevance to diagnosis of YHV disease in the Americas. *Aquaculture* 218, 47-54.
- Peng, S.E., C.F. Lo, K.F. Liu and G.H. Kou.** 1998. The transition from Pre-patent to Patent Infection of White Spot Syndrome Virus (WSSV) in *Penaeus monodon* Triggered by Pereiopod Excisión. *Fish Pathology*, 33(4), 395-400

- Peng, S.E., C.F. Lo, C.H. Ho, C.F. Chang, and G. h. Kou. 1998. Detection of white spot baculovirus (WSBV) in giant freshwater prawn, *macrobrachium rosenbergii*, using polymerase chain reaction. *Aquaculture* 164:253-262
- Phongdara A., W. Wanna and W. Chotigeat. 2006. Molecular cloning and expression of caspase from white shrimp *Penaeus merguensis*. *Aquaculture* 252: 114-120
- Ponce-Palafox, J., C. A. Martinez and L. Ross. 1997. The effects of salinity and temperature on the growth and survival rates of juvenile white shrimp, *Penaeus vannamei*, Boone, 1931. *Aquaculture* 157 : 107-115
- Promega. 2005. DeadEnd™Colorimetric TUNEL System, INSTRUCTIONS FOR USE OF PRODUCTS G7130 AND G7360. www.promega.com
- Quintero, E., T.Flegel, D. Fegan, V. Alday, P. Frelie and F. Jimenez. 1999. Resúmenes del seminario sobre técnicas de prevención del virus Mancha Blanca/White spot (WSSV) y virus cabeza amarilla/ Yellow Head (YHV). Panamá, Boletín Nicovita, volumen 4 ,ejemplar 04
- Raa, J. 2000. The use of immune-stimulants in fish and shellfish feeds, Avances en nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. Merida Yucatan, Mexico, P. 47-56. jan.raa@biotec.as
- Rajendran, K.V., K.K. Vijayan, T.C. Santiago and R.M. Krol. 1999. Experimental host range and histopathology of white spot syndrome virus (WSSV) infection in shrimp, prawns, crabs and lobsters from India. *Journal of Fish Diseases*, 22, 183–191
- Redondo, P., F. Garcia , J. Viera and M. Idoate. 2005. Estudio in vitro de la apoptosis melanocitaria, *Anales*, Vol 22, suplemento 3, Canales@cfnavarra.es
- Rodríguez,R., 2003a, La tilapia y su efecto en la prevalencia del virus de la mancha blanca (WSSV) en poblaciones de camarón. Tesis de Maestría, Centro

Ecuatoriano Nacional de Investigaciones Marinas, Escuela Superior Politécnica del Litoral, N° 164

Rodríguez, J. 2003. El incremento en la supervivencia al WSSV por efecto de la inmunoestimulación sería una característica familiar en *Litopenaeus vannamei*. CENAİM Informa, Boletín Informativo No 94.

Rodríguez, J., F. Echeverría, C. Molina, S. Sonnelhozner, A. Arias, J. Apolo and J. Calderón. 2002. El efecto combinado de una precría en hipertermia e inmunoestimulación. Una alternativa para incrementar la producción de cultivos semi-intensivos en condiciones de WSSV. CENAİM http://www.cenaim.espol.edu.ec/publicaciones/ma9_1/articulos/art2.pdf

Rodríguez, J., B. Bayot, Y Amano, F Panchana, I de Blas, V Alday, and J. Calderón. 2003. White spot syndrome virus infection in cultured *Penaeus vannamei* (Boone) in Ecuador with emphasis on histopathology and ultrastructure. Fundación CENAİM – ESPOL, Journal of Fish Diseases, 26, 439-450

Rodríguez, J., F. Echeverría, A. Arias and J. Apolo. 2004. el efecto combinado de una precría en invernadero e inmunoestimulación con β -1,3-glucanos sobre el cultivo de camarón *L. vannamei* en el verano del 2003. CENAİM Informa Boletín Informativo No 108.

Rodríguez, J. 2005a. Información sobre el uso de inmunoestimulante en cultivo de camarón con particular referencia a los β -1,3-glucanos. CENAİM Informa, Boletín Informativo No 129.

Rodríguez, J. 2005b. Efecto sobre la respuesta inmune y la supervivencia a desafíos con WSSV de la combinación temperatura inmunoestimulantes.

- Roux, M., A. Pain, K.R. Klimpel, and A. K. Dhar.** 2002. The Lipopolysaccharide and β -1,3-glucan binding protein gene is upregulated in white spot virus-infected Shrimp (*Penaeus stylirostris*). Journal of virology, p 7140-7149
- Savill, J.** 1994. Apoptosis in disease. Eur J Clin Invest;24:715-723.
- Sangamaheswaran, A. and M. Jeyaseelan.** 2001. White Spot Viral Disease in Penaeid Shrimp, Naga, The ICLARM Quarterly, vol. 24.
- SERVET:** servet.uab.es/histologia/docencia/HMA2005/Temateoria/Tema7/Tema7.doc
- Sonnenholzner, S.** 2002a. Tolerancia de temperatura. CENAIM INFORMA Boletín informativo No.64
- Sonnenholzner, S.** 2002b. Desafío con WSSV bajo fluctuaciones de temperatura. CENAIM INFORMA Boletín informativo No.63
- Sonnenholzner, S., J. Rodríguez, F. Pérez, I. Betancourt, F. Echeverría, and F. Panchana.** 2002a. Supervivencia, prevalencia del virus y respuesta inmune de camarones juveniles, *L. Vannamei*, desafiados a WSSV a diferentes temperaturas. CENAIM INFORMA Boletín informativo No.48
- Sonnenholzner, S., J. Rodríguez, F. Pérez, I. Betancourt, F. Echeverría, and J. Calderón.** 2002b. Supervivencia y respuesta inmune de camarones juveniles *Litopenaeus vannamei* desafiados por vía oral a WSSV a diferentes temperaturas. El Mundo Acuícola 8 (1): 50-56
<http://www.cenaim.espol.edu.ec/publicaciones/boletin81/13.pdf>.
- Sonnenholzner, S., Rodríguez and J. Calderón.** 2002c. Temperatura y WSSV: Estudios prometedores del CENAIM sobre técnicas de cultivo de camarón Advocate, Agosto 2002:55-57
- Sonnenholzner, S.** 2004. Supervivencias de Camarón Cultivado en el Ecuador antes de la Mancha Blanca. CENAIM informa, boletín Informativo N°113

- Sudha, P.M., C.V. Mohan, K.M. Shakarad and A. Hegde.** 1998. Relationship between White Spot Síndrome Virus infection and clinical manifestation in Indian cultured penaeid shrimp. *Aquaculture* 167:95-101
- Sung, H. H., G. H. Kou and Y. L.Song.** 1993. Vibriosis resistance induced by glucan treatment in tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Fish Pathology*, 29 (1), 11-17
- Sung, H.H., Y. L. Yang, and Y.L Song.** 1996. Enhancement of microbicidal activity in the tiger shrimp *Penaeus monodon* vía immunostimulation, *Journal of crustacean biology*, 16 (2): 278-284
- Supamattaya, K., R.W. Hoffmann, S. Boonyaratpalin and P. Kanchanaphum.** 1998. Experimental transmission of white spot syndrome virus (WSSV) from black tiger shrimp *Penaeus monodon* to the sand crab *Portunus pelagicus*, mud crab *Seylla serrata* and Krill *Acetes sp.* *Diseases Aquatic Organisms*. 32:79-85
- Tang, K. and D.V. Lightner.** 2000. Quantification of White spot syndrome virus DNA though a competitive polymerase chain reaction. *Acuaculture* 189 : 11-21
- Thompson, C.B.** 1995 Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267:1456-1462
- Towsend, S.** 2002. CENAIM INFORMA, Boletín informativo No 66
- Tsai, M.F., G. H. Kou, H.C. Liu, K.F. Liu, C.F. Chang, S.E. Peng, H.C. Hsu, C.H. Wang and C.F. Lo.** 1999. Long – term presence of white spot síndrome virus (WSSV) in a cultivated shrimp population without disease outbreaks, *Diseases Aquatic Organisms*, Vol 38: 107 – 114
- Tsujimoto, Y.** 1997, Apoptosis and necrosis: Intracellular ATP level as a determinant for cell death modes. *Cell Death and Differentiation* vol 4, 429-434
- Van de Braak, K., M.H.A. Botterblom, E.A. Huisman, J.H.W. Rombout, and 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 Organism 51, 149-155

Vidal, O. M., C. B. Granja, F. Aranguren, J. A. Brock and M. Salazar. 2001. A profound effect of hyperthermia on survival of *Litopenaeus vannamei* juveniles infected with white spot syndrome virus. Journal of the World Aquaculture Society 32 (4): 364-372.

Venegas, C.A., L. Nonaka, K. Mushiake, T. Nishizawa and K. Muroga. 2000. Quasi-immune response of *Penaeus japonicus* to penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV). Diseases Aquatic Organisms 42: 83-89

Wang, Y.C., C.F.Lo, P.S. Chang and G.H. Ko. 1998. Experimental infection of white spot baculovirus in some cultured and wild decapods in Taiwan. Aquaculture 164:221-231

Wang, Y.G., M. D. Asan, M. Shariff, S.M. Zamri and X. Chen. 1999. histopathology and cytopathology of white spot syndrome virus (WSSV) in cultured *Penaeus monodon* from peninsular Malaysia with emphasis on pathogenesis and the mechanism of white spot formation, Diseases Aquatic Organisms Vol.39. No. 1, Inter.-Reserch, Science Publisher.

Witteveldt, J., J.M. Vlak, M.C.W. van Hulten, 2003, Protection of *Penaeus monodon* against white spot syndrome virus using a WSSV subunit vaccine., Fish and Shellfish immunology. Journal of virology, p 2057 2057–2061 Vol. 78, No. 4

Wongprasert, K., K. Khanobdee, S.S. Glunukarn, P. Meeratana. and B. Withyachumnarnkul. 2003. Time-course and levels of apoptosis in various tissues of black tiger shrimp *Penaeus monodon* infected with white – spot syndrome virus, Diseases of Aquatic organisms Vol, 55: 3-10

- Wu, J.L., A. Namikoshi, T.Nishizawa, K.Mushiake, K. Teruya and K.Muroga.** 2001. Effects of shrimp density on transmission of penaeid acute viremia in *Penaeus japonicus* by cannibalism and the waterborne route. *Diseases Aquatic Organisms*, Vol.47: 129-135
- Wu, J.L., T. Nishioka, K. Mori, T. Nishizawa, and K. Muroga.** 2002. A time- course study on the resistance of *Penaeus Japonicus* induced by artificial infection with white spot syndrome virus, *Fish and Shellfish Immunology*, 13, 391-403
- Wu, J.L. and K. Muroga.** 2004. Apoptosis does not play an important role in the resistance of immune *Penaeus japonicus* against white spot syndrome virus. *Journal of Fish Diseases*, 27, 15-21
- Wyban, J., W.A. Walsh, and D.M. Godin.** 1995. Temperature effects on growth, feeding rate and feed conversion of the pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*). *Aquaculture*. 138, 267-279
- Wyllie, A.H.** 1980. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation, *Nature*, 284:555-556
http://www.medonline.com.br/med_ed/med2/apoptose.htm