



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

“Respuesta inmunitaria en familias de *Litopenaeus vannamei*, bajo condiciones de infección con WSSV y el efecto de la adición de β -1,3 glucanos”

Tesis de Grado previa a la obtención del título de:

MAGISTER EN CIENCIAS

Presentada por:

MARTHA MALDONADO VILLAVICENCIO

GUAYAQUIL – ECUADOR

2003

TESIS ELABORADA CON EL SOPORTE DE:



FUNDACION CENAIM-ESPOL



COOPERACION TECNICA BELGA



**UNIVERSIDAD DE GANTE
BELGICA**



**UNIVERSIDAD CATOLICA
DE LOBAINA – BELGICA**

VITA

Martha Alexandra Maldonado Villavicencio, realizó sus estudios superiores en la Universidad de Guayaquil - Escuela de Biología. En 1996, obtuvo el título de Bióloga. En el mismo año ingreso a trabajar en el Proyecto "Optimización de la productividad en piscinas camaroneras", en la Fundación Cenaim-Espol. En Octubre del 2000 ingreso al Programa de Maestría en Acuicultura Marina, en la Escuela Superior Politécnica del Litoral y completó su Maestría en Septiembre del 2002.

DECLARACION 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 POLITECNICA DEL LITORAL.”

(Reglamento de Exámenes y Títulos profesionales de la ESPOL).

Martha Maldonado V.

TRIBUNAL DE TESIS

Ing. Eduardo Cervantes
Presidente del Tribunal

Jenny Rodríguez, Ph.D.
Director de Tesis

José Melena
Miembro del Tribunal

Laurence Massaut, Ph.D.
Miembro del Tribunal

Franklin Pérez, M.Sc.
Miembro del Tribunal

AGRADECIMIENTOS

El agradecimiento infinito al ser supremo por ayudarme a culminar esta etapa de mi vida. A mis padres y hermanos, quienes con su amor y confianza pusieron ésta obra en mis manos. A Tomas por su paciencia y amor.

A las instituciones Fundación CENAIM-ESPOL y a la Cooperación Técnica al Desarrollo-Bélgica por la coordinación y el financiamiento brindado. A sus directores Dr. Jorge Calderón y Dra. Laurence Massaut por incentivar a la investigación y hacer mérito al esfuerzo y dedicación.

A la Dra. Jenny Rodríguez, gracias por transmitirme su paciencia, comprensión y espíritu de investigador, características imprescindibles para guiar una tesis.

Al Dr. Ignacio de Blas Giral, Profesor Asociado del Departamento de Patología Animal. Universidad de Zaragoza. España, por su orientación profesional y apoyo, necesarios para un trabajo de esta índole, un ejemplo digno de imitar.

Un agradecimiento especial a todas las personas que colaboraron en la elaboración de esta tesis: Fanny Panchana, Jorge Muñoz, Claudia Flores, Edna Erazo, Fabrizio Echeverria, Franklin Pérez, José Melena y Ruby Montoya.

A Stanislaus Sonnenholzner por su tiempo y ayuda desinteresada.

A todos y a cada miembro del CENAIM, por compartir buenas experiencias. Entre ellos: María del Pilar B, Adriana F, Víctor B, Romulo M, Maritza C, Carmen C, Miguel U, Carmela N, Jhonny L, Ivan A, Jaime S, Edna E, Mare C, Marita, Maria Elena, Jaime C, Yela P, Mervin G, Ruben R y Luis R.

A Ecuador, por ser un país que abre las puertas a todos, sin importar credos, ni jerarquías. Al pueblo de San Pedro, por su gente valiosa y respetable.

DEDICATORIA

A gente honesta y crítica.
A tesistas de inmunología.
Al WSSV, por ser tan eficaz.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABLAS	xiii
RESUMEN	xv
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 LA MANCHA BLANCA	3
2.1.1. La evolución de la enfermedad	3
2.1.2. Signos clínicos de infección por WSSV	6
2.1.3. Características histopatológicas	7
2.1.4. Características ultraestructurales	8
2.2. EL SISTEMA INMUNE	8
2.2.1. Compartimiento celular	9
2.2.2. Características de los hemocitos	10
2.2.3. Defensas celulares	11
2.2.4. Compartimiento humoral	12
2.2.5. El sistema inmune de los crustáceos frente a infecciones vírales	14
2.3. ESTRATEGIAS PARA CONTROLAR EL PROBLEMA DE LA MANCHA BLANCA	16
2.3.1. Selección genética	16
2.3.2. Manejo	16
3. MATERIALES Y MÉTODOS	21
3.1. MATERIAL BIOLÓGICO	21

3.2. LARVICULTURA Y PRE-CRÍA	21
3.3. PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN VIRAL	22
3.4. PREPARACIÓN DE LA PAPILLA INFECTADA	22
3.5. SISTEMA EXPERIMENTAL	22
3.6. BIOENSAYO I: SELECCIÓN DE FAMILIAS	23
3.6.1. Diseño experimental	23
3.6.2. Protocolo de manejo del experimento	23
3.6.3. Análisis estadístico	24
3.7. MARCAJE DE FAMILIAS	24
3.8. BIOENSAYO II: INMUNOESTIMULACIÓN Y SEGUNDA PRUEBA DE DESAFÍO AL WSSV	25
3.8.1. Diseño Experimental	25
3.8.2. Protocolo de manejo del experimento	26
3.8.3 Análisis estadístico	26
3.9. BIOENSAYO III: PRUEBA DE DESAFÍO - EVOLUCIÓN DE LA INFECCIÓN	26
3.9.1. Diseño experimental	27
3.9.2. Protocolo de manejo del experimento	27
3.9.3. Análisis estadístico	28
3.10. TÉCNICAS UTILIZADAS	29
3.10.1. Pruebas Inmunitarias: Hemogramas y Proteínas Plasmáticas	29
3.10.2. Histopatología	30
3.10.2.1. Elaboración de grados: WSSV, piknosis-kariorexix, infiltración, encapsulación y presencia de esferoides en el órgano linfoide	30

3.10.2.2. Elaboración de índices histológicos-patológicos y de respuesta inmunitaria	31
4. RESULTADOS	34
4.1. BIOENSAYO I: SELECCIÓN DE FAMILIAS	34
4.2. BIOENSAYO II: INMUNOESTIMULACIÓN Y SEGUNDA PRUEBA DE DESAFÍO AL WSSV	35
4.3. BIOENSAYO III: PRUEBA DE DESAFIO – EVOLUCION DE LA INFECCIÓN	38
4.3.1. Histopatología	38
4.3.2. Comportamiento hemocitario en los tejidos	43
4.3.3. Comportamiento de hemocitos en circulación	49
4.3.4. Proteínas Plasmáticas	62
5. DISCUSIÓN	65
5.1. BIOENSAYO I	65
5.2. BIOENSAYO II	67
5.3. BIOENSAYO III	68
CONCLUSIONES	80
RECOMENDACIONES	84
BIBLIOGRAFÍA	85
ANEXOS	98

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Curvas de supervivencia de familias de <i>Litopenaeus vannamei</i> en estadio PL75 infectadas experimentalmente.	34
Figura 2	Curva de supervivencia de la familia F11 desafiada con WSSV durante 192 horas, previamente inmunoestimulada y no inmunoestimulada	37
Figura 3	Microfotografía de corte histológico de juvenil de <i>Litopenaeus vannamei</i> desafiado con el virus del síndrome de la mancha blanca. Presencia de células infectadas 48 horas después de la infección.	39
Figura 4	Microfotografía de corte histológico de juvenil de <i>Litopenaeus vannamei</i> desafiado con el virus del síndrome de la mancha blanca. Presencia de células infectadas 72 horas después de la infección.	40
Figura 5	Índice histológico WSSV de las familias F1 y F12 luego de ser infectadas experimentalmente.	41
Figura 6	Índice histológico PK de las familias F1 y F12 luego de ser infectadas experimentalmente.	42
Figura 7	Microfotografías de cortes histológicos de juveniles de <i>Litopenaeus vannamei</i> desafiados con el virus del síndrome de la mancha blanca. Núcleos picnóticos en la ceca anterior del estómago.	42
Figura 8	Microfotografías de cortes histológicos de juveniles de <i>Litopenaeus vannamei</i> desafiados con el virus del síndrome de la mancha blanca en el corazón presencia de núcleos hipertrofiados, kariorrexis y piknosis.	43
Figura 9	Índice inmunitario de infiltración de las familias F1 y F12 luego de ser infectadas experimentalmente.	44
Figura 10	Microfotografía de corte histológico de juveniles de <i>Litopenaeus vannamei</i> desafiado con el virus del síndrome de la mancha blanca.	

Infiltración en el tejido conectivo del estómago.	44
Figura 11 Índice inmunitario de encapsulación de las familias F1 y F12 luego de ser infectadas experimentalmente.	45
Figura 12 Microfotografías de cortes histológicos de juveniles de <i>Litopenaeus vannamei</i> desafiados con el virus del síndrome de la mancha blanca. Encapsulaciones en el órgano linfoide y tejido conectivo del estómago.	46
Figura 13 Microfotografías de cortes histológicos de juveniles de <i>Litopenaeus vannamei</i> desafiados con el virus del síndrome de la mancha blanca. Presencia de esferoides en el órgano linfoide.	47
Figura 14 Índice inmunitario de esferoides de las familias F1 y F12 luego de ser infectadas experimentalmente.	48
Figura 15 Presencia de esferoides según el morfotipo en juveniles de <i>Litopenaeus vannamei</i> infectados experimentalmente durante tres días con WSSV.	49
Figura 16 Comportamiento del número de hemocitos semigranulosos en la hemolinfa de camarones infectados con WSSV.	57
Figura 17 Comportamiento del número de hemocitos hialinos en la hemolinfa de camarones infectados con WSSV.	58
Figura 18 Comportamiento del número de hemocitos atípicos en la hemolinfa de camarones infectados con WSSV.	59
Figura 19 Comportamiento del porcentaje de hemocitos granulosos en la hemolinfa de camarones infectados con WSSV.	60
Figura 20 Comportamiento del porcentaje de hemocitos semigranulosos en la hemolinfa de camarones infectados con WSSV.	61
Figura 21 Comportamiento del porcentaje de hemocitos atípicos en la hemolinfa de camarones infectados con WSSV.	62

LISTA DE TABLAS

Tabla 1	Códigos utilizados en los segmentos abdominales de los animales de cada familia.	24
Tabla 2	Descripción del peso de los tejidos en el índice de infección por WSSV.	31
Tabla 3	Ejemplo de la forma cómo se obtuvo el índice histológico para WSSV.	32
Tabla 4	Ejemplo de la elaboración del índice histológico para la presencia de esferoides en el órgano linfoide.	33
Tabla 5	Prueba no paramétrica Kruskall Wallis para la supervivencia de familias luego de 15 días de infección.	35
Tabla 6	Datos de supervivencia y esperanza de vida en familias de <i>Litopenaeus vannamei</i> no infectadas (control). Los animales no recibieron β -1,3 glucanos.	36
Tabla 7	Análisis de las curvas de supervivencias de Kaplan Meier en familias de <i>Litopenaeus vannamei</i> inmunoestimuladas y no inmunoestimuladas, bajo condiciones de infección durante 8 días (192 horas)	37
Tabla 8	Análisis de varianza de los hemogramas antes de la infección experimental.	50
Tabla 9	Concentraciones de hemocitos (10^6 ml^{-1}) en diferentes familias de <i>Litopenaeus vannamei</i> .	51
Tabla 10	Porcentajes de hemocitos (%) en diferentes familias de <i>Litopenaeus vannamei</i>	52
Tabla 11	Análisis de varianza del hemograma luego de 24 horas de infección.	52
Tabla 12	Hemograma después de 24 horas post-infección en número (10^6 ml^{-1}) y en porcentaje en familias de <i>Litopenaeus vannamei</i>	53

Tabla 13	Valores de probabilidad (p) del análisis de varianza de los hemogramas de familias de <i>Litopenaeus vannamei</i> desafiadas al WSSV.	54
Tabla 14	Prueba de rangos múltiples (Duncan) del NTH en familias de <i>Litopenaeus vannamei</i> y tiempo de infección con WSSV.	55
Tabla 15	Prueba de rangos múltiples (Duncan) del número de hemocitos granulados en familias de <i>Litopenaues vannamei</i> y tiempo de infección.	56
Tabla 16	Prueba de rangos múltiples (Duncan) de la subpoblación de hemocitos hialinos (%) en los diferentes tiempo de infección.	61
Tabla 17	Prueba de rangos múltiples (Duncan) en la concentración de proteínas plasmáticas en familias de <i>Litopenaeus vannamei</i> (tiempo 0 y 24).	63
Tabla 18	Prueba de rangos múltiples (Duncan) en la concentración de proteínas plasmáticas de las familias de <i>Litopenaeus vannamei</i> que fueron desafiadas al WSSV.	64
Tabla 19	Comparaciones del comportamiento hemocitario circulante e infiltrante entre 4 familias, 2 resistentes y 2 susceptibles al WSSV, y la información bibliográfica disponible para peneidos.	79

RESUMEN

El virus causante de la mancha blanca (WSSV por sus siglas en inglés) es altamente letal. Sin embargo se han detectado diferencias en supervivencias a nivel familiar. Esto ha creado una expectativa de selección genética basada en familias. Seleccionar familias cuya respuesta inmunitaria esté implicada en la resistencia al WSSV podría implicar que esta resistencia sea extensiva a otros virus causantes de pérdidas económicas. En esta investigación se ha examinado la respuesta inmunitaria de familias de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* resistentes y susceptibles al WSSV. Se analizó además si existe un respuesta diferente de las familias a la inmunoestimulación con β -1,3 glucanos.

De un total de 27 familias evaluadas en PL75, 10 fueron resistentes en base a la supervivencia final (15 días) al desafío con WSSV. Se encontró en un segundo bioensayo que en las familias resistentes, la mortalidad causada por WSSV puede incrementarse si son desafiadas al WSSV en cohabitación con las familias susceptibles. Bajo las condiciones de experimentación se encontró un efecto significativo de la inmunoestimulación en la curva de supervivencia de una sola familia (F11 resistente). En esta misma familia (F11 resistente), el número de hemocitos hialinos permaneció bajo antes de la infección, sugiriendo que estos hemocitos participaron en la respuesta inmediata, al encontrarse en sitios estratégicos. Además el porcentaje de hemocitos atípicos disminuyó significativamente a las 24 hrs de infección. La rápida proliferación de hemocitos saludables y la ubicación de estos en sitios estratégicos serían características propias de esta familia. Una característica general de todas las familias (resistentes y susceptibles), fue el aumento de los hemocitos semigranulosos (en número y porcentaje) luego de 24 hrs de infección. Las familias susceptibles presentaron un alto contenido de

hemocitos atípicos antes del desafío, sugiriendo la existencia de una infección previa. El análisis histológico de la F1 mostró que los hemocitos dejaron la circulación y migraron a los tejidos de mayor infección para encapsular células muertas y formar esferoides en el órgano linfoide. En la familia F12 los índices de infiltración y encapsulación permanecieron constantes, sugiriendo que en las familias susceptibles los hemocitos no participaron en la activación del sistema inmune. Además en la familia F1 el índice de esferoides se incrementó en 24 hrs, en tanto que en la familia F12 el incremento fue observado únicamente en los animales supervivientes del tercer día. En la familia F12 predominaron los esferoides de tipo B desde las 24 hrs post-infección. Los resultados indican que las diferencias en supervivencias entre diferentes familias a desafíos contra WSSV podrían basarse en diferente respuesta inmunitaria y grados de proliferación y activación hemocitaria entre familias.

INTRODUCCIÓN

El WSSV constituye uno de los agentes infecciosos más difíciles de contrarrestar para la industria camaronera del mundo entero. En Ecuador la producción de camarón se ha reducido significativamente de 60.689 TM en el primer semestre de 1999 a 25.666 TM en el primer semestre de 2002 (Cámara Nacional de Acuicultura, 2002), debido a masivas mortalidades presentadas en los sistemas de cultivo a causa de éste agente patógeno.

El CENAIM (Centro Nacional de Acuiculturas e Investigaciones Marinas) y algunas compañías privadas están desarrollando programas de selección genética, buscando animales que demuestren ser resistentes al WSSV. Ensayos de desafíos con el virus realizados en familias de *Litopenaeus vannamei* han mostrado diferencias significativas en supervivencia, encontrándose familias con supervivencias máximas del 15% y otras del 4% (Pérez *et al.*, 2002). En especies como *Litopenaeus stylirostris* se ha encontrado una resistencia innata al TSV y ha sido seleccionada genéticamente una línea para resistencia al IHHNV (Lightner, 1999). El desarrollo de una línea resistente a una infección viral es de gran valor para la industria acuícola. Además de los beneficios directos para los productores, las líneas resistentes a IHHNV pueden ser usadas para estudiar los mecanismos implicados en la resistencia viral (Tang *et al.*, 2000).

Se podría considerar teóricamente, que la resistencia a un patógeno viral específico basada en un sistema inmune altamente eficaz, podría conferir a los animales resistencia a otros patógenos virales. En términos prácticos, la consecuencia de realizar una selección de este tipo sería minimizar los efectos de otros agentes virales no reportados en el hemisferio occidental, como el virus de la cabeza amarilla (YHV por sus siglas en inglés).

Es por lo tanto imprescindible comprender el comportamiento de los diversos procesos de defensa inmunitaria del camarón ante la presencia de un agente extraño y altamente infeccioso como el WSSV.

En este estudio se buscó evaluar la respuesta inmune de familias resistentes y sensibles al WSSV en el curso de una infección, estudiando el comportamiento de los hemocitos circulantes (hemogramas) e infiltrantes (histología). Igualmente, para obtener información relacionada al manejo de familias resistentes, se estudió si esta resistencia puede ser incrementada adicionando inmunoestimulantes como los β -1,3 glucanos a la dieta de los juveniles antes del desafío.

2. ANTECEDENTES

La principal amenaza para el desarrollo de la industria camaronera son las enfermedades infecciosas especialmente las causadas por virus (Lightner, 1999). Aunque existen cerca de 20 virus reconocidos para camarones peneidos, únicamente cuatro tipos tienen importancia económica para la industria acuícola: YHV (Yellow Head Virus), WSSV, IHNV (Infectious Hematopoietic Necrosis virus) y TSV (Taura Syndrome Virus). Estos virus denotan gran importancia en el futuro de la camaronicultura en el hemisferio occidental (Le Moullac *et al.*, 1998). La “Mancha Blanca” causada por el WSSV ha provocado pérdidas millonarias en América en estos dos últimos años (Berger, 2000), siendo la más devastadora reportada hasta el momento para camarones peneidos cultivados (Lightner, 1996; Flegel, 1997). Después de los primeros reportes de la presencia de WSSV en América Central (Jory y Dixon 1999), la enfermedad se detectó en Ecuador en mayo de 1999 y fue asociada a mortalidades masivas en ciertas camaroneras (Calderón *et al.*, 1999).

2.1. LA MANCHA BLANCA

2.1.1. La evolución de la enfermedad

Pruebas de desafío al WSSV han demostrado que este virus es altamente virulento, llegando a provocar mortalidades de hasta el 100 % en los animales desafiados (Sahul *et al.*, 2001). En los estanques de cultivo de *P. vannamei* del Ecuador, información anecdótica señala que la enfermedad se presenta entre la tercera y sexta semanas de cultivo.

En una infección con WSSV es importante considerar la gran velocidad de replicación del virus, el poder de propagación, las múltiples vías de infección, el amplio número de

hospederos y el estado fisiológico del hospedero. El WSSV tiene una diversidad de hospederos, todos los crustáceos ensayados son susceptibles de infectarse con el virus (Wang *et al.*, 1997; Corbel *et al.*, 2001; Jiravanichpaisal *et al.*, 2001), los que pueden actuar como vectores y/o reservorios (Wang *et al.*, 1997). Entre las 24 y 35 horas el virus se multiplica 140 veces en los tejidos (Tang y Lightner, 2000). A nivel histológico, lesiones han sido observadas desde las 36 hrs de post-infección por ingestión (Sonnenholzner *et al.*, 2002). Grados severos de lesiones por WSSV se han observado en muestras tomadas entre los días tercero y séptimo después de iniciarse la infección (Lightner *et al.*, 1998; Sonnenholzner *et al.*, 2002). Además la infección por WSSV se caracteriza por afectar un rango amplio de tejidos blancos, entre los que se encuentran branquias e integumento, siendo los primeros tejidos que se infectan y presentan mayores cargas virales que el músculo abdominal (Soon *et al.*, 2001), tejido epitelial, tejido conectivo (Chang *et al.*, 1996), tejido hematopoyético y hemocitos (Durand *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 2002), los primeros son de amplia distribución en el animal, en tanto que los hemocitos son los principales efectores de la respuesta inmune en los crustáceos (Johanson y Söderhäll, 1989).

Por otra parte el estado fisiológico del hospedero sería también un aspecto crucial. En *P. vannamei* la susceptibilidad al virus sería mayor a temperaturas frías (inferiores a 31°C). En estanques comerciales se han observado mayores pérdidas en la estación fría-seca que en la estación cálida-lluviosa (Bayot *et al.*, 2002), en tanto que en ensayos de desafío a diferentes temperatura se ha detectado resistencia en condiciones de hipertermia (Vidal *et al.*, 2001; Sonnenholzner *et al.*, 2002). Así mismo resulta interesante el hecho de que los animales infectados con WSSV mueren en postmuda (Echeverría *et al.*, 2002), sugiriendo

una mayor susceptibilidad al virus durante la premuda, tal como ha sido reportado para TSV por Hasson *et al.* (1999a).

El virus del WSSV ha sido mejor estudiado en infecciones experimentales valiéndose de vías de infección como inyección, inmersión e ingestión (Takahashi *et al.*, 1994). Las infecciones realizadas por ingestión representan la manera mas natural de infección (Lightner *et al.*, 1998) y proveen una herramienta para evaluar y comparar resistencia a virus entre familias de *L. vannamei* (Moss *et al.*, 2001). Las infecciones por inmersión con WSSV realizadas en *L. vannamei* (Wu *et al.*, 2001) han demostrado que el agua constituye un vehículo de transmisión. Las infecciones por inyección tienen la ventaja de que permite asegurar la infección con concentraciones virales conocidas y estandarizadas, sin embargo violan la primera barrera natural que es la cutícula y los mecanismos de defensa a ella asociados. El sitio de inyección característico es la unión basal del 5^{to} pereiópodo para cangrejos y entre el 2^{do} y 3^{er} segmento abdominal para camarones de agua dulce, camarones marinos y langostas (Corbel *et al.*, 2001).

La literatura ha reportado diferencias en la susceptibilidad al virus en diferentes especies de crustáceos. Observándose un 100% de mortalidad infectado por inyección intramuscular en, *Penaeus indicus*, *Penaeus monodon*, *Macrobrachium lamerrae* y *Macrobrachium idella* al final de 72 hrs, 48 hrs, 5 días y 8 días de post-inoculación respectivamente (Sahul *et al.*, 2000). Mortalidades entre el 3^{er} y 6^{to} día post infección han sido reportados en post-larvas de *Penaeus aztecus*, *Penaeus duorarum* y *L. vannamei*. Se han descrito mortalidades acumuladas del 100% para juveniles de *Penaeus setiferus* y *L. vannamei* al 8^{vo} día (Lightner *et al.*, 1998). En contraste *P. aztecus* demostró ser más resistente observándose un 27% de mortalidad acumulada en el mismo tiempo (Lightner

et al., 1998). En los cangrejos *Liocarcinus puber* y *Liocarcinus depurator*, el 100% de mortalidad se presenta al 8^{vo} y 9^{vo} día respectivamente (Corbel *et al.*, 2001). El rápido incremento en la mortalidad entre el 4^{to} y 5^{to} día, ha sido señalado ser una característica de las infecciones virales (Corbel *et al.*, 2001; Soon *et al.*, 2001).

Durante la fase de infección, el virus está presente en muchos órganos y el diagnóstico involucra PCR, PCR anidado, sondas moleculares (hibridación in situ, inmunohistoquímica) y observaciones histológicas usando microscopio óptico y microscopio electrónico de transmisión (Lo *et al.*, 1997).

2.1.2. Signos clínicos de infección por WSSV

Los signos típicos del WSSV descritos en camarones peneidos son puntos blancos de 1 a 2 mm de diámetro dentro de la superficie del caparazón, observándose en el microscopio óptico una área oscura en el centro de este punto (Takahashi *et al.*, 1994; Soon *et al.*, 2001). El color del cuerpo de los animales enfermos está pálido a rojizo y el órgano linfoide se presenta turgente o contraído (Takahashi *et al.*, 1994) o hipertrofiado (Vidal *et al.*, 2001). En animales experimentalmente infectados, las características observadas han sido: coloración rojiza en urópodos, telson, pereiópodos, y pleópodos. Los animales presentan actividad reducida, desorientación, nado errático y falta de apetito. Estos mismos signos clínicos han sido observados después de 3 días de infección en cangrejos como *L. puber* y *L. depurator*, presentándose una rápida reducción en la ingestión del alimento y letargia, seguida de una mortalidad del 50% (Corbel *et al.*, 2001). El camarón de agua dulce *M. rosenbergii* no muestra signos clínicos de infección (Sahul *et al.*, 2000). Alteraciones en el color de la hemolinfa han sido detectadas tanto en camarones como en

el cangrejo de agua dulce (Montesdeoca *et al.*, 2002; Jiravanishpaisal *et al.*, 2001), la cual puede presentarse de tono rosado en lugar del clásico azul-verdoso.

2.1.3. Características histopatológicas

A nivel histológico, los camarones muestran grados severos de infecciones por WSSV en muestras tomadas entre los días tercero y séptimo después de iniciarse la infección (Lightner *et al.*, 1998). Lesiones histopatológicas características de mancha blanca han sido observadas incluso a las 36 hrs de post-infección por ingestión (Sonnenholzner *et al.*, 2002).

Estudios histológicos de animales moribundos revelan células degeneradas, caracterizadas por cuerpos de inclusión intranuclear basófilos en núcleos hipertrofiados de células ectodermales y mesodermales de los apéndices, branquias, estómago, intestino anterior y posterior, tejido conectivo, glándula antenal, órgano linfoide, tejido hematopoyético, hemolinfa, corazón y una variedad de otros tipos de células (Lightner *et al.*, 1998). Sin embargo, no se han reportado inclusiones en el epitelio del hepatopáncreas, intestino medio o ciego del intestino medio (Lightner *et al.*, 1998; Sahul *et al.*, 2000).

Otro signo histopatológico recientemente reportado para infecciones con WSSV es una necrosis general en diferentes tejidos, principalmente en el órgano linfoide (Pantoja y Lightner, 2003). Esta necrosis caracterizada por la presencia de células con picnosis y kariorrexis nuclear han conducido a crear confusiones en el diagnóstico entre WSSV y Yellow head (Pantoja y Lightner, 2003).

2.1.4. Características ultraestructurales

La replicación del WSSV toma lugar en núcleos, cromatina marginal e hipertrofia nuclear, y la morfogénesis viral comienza por la formación de membranas "de novo" en el nucleoplasma (Durand *et al.*, 1997). El agente causante de la enfermedad tiene forma de bacilo no ocluido. Las dimensiones de los viriones son de 275 nm de longitud y 83 nm de diámetro y las dimensiones de la nucleocápside son de 216 nm en longitud y 54 nm de diámetro (Takahashi *et al.*, 1994). En los núcleos infectados los viriones tienen una distribución paracristalina o desordenada. En todas las especies de cangrejos infectados, se han reportado envolturas de viriones, nucleocápsides libres y fragmentos de envolturas virales libres en la hemolinfa de animales moribundos (Corbel *et al.*, 2001).

2.2. EL SISTEMA INMUNE

La primera línea de defensa en los crustáceos es la cutícula, la cual constituye una barrera física y biológicamente activa (Sugumaran, 1996), a ella estarían asociados actividad microbicida (Destoumieux *et al.*, 2000) y actividad fenoloxidasa (Sugumaran, 1996). Un componente esencial de la inmunidad es el estado de alerta por el cual un organismo puede detectar moléculas extrañas o no propias. Un buen sistema de reconocimiento de lo "no propio debería estimular las respuestas de defensa". Los mecanismos de defensa innata están basados en componentes celulares y humorales del sistema circulatorio, lo que está interrelacionado con la detección y eliminación de patógenos extraños, microorganismos y parásitos que evidencien un peligro potencial para el hospedero (Söderhäll y Cerenius, 1992; Vargas-Albores y Yepiz-Plascencia, 2000).

En vertebrados, el sistema inmune incluye memoria adaptativa, inmunoglobulinas específicas y células especializadas, tanto como la respuesta no específica a través de

células fagocíticas y células NK (Vargas-Albores y Yepiz-Plascencia, 2000). Los crustáceos y todos los artrópodos no poseen un sistema inmunitario adaptativo basado en la especificidad y la memoria, es decir que no poseen inmunoglobulinas que reconozcan epitopes específicos. Sin embargo, son capaces de reconocer y destruir microorganismos invasores y parásitos por medio de mecanismos inmunitarios celulares y humorales que operan para mantener la integridad del organismo. El hemocele de los crustáceos tiene circulación abierta y las células sanguíneas que se encuentran en este sistema (hemocitos) son análogas a los glóbulos blancos de los vertebrados (Söderhäll y Smith, 1983; Söderhäll y Cerenius, 1992; Roch, 1999).

2.2.1. Compartimiento celular

Los hemocitos de los crustáceos han sido clasificados en base a criterios estructurales, citoquímicos, antigénicos y funcionales, reconocidos morfológicamente como hialinos, semi-granulosos y granulosos (Smith y Söderhäll, 1983; Tsing, 1987; Hose y Martin, 1989; Söderhäll y Cerenius, 1992; Rodríguez *et al.*, 1995). Estas células pueden remover partículas extrañas del hemocele de crustáceos por medio de funciones de defensa como la fagocitosis o actividades de encapsulación (Johansson y Söderhäll, 1989; Söderhäll y Cerenius 1992; Martin *et al.*, 1998).

Los mecanismos moleculares de la inmunidad celular en artrópodos han sido conocidos con el desarrollo de técnicas que sirven para aislar y mantener los diferentes tipos de células sanguíneas de crustáceos y con la purificación de varias proteínas asociadas con el sistema profenoloxidasa (pro-PO) de cangrejos de agua dulce (Johansson y Söderhäll, 1989), y otras moléculas inmunitarias como peneidinas en peneidos (Destoumieux *et al.*, 1997; Muñoz *et al.*, 2002).

2.2.2. Características de los hemocitos

Los hemocitos hialinos son células de forma ovoide de 12,4 x 7,8 μm de diámetro, libres de gránulos o con pocos gránulos y bajo el microscopio de contraste de fase no son refráctiles (Martin y Graves, 1985). El núcleo es ovoide, el citoplasma forma una fina capa alrededor de éste y se expande ligeramente hacia los polos, además presenta ribosomas libres, retículo endoplásmico liso y rugoso y no presenta aparato de Golgi (Martin y Graves, 1985). En ellos no se han observado los gránulos presentes en los hemocitos semi-granulosos y granulosos, pero si se han reportado gránulos estriados (Bachère *et al.*, 1995). En base a sus características ultraestructurales estos hemocitos han sido considerados como células jóvenes e inmaduras (Tsing, 1987; Van de Braak *et al.*, 2002a), precursoras de los otros tipos de hemocitos (Van de Braak *et al.*, 2002b).

Los hemocitos semigranulosos son células de forma ovoide, no refráctiles y al igual que los hialinos presentan una banda de microtúbulos que rodean la célula (Martin y Graves, 1985). Tienen un diámetro ligeramente más ancho y largo que los hialinos (14,8 x 8,3 μm) y son fáciles de identificar bajo el microscopio de luz por la presencia de un número variable de pequeños gránulos oscuros en el citoplasma (Martin y Graves, 1985). El citoplasma también contiene ribosomas libres, retículo endoplásmico liso y rugoso y aparato de Golgi (Martin y Graves, 1985).

Los hemocitos granulosos son células de forma ovoides a esféricas, tienen un tamaño de 13,6 x 9,5 μm al igual que los hemocitos semigranulosos, pero no se ha observado microtúbulos alrededor de la periferia de la célula (Martin y Graves, 1985). Al observarlos en el microscopio de contraste de fase se distinguen gránulos grandes altamente refráctiles que frecuentemente obscurecen el núcleo y provocan que la célula

entera aparezca brillante. El citoplasma parece reducido debido a la presencia de los gránulos que llenan toda el área. Existe la presencia de ribosomas libres y retículo endoplásmico rugoso pero no tan abundante como en los hemocitos semigranulosos, no se ha observado aparato de Golgi (Martin y Graves, 1985).

2.2.3. Defensas celulares

La fagocitosis es un proceso de respuesta inmunitaria de tipo celular que contribuye a la eliminación directa de partículas extrañas o células envejecidas del propio organismo, y constituye junto a otros componentes humorales la primera línea de defensa. Las bacterias que son partículas pequeñas pueden ser fagocitadas por hemocitos circulantes y fagocitos inmóviles (Johansson y Söderhäll, 1989). En los crustáceos, se ha reportado fagocitos fijos en la glándula antenal, órgano linfoide, superficie de las arteriolas del sinus hemal del hepatopáncreas, éstos a diferencias de los encontrados en las branquias pueden eliminar proteínas y micropartículas mayores a 30 nm (para revisión ver Johnson, 1987). Las células circulantes pueden fagocitar y ocasionar respuestas inflamatorias las cuales amplifican las reacciones inmunes, siendo empleados estos tipos de reacciones frente a invasión microbial. Tal respuesta puede ser el resultado de la reacción de enzimas intracelulares y la secreción de moléculas líticas y citotóxicas inducidas de una manera no específica (Roch, 1999). Recientemente Muñoz *et al.* (2002) han demostrado en *P. vannamei* que la fagocitosis es realizada principalmente por los hemocitos hialinos. Por otra parte diferentes autores han comprobado la generación de radicales de oxígeno (ROIs) en ensayos de fagocitosis *in vitro* realizados con hemocitos de camarón (Song and Hsieh, 1994; Muñoz *et al.*, 2000).

La encapsulación es un proceso en el cual varios hemocitos cubren la partícula extraña formando capas alrededor de ella, provocando de esta manera su muerte (Söderhäll y Cerenius, 1992). La razón no es bien conocida aún, pero se puede atribuir a una acción tóxica por medio de los quinones o por asfixia celular (Salt, 1963; Napi, 1977; Poinar *et al.*, 1979). En efecto el proceso de encapsulación está normalmente acompañado de melanización. Por otra parte Holmblad y Söderhäll (1999) sugieren la generación de radicales de oxígeno en los procesos de encapsulación. Las subpoblaciones hemocitarias involucradas en la encapsulación son los hemocitos granulados y semigranulosos (Tsing, 1987; Martin *et al.*, 1998).

2.2.4. Compartimiento humoral

En el compartimento humoral de la hemolinfa (plasma) se encuentran en circulación innumerables moléculas de diferente rol fisiológico. Para mencionar sólo algunas podemos citar a la hemocianina, inhibidores de proteasas, proteínas de reconocimiento, varias lipoproteínas, entre ellas el factor de coagulación y la proteína fijadora de β -glucanos.

La hemocianina es considerada la proteína respiratoria, ya que interviene en el transporte de oxígeno. Esta proteína constituye el 60 al 95% del total de proteína en el plasma (Djangmah, 1970). Además presenta cualidades antimicrobianas (Bachère *et al.*, 2000). Está presente durante toda la vida del crustáceo como un oligomero de uno y dos hexámeros. En algunos crustáceos decápodos esta sujeta a cambios en su composición por factores ambientales y/o fisiológicos (Terwilloger y Dumler, 2001). Recientemente se ha reportado que péptidos antimicrobianos son generados a partir de la región C-terminal de esta proteína (Destoumieux *et al.*, 2001).

Un importante proceso en los crustáceos acuáticos es la rápida coagulación en las heridas para prevenir pérdidas sustanciales de hemolinfa y evitar el ingreso de microorganismos. La reacción de cicatrización de crustáceos es extremadamente rápida y eficiente actuando como un mecanismo de defensa (Söderhäll y Cerenius, 1992). El factor de coagulación de los crustáceos es dímero de aproximadamente 400 kDa, la misma que se reticula bajo la acción de una proteína de tipo transglutaminasa liberada por los hemocitos hialinos (Martin *et al.*, 1991). Estudios recientes sobre la actividad transglutaminasa ha sido reportada en hemocitos granulados y semi-granulosos (Wang *et al.*, 2001).

En los crustáceos, proteínas de reconocimiento están asociados a funciones relacionadas al reconocimiento de lo no propio (Smith y Söderhäll, 1983). Dos tipos de proteínas de reconocimiento, proteína de fijación de lipopolisacáridos (LPS) y proteína de fijación de β -glucanos, han sido caracterizadas. Estos factores contenidos en el plasma de crustáceos son capaces de reconocer bacterias y hongos (Duvic y Söderhäll, 1990; Vargas-Albores, 1995).

El hemocele es así mismo el sitio de descarga y actividad de importantes moléculas tales como α 2-macroglobulina (Rodríguez *et al.*, 1995), aglutininas, componentes del sistema proPO, responsable de la melanización, la cual acompaña todas las reacciones inflamatorias de los crustáceos (Söderhäll y Cerenius, 1992) y péptidos antibacteriales, como las peneidinas (Destoumieux *et al.*, 1997). Las peneidinas han sido completamente caracterizadas en *P. vannamei*, ellas son activas contra bacterias Gram + y hongos (Destoumieux *et al.* 1997), en tanto que funcionarían como opsoninas de bacterias Gram – (Muñoz *et al.*, 2002).

2.2.5. El sistema inmune de los crustáceos frente a infecciones virales.

Los mecanismos de resistencia al WSSV y a otros agentes virales no están bien conocidos. Las imágenes histopatológicas de animales afectados por infecciones virales carecen de los focos inflamados, altamente melanizados muy comunes de las infecciones bacterianas Flegel and Pasharawipas, 1998. Algunos autores sugieren que en los crustáceos no existe una respuesta inmune contra los patógenos virales, soportando la teoría de la acomodación viral, según la cual los animales infectados sufren un suicidio altruista, por medio de apoptosis. (Flegel and Pasharawipas 1998). Este mecanismo evitaría la propagación del virus. Sin embargo, en varios estudios realizados en camarón infectados por virus se reportan procesos inmunitarios tales como: infiltración, fagocitosis y encapsulación en lugares afectados (Durand *et al.*, 1997; Momoyama *et al.*, 1994). Adicionalmente, Hasson *et al.* (1999a) destacan el rol importante que cumple el órgano linfoide en los mecanismos de defensa antiviral del *L. vannamei* contra el virus del síndrome de Taura. El órgano linfoide forma parte integral del sistema circulatorio (Bell y Lightner, 1988) y actuaría como filtro de partículas virales (Hasson *et al.*, 1999b). Durante las infecciones virales en el órgano linfoide se forman estructuras esféricas multicelulares sin un vaso central, llamadas esferoides (Bonami *et al.*, 1992). La formación de esferoides en el órgano linfoide se ha visto asociado por lo menos con seis diferentes infecciones virales en camarones peneidos (Hasson *et al.*, 1999b, Anggraeni y Owens, 2000), incluido el WSSV (Vidal *et al.*, 2001). Existen tres tipos de esferoides según el grado de vacuolización que han sido observados en procesos infecciosos de tipo viral: Tipo A, masa de células homogéneas que contienen pocas o ninguna célula necrótica, ligeramente basófilo; Tipo B que es una evolución del tipo A pero difiere por el incremento de las células necróticas y pocas a moderadas número de vacuolas citoplasmáticas; y Tipo C que presenta un incremento en la basofilia, conteniendo un alto

porcentaje de núcleos basófilos (\approx 33 a 50%) más pequeños que los observados en el tipo A y B, y vacuolas citoplásmicas en menor número. Según la literatura, hemocitos infiltrantes en el órgano linfoide conducirían a la formación de esferoides (Hasson *et al.*, 1999b; Anggraeni y Owens, 2000). Al respecto habría que señalar que Van de Braak *et al.* (2002b) han determinado por medio de anticuerpos la migración de hemocitos desde los tubulos del órgano linfoide a la periferia de los mismos, en animales infectados con WSSV.

Por otra parte modificaciones de la fórmula hemocitaria han sido reportados en animales infectados con WSSV. Destacándose el incremento en el porcentaje de hemocitos hialinos (Kim *et al.*, 1999), al respecto cabe señalar que Wang *et al.* (2002) han encontrado que los hemocitos hialinos son resistentes a la infección con WSSV, lo que conduciría a suponer que durante las infecciones sobreviven animales con alto contenido de hemocitos hialinos. Por otra parte Sonnelhozner *et al.* (2002) han observado proliferación y migración de hemocitos a tejidos expuestos y blancos del virus, en animales resistentes al WSSV por haber sido desafiados en condiciones de hipertermia.

Un aspecto que sin duda merece mencionarse es la aparición de células apoptóticas en animales afectados por virus (Flegel y Pashirawipas, 1998; Khanobdee *et al.*, 2002). La apoptosis parece manifestarse en diferentes tejidos incluidos los hemocitos de animales infectados por WSSV (Rojtinnakorn *et al.*, 2002). Según Granja *et al.* (2003), la expresión de los mecanismos de apoptosis sería más importante en camarones resistentes al WSSV. Finalmente cabe destacar que Pan *et al.* (2000) han reportado una amplia actividad antiviral en los tejidos de los crustáceos.

2.3. ESTRATEGIAS PARA CONTROLAR EL PROBLEMA DE LA MANCHA BLANCA

2.3.1. Selección genética

Ensayos de desafíos con WSSV realizados en familias de *L. vannamei* han mostrado diferencias significativas en supervivencia encontrándose familias con supervivencias del 15% y otras del 4% (Pérez *et al.*, 2002). La susceptibilidad al WSSV observada en las familias indica la diferencia en la respuesta al virus. Argue *et al.* (1999) reportan una heredabilidad baja, siendo ésta menor a 0.01 para resistencia de *L. vannamei* a TSV. En este caso la selección familiar es importante ya que el carácter bajo mejoramiento no puede ser medido directamente en el individuo a seleccionar (Pérez *et al.*, 2002).

2.3.2. Manejo

Con el objetivo de frenar el virus de la mancha blanca, la industria camaronera probó cualquier cosa que ofreciera la posibilidad de atenuar su impacto, adaptando medidas de bioseguridad en laboratorio y piscinas de cultivo de camarón. Alday (1999) publicó reglas de bioseguridad para laboratorios de maduración y larvas y para piscinas camaroneras recomendando desinfección de los huevos con agua estéril y yodo. En camaroneras, se recomendó sembrar animales PCR negativos para WSSV, utilizar mallas para filtrar agua en compuertas de entrada y salida y el uso de redes anti-cangrejos para evitar el ingreso del virus por medio de vectores (Alday, 1999). Otras medidas de seguridad implicaron restricciones al ingreso de animales vivos contaminados como reproductores, nauplios y postlarvas de camarón, así como al consumo de balanceado producido de la cabeza de camarón.

La dinámica de ocurrencia de patógenos en sistemas acuáticos está probablemente modulada por parámetros ambientales tales como salinidad y temperatura (Jiménez *et al.*, 2000). Así se encontró una correlación negativa entre la prevalencia del virus TSV y la temperatura en granjas de cultivo de camarón en Ecuador, sugiriendo que el clima frío podría ser un factor de riesgo que precipite la ocurrencia del virus (Jiménez *et al.*, 2000), resultados similares para WSSV han sido reportados por Bayot *et al.*, (2002). Por otra parte se han reportado supervivencias del 100 % en camarones desafiados al WSSV en condiciones de hipertermia (Vidal *et al.*, 2001; Sonnenholzner *et al.*, 2002). Se ha observado que el aumento de la temperatura incentiva la proliferación de los hemocitos favoreciendo la infiltración de éstos a los tejidos. (Sonnenholzner *et al.*, 2002) sugieren que el virus puede infectar a los camarones a cualquier temperatura y que el aumento en la supervivencia estaría relacionado por el incremento de la respuesta del camarón al virus. Otros autores también sugieren que la respuesta del sistema inmune podría ser la responsable de las diferencias en la susceptibilidad a las enfermedades de acuerdo a las estaciones o la temperatura (Jiménez *et al.*, 2000).

Según Le Moullac *et al.* (1998) en el camarón, las reacciones de resistencia a patógenos están basadas en el número de hemocitos circulantes en la hemolinfa. Los camarones con un alto número de hemocitos resisten mejor a la infección que camarones con un bajo número de hemocitos (Le Moullac *et al.*, 1998). En este sentido la inmunoestimulación se vislumbra como una alternativa para manipular la respuesta inmune del camarón antes de que estos se enfrenten a desafíos microbianos en los estanques. Los objetivos preventivos de su utilización serían, inducir un estado de alerta inmunitaria y promover la proliferación de hemocitos.

Los inmunoestimulantes son moléculas que se derivan de paredes celulares de microorganismos y que activan el sistema inmune. Estos componentes activos son fragmentos de peptidomuramil (peptidoglicanos), lipopolisacáridos (LPS), presentes en bacterias Gram + y Gram -. En la pared celular de la levadura y hongos existen principalmente β -glucanos que son moléculas de poliglucosas ligadas a través de cadenas de 1,3 y con ramificaciones de 1,6 de glucosa (Dalmo *et al.*, 1998; Le Moullac *et al.*, 1998). Le Moullac *et al.* (1998) han reportado que la respuesta inmune de los camarones es mejorada con inmunoestimulantes de origen bacteriano o levadura cualquiera que sea el método de administración, sin embargo, la ganancia no es constante ni reproducible. En *L. stylirostris* por ejemplo, estos autores reportan que el inmunoestimulante G (nombre comercial de β -glucanos) probado en Tahiti incrementó entre el 22 y 50% el número de hemocitos en algunas series de experimentos. Sin embargo esta misma sustancia en New Caledonia incrementó el número de hemocitos en un 16% en la estación caliente pero únicamente en un 8% en la estación fría y además esta estimulación no fue eficaz ya que no se incrementó la supervivencia en desafíos microbianos (Le Moullac *et al.*, 1998).

La inmunoestimulación por vía oral incorporando las sustancias inmunoestimulantes en el alimento, sería el método más práctico para los sistemas de cultivo de camarón. El glucano podría ser usado profilácticamente como un estimulante de corto plazo para el camarón. La concentración de los inmunoestimulantes es muy importante para observar el efecto protector. Sung *et al.* (1994) encontraron efectos positivos en infecciones experimentales con bacterias en *P. monodon* a concentraciones de 0,5 y 1 mg/mL de glucan, pero no fue efectivo a 0,25 y 2 mg/mL de glucan, con un efecto protector que duró hasta 18 días después de la inmersión. Otero (2001) señala 50 mg de β -1,3

glucan/kg de alimento para juveniles como la concentración adecuada para observar un efecto positivo.

Los β -glucanos están involucrados en el incremento de la actividad fagocítica de los hemocitos (Sung *et al.*, 1994; Chang *et al.*, 2000), adhesión celular y producción de anión superóxido en reproductores (Chang *et al.*, 2000). Los peptidoglucanos derivados de *Bifidobacterium thermophilum*, también mejora la actividad fagocítica de los hemocitos granulados en animales desafiados experimentalmente con WSSV, incrementando la resistencia y supervivencia de los animales al virus (Itami *et al.*, 1998). Chang *et al.* (1999) realizaron una infección con WSSV en camarones que fueron inmunoestimulados con β -1,3-glucano por 20 días y obtuvieron supervivencias del 20% y 12% en juveniles y postlarvas respectivamente, al 6^{to} día de infección a diferencia del control que llegó con supervivencia de 0% al 4^{to} día de infección.

El sistema inmune se puede también modular mediante aditivos nutricionales como vitaminas C y E, las que promueven un buen funcionamiento de las células inmunitarias demostrando un respuesta positiva sobre el sistema inmune del camarón (Molina,2002). Un efecto similar se obtuvo a dosis mínimas de vitamina pero con β -glucanos disminuyendo la tasa de mortalidad de los animales en pruebas de desafío con el WSSV (Molina, 2002).

Una forma para evaluar la eficacia de inmunoestimulantes y otras moléculas inmunomoduladoras, además de la supervivencia, sería mediante la cuantificación de parámetros inmunitarios. Estudios sobre parámetros celulares y humorales tales como generación de radicales de oxígeno, actividad fenoloxidasa, hemaaglutinación, etc

(Rodríguez *et al.*, 2000), se están realizando como indicadores de salud. El diagnóstico hemocitario podría constituir un marcador del estado fisiológico e inmunitario de los camarones (Tsing, 1987), estableciendo de esta forma un sistema de control inmune que permitirá la detección de inmunodeficiencias y control inmune que permita la detección de inmunodeficiencias y el control de la calidad ambiental (Tsing, 1987; Bachère, 2000). El hemograma consiste en el número y la proporción de diferentes tipos de hemocitos presentes en una muestra de hemolinfa provenientes de un individuo (Hose y Martin, 1989). Los cuales son realizados mediante tinciones y microscopía de contraste de fases lo que permite distinguir hemocitos granulados, hialinos y semigranulosos, siendo el último el método más práctico e informativo (Muñoz, 1996). Otra forma de estudiar los hemocitos y los mecanismos de defensa desplegados bajo desafío microbiano es mediante observaciones histológicas con la ayuda de sondas moleculares, anticuerpos o sondas nucleicas (Muñoz *et al.*, 2002, Van de Braak *et al.*, 2002,a,b).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIAL BIOLÓGICO

Las familias fueron obtenidas de 56 cruces comerciales de reproductores de origen panameño y colombiano. Los cruces fueron realizados en el laboratorio “Playaespec” (Provincia del Guayas, Ecuador).

3.2. LARVICULTURA Y PRE-CRÍA

Animales de las 56 familias en estadio nauplio II fueron aclimatados a la misma temperatura de los tanques de cultivo (32°C). La desinfección de los nauplios se realizó en recipientes (cascos) de 20 L con malla de 100 µm, donde fueron sometidos a un flujo de agua de 1 L/seg. por 5 minutos. Inmediatamente se adicionó 100 ppm de Argentine (1% de yodo activo) por 30 segundos y luego los nauplios fueron sometidos nuevamente a un flujo de agua de 1 L/seg. por 5 minutos. Una vez aclimatados y desinfectados, los nauplios fueron sembrados en tanques cónicos de 50 L de capacidad a una densidad de 100 a 300 animales/L. La larvicultura hasta PL 12, se realizó siguiendo el protocolo de manejo llevado a cabo por el laboratorio de Larvicultura de la Fundación CENAIM-ESPOL (Anexo I).

De las 56 familias cultivadas sólo 28 familias alcanzaron el número mínimo de animales requerido y fueron transferidas a tanques de 500 L de capacidad, a una densidad de 4 animales/L. La pre-cría se llevó a cabo hasta obtener juveniles de 3,8 g aproximadamente. Se mantuvo un recambio del 70% dos veces a la semana y fueron alimentados con MOLINO (35%) (Aliment S.A.).

3.3. PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN VIRAL

La solución viral fue preparada siguiendo el protocolo de la Fundación CENAIME-ESPOL. Se separaron las branquias de animales diagnosticados por histología en grado severo para WSSV. Las branquias fueron homogeneizadas en tampón TN 1X (0,02 M Tris-HCl, 0,4 M NaCl) a una relación 1:5 y centrifugadas a 1200 g por 5 min. El sobrenadante fue filtrado a 0,45 μm y almacenado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.4. PREPARACIÓN DE LA PAPILLA INFECTADA

Animales de 3 g fueron colocados en gavetas de 50 L y aclimatados por 5 días. Ellos fueron inyectados intramuscularmente con 50 μL de la solución viral en el segundo segmento abdominal. Luego de 48 hrs, los camarones moribundos fueron retirados y almacenados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta ser usados como papilla. Esta fue mantenida como máximo un mes. La severidad de la infección fue verificada por histología en animales escogidos para tal efecto.

3.5. SISTEMA EXPERIMENTAL

Se usaron salas de experimentación adecuadas para las 3 pruebas de desafíos. Las salas incluyeron un sistema de agua esterilizada con filtros UV, filtros de piola y carbón activado. El agua fue desinfectada con una solución de cloro de 100 ppm y desactivado con 25 ppm de tiosulfato de sodio (50%). El sistema de aireación incluyó piedras difusoras. La desinfección de tanques se realizó antes y después de la infección de los animales con cloro granulado. Cada unidad experimental constó de un protector plástico o tapa para evitar contaminación ambiental.

3.6. BIOENSAYO I: SELECCIÓN DE FAMILIAS

De las 28 familias cultivadas hasta PL 75, la familia F5 se utilizó para un trabajo ajeno a esta investigación, es decir que sólo 27 familias fueron desafiadas al virus. El objetivo de este bioensayo fue comprobar la existencia de resistencia al WSSV a nivel familiar, estableciendo criterios de selección familiar que garanticen una buena selección. Las familias seleccionadas como resistentes y susceptibles serían utilizadas para estudiar la respuesta inmune bajo condición de infección con WSSV en un bioensayo posterior.

3.6.1. Diseño experimental

El diseño fue completamente aleatorio con 29 tratamientos, 8 réplicas por tratamiento y 10 animales por réplica. La densidad utilizada fue de 10 animales (PL 75) en 3 litros de agua de mar, los mismos que fueron aleatoriamente distribuidos en cada unidad experimental. Los tratamientos los conformaron animales pertenecientes a 27 familias de *L. vannamei*, un control infectado y otro no infectado. Los controles estuvieron conformados por una mezcla de animales de todas las familias. Los animales fueron desafiados al WSSV durante 15 días

3.6.2. Protocolo de manejo del experimento

Los camarones se aclimataron por 8 días con un recambio diario de agua del 100% y aireación constante. Los animales fueron alimentados antes y después de la infección con Molino 55, al 10% de su peso corporal dos veces al día. El día previo a la infección los animales permanecieron en ayuno. La papilla infectada fue colocada 2 veces en el mismo día en cada unidad experimental, realizando un recambio de agua del 100% 3 horas después de cada dosis. El experimento duró 15 días. Los animales muertos fueron recogidos y registrados cada dos horas, aumentando el intervalo de tiempo según como se

desarrollaba la infección. La supervivencia fue registrada en los siguientes días: 0, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 y 15.

3.6.3. Análisis estadístico

El análisis estadístico se lo realizó al final del bioensayo (15 días después de la infección experimental). Los datos fueron sometidos a pruebas de Kolmogorov-Smirnov (normalidad) y de Levene (homogeneidad de varianzas). Los datos fueron transformados por arcoseno. La matriz de datos transformados no cumplieron con los requisitos de normalidad y homogeneidad de varianzas. Por lo que se utilizó la prueba no paramétrica Kruskal Wallis, o ANOVA por rangos.

3.7. MARCAJE DE FAMILIAS

El marcaje se realizó en las familias seleccionadas. Un total de 4500 animales fueron identificados con elastómeros de diferentes colores provenientes de 8 familias. Estos animales fueron utilizados en los bioensayos II y III. Para marcar las familias se inyectó elastómeros en el 6^{to}, 5^{to} o 4^{to} segmento abdominal a animales de 1 g. Los códigos utilizados para diferenciar familias se presentan en la Tabla 1 (colores de elastómeros).

Tabla 1. Códigos utilizados en los segmentos abdominales de los animales de cada familia

<u>Segmentos abdominales</u>			
<u>Familia</u>	<u>6^{to}</u>	<u>5^{to}</u>	<u>4^{to}</u>
F1	Rojo	Rojo	
F11	Rojo	Azul	
F10	Rojo	Amarillo	
F3	Azul	Rojo	
F22	Azul	Azul	
F23		Azul	Verde
F19		Naranja	Rojo
F12		Azul	Amarillo

3.8. BIOENSAYO II: INMUNOESTIMULACIÓN Y SEGUNDA PRUEBA DE DESAFÍO AL WSSV

De las familias que fueron seleccionadas en el primer bioensayo, se escogieron para este segundo bioensayo las familias F1, F11, F10, F22 y F19 como resistentes y las familias F23, F3, y F12 como susceptibles. El objetivo de este bioensayo fue determinar la reacción a la inmunoestimulación de las diferentes familias. La elaboración de la dieta fue efectuada en la Planta Piloto de la Fundación CENAIM-ESPOL. La dieta base fue CENAIM 35 (35% de proteína animal) a la que se agregó 150 mg/kg de un producto comercial conteniendo β -glucanos.

3.8.1. Diseño experimental

El diseño experimental fue completamente aleatorio con 16 tratamientos, 7 réplicas por tratamiento. De cada familia, 10 animales de $2,4 \pm 1,0$ g fueron distribuidos aleatoriamente en cada unidad experimental (21 tanques cónicos de 250 L de capacidad) y aclimatados por 20 días. La densidad utilizada fue de 80 animales en 200 L de agua de mar, considerando que se utilizaron 8 familias. De los 21 tanques sembrados, se escogieron aleatoriamente 7 tanques, donde las familias fueron alimentadas con dieta base más β -1,3 glucanos y 14 tanques donde las familias recibieron dieta base (CENAIM 35). Luego de 15 días de inmunoestimulación con β -1,3 glucanos, las familias fueron desafiadas al WSSV, para lo cual se escogieron 7 tanques con familias inmunoestimuladas y 7 tanques con familias no inmunoestimuladas. Adicional a estos tratamientos, a manera de establecer la eficacia de la infección se utilizó un grupo de familias como control, las cuales fueron alimentadas antes y después de la infección con dieta base CENAIM 35.

3.8.2. Protocolo de manejo del experimento

Los animales fueron alimentados antes y después de la infección al 8 % de su peso corporal en dos dosis diarias en horarios establecidos como los de más alto porcentaje de ingestión (14 h00 y 20 h00) (C. Molina, comunicación personal, Fundación CENAIME-ESPOL, Guayaquil, Ecuador). El día previo a la infección los animales permanecieron en ayuno por 24 hrs para luego ser alimentados con la papilla infectada (8% del peso corporal). Se realizó un recambio diario del 100%. Se monitoreo la mortalidad cada dos horas o más de acuerdo al tiempo transcurrido de post-infección.

3.8.3. Análisis estadístico

La supervivencia se analizó con la prueba no paramétrica Kaplan Meier (KM). En este análisis se dispone de las siguientes variables: 1) Tiempo: horas post-infección, 2) Estatus: 0 = censurado (vivos al final del bioensayo) y 1 = muerto, 3) Inmunoestimulación y 4) Familias (F1, F11, F10, F22, F23, F3, F19 y F12). Para establecer diferencias significativas de curvas de supervivencias se utilizó la prueba de contraste log-rank. La hipótesis nula es la de no observar diferencia entre las dos curvas para cada una de las familias con y sin β ,1-3 glucanos.

3.9. BIOENSAYO III: PRUEBA DE DESAFÍO – EVOLUCIÓN DE LA INFECCIÓN

Se realizó este bioensayo con el objetivo de observar cómo evoluciona la infección y la respuesta inmune frente al agente patógeno en familias susceptibles y resistentes al WSSV. Es decir determinar si el factor familia y el tiempo de exposición al virus tienen algún efecto en la proporción y número de hemocitos en circulación (granulosos, semigranulosos, hialinos, atípicos), concentración de proteínas plasmáticas y

comportamiento migratorio de los hemocitos en los tejidos. Las familias probadas en este bioensayo fueron: F11, F1 y F22 (resistentes) y F23, F3 y F12 (susceptibles).

3.9.1. Diseño experimental

El diseño experimental fue completamente aleatorio con 24 tratamientos, 4 replicas por tratamiento. Un total de 16 tanques de 250 L de capacidad, fueron distribuidos aleatoriamente en la sala de bioensayos. De cada familia, 5 animales ($3,4 \pm 0,8$ g) fueron distribuidos aleatoriamente en cada unidad experimental y aclimatados durante 8 días. La densidad sembrada fue de 30 animales en 200 L de agua de mar, considerando que se utilizaron 6 familias de *L. vannamei*. De un total de 16 tanques, 12 fueron desafiados con WSSV y 4 sirvieron de tiempo 0 (no infectados). Se escogieron aleatoriamente 4 tanques para los diferentes tiempos de muestreos: 0 hrs (antes de la infección), 24 hrs, 48 hrs y 72 hrs después de la infección experimental. En cada tiempo, se muestreo a todos los individuos pertenecientes a las 6 familias de las cuatro replicas.

3.9.2. Protocolo de manejo del experimento

Los animales fueron alimentados con el 8% de su peso corporal con dieta CENAIM 35 antes y después de la infección. El día previo a la infección los animales permanecieron en ayuno. Los camarones fueron alimentados con papilla infectada 2 veces en el mismo día con el 8% de su peso corporal. La papilla infectada fue colocada en cada unidad experimental, realizando un recambio del 100% 3 horas después de cada dosis. Los animales muertos fueron monitoreados y recogidos cada dos horas o más de acuerdo al tiempo transcurrido de post-infección.

El muestreo consistió en cosechar cuatro tanques (réplicas) de cada tiempo y extraer la hemolinfa de los animales vivos. Los animales fueron posteriormente fijados en solución Davidson para los análisis histológicos.

3.9.3. Análisis estadístico

Los datos fueron analizados mediante un modelo de dos factores (familia y tiempo de infección). El factor familia (F1, F11, F22, F23, F3, F12) se encuentra bajo las mismas condiciones (tanques-bloques) y cuyos individuos fueron medidos en diferentes tiempos de infección (días 0, 1, 2 y 3). Para esto los datos fueron sometidos a la prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov y de homogeneidad de varianzas con la prueba de Bartlett. Los datos que no presentaron homogeneidad en sus varianzas fueron transformados a $\text{Log}(y)$ y arcoseno (número y porcentaje respectivamente).

El procedimiento de análisis del modelo fue el siguiente:

1. Se observó interacciones: si son significativas se analizó los efectos simples, y si no son significativas se analizó los efectos principales.
2. Los efectos simples fueron analizados de la siguiente manera. El efecto simple de B (tiempo de post-infección) para cada nivel de A (familia), es decir la cantidad de cambio en la respuesta esperada cuando el nivel de B (periodos de tiempo de infección: 0, 24, 48 y 72 hrs) fue cambiado y el nivel de A (familia) fue mantenido fijo. Los datos fueron graficados según los efectos (cambios) de los tiempos de post-infección sobre el comportamiento hemocitarios en cada familia.
3. Cuando los efectos principales fueron significativos se realizó una comparación de medias por el método de Duncan.

Además se realizó un análisis de varianza de una vía con los datos en los tiempos 0 hrs (antes de la infección) y 24 hrs (después de la infección).

3.10. TÉCNICAS UTILIZADAS

3.10.1. Pruebas inmunitarias: Hemogramas y Proteínas Plasmáticas

Las pruebas inmunitarias como hemogramas y concentración de proteínas plasmáticas fueron utilizados únicamente en el bioensayo III. Las muestras de hemolinfa fueron tomadas del sinus ventral de cada camarón. Se utilizó jeringuillas de 1 mL (Insulin Syringe 26 G 1/2) cargadas previamente con 50 μ L de anticoagulante (citrato de sodio al 10%). Las muestras individuales de hemolinfa fueron colocadas en microtubos (eppendorf) y 15 μ L de cada muestra fueron fijados (V/V) con formol al 3% y mantenidos a temperatura ambiente hasta la realización de los hemogramas.

El hemograma fue realizado siguiendo el método descrito por Muñoz (1996), e involucró el número total de hemocitos y la fórmula hemocitaria: % hemocitos hialinos (H), % hemocitos semigranulosos (SG), % hemocitos granulosos (G) y % hemocitos atípicos (A).

La hemolinfa restante fue centrifugada a 800 g por 5 min. y el sobrenadante (plasma) colocado en microtubos (eppendorf) y almacenado a -80 °C. Las muestras de plasma fueron utilizadas para la cuantificación de proteínas plasmáticas por el método de Lowry *et al.* (1951).

3.10.2 Histopatología

Los mismos animales que se utilizaron para las pruebas inmunitarias antes descritas, fueron fijados en solución de Davidson para el análisis de histopatología siguiendo el protocolo descrito por Bell y Lightner (1988). Un total de 141 animales fueron analizados para describir y diagnosticar (patologías y respuestas inmunitarias) a nivel histológico. Este análisis fue de tipo descriptivo. Pero con el propósito de cuantificarlo se elaboró un índice para cada una de las variables a medirse. El análisis estadístico no se efectuó, porque los índices no están validados o comprobados que no existan correlaciones entre las diversas variables a medirse.

3.10.2.1. Elaboración de grados: WSSV, P-K, encapsulación, infiltración y presencia de esferoides en el órgano linfoide

- Los grados de infección para WSSV fueron determinados según el número de células infectadas al recorrer 5 campos, de la siguiente manera: Grado 1 (0-3 células infectadas); Grado 2 (4-20 células infectadas); Grado 3 (21-60 células infectadas) y Grado 4 (61-100 células infectadas).
- Los grados establecidos para P.K. (piknosis y kariorexis) se determinaron por la presencia de grupos de células con piknosis-kariorexis: Grado 1 (0-3 células con PK); Grado 2 (3-5 células con PK); Grado 3 (6-8 células con PK) y Grado 4 (>8 células con PK).
- Los grados establecidos para la encapsulación fueron elaborados sobre la base de la presencia de cápsulas en los tejidos infectados de la siguiente manera: Grado 1 (0-3 cápsulas); Grado 2 (3-5 cápsulas); Grado 3 (6-8 cápsulas) y Grado 4 (>8 cápsulas).
- Los grados establecidos para la infiltración y formación de esferoides fueron elaborados sobre la base del porcentaje en que estos procesos comprometieron los

tejidos en los que fueron observados. Grado 1 (<25% del tejido comprometido); Grado 2 (25-50% del tejido comprometido); Grado3 (50-75% del tejido comprometido) y Grado 4 (>75% del tejido comprometido).

3.10.2.2. Elaboración de índices histológicos-patológicos y de respuesta inmunitaria

Con las observaciones histológicas se elaboraron 5 índices: 2 índices patológicos (índice de WSSV e índice de Piknosis-Karriorexis) y 3 índices de respuesta inmunitaria (índice de infiltración hemocitaria, índice de encapsulación e índice de esferoides).

- Índice de WSSV

El índice de WSSV se construyó a partir del número de tejidos afectados y el grado de lesiones atribuidos al WSSV, de cada uno de los cinco camarones muestreados en cada réplica. A ciertos órganos se les asignó un peso en base a la importancia del tejido en el proceso de infección viral (Tabla 2). De esta manera una lesión en el órgano linfoide implicó un proceso infeccioso más avanzado que si esta lesión estuviera en el epitelio cuticular. Los grados de infección encontrados en cada órgano fueron a su vez catalogados en una escala de 0 a 4. El grado 4 representó una lesión más avanzada. La Tabla 3 muestra un ejemplo de la forma como se obtuvo el índice histológico para WSSV si existiera en los tejidos un grado 4 de infección.

Tabla 2. Descripción del peso de los tejidos en el índice de infección por WSSV.

Tejidos	Peso
Glándula Antenal y Epitelio Cuticular	1
Estómago y Tejido Conectivo	2
Organo Linfoide, Tejido Hematopoyético y Corazón	3

Tabla 3. Ejemplo de la forma cómo se obtuvo el índice histológico para WSSV

Tejido	Grado	Normalización	Peso	Norm * Peso	Total
Glándula antenal	4	4/4=1	1	1 x 1	1
Tejido conectivo	4	4/4=1	2	1 x 2	2
Organo linfoide	4	4/4=1	3	1 x 3	3
Suma					6

- Índice para Piknosis-Karriorexis

Se elaboró también un índice histológico para Piknosis-Karriorexis, sin dar un peso a los tejidos, como se describió en el índice de WSSV. Es decir por ejemplo un grado 4 (escala de 0 a 4) encontrado en cualquier tejido sería dividido para 4, de esta manera la escala va de 0 a 1.

- Índice inmunitario: infiltración, encapsulación y formación de esferoides

El siguiente índice se elaboró para comparar la respuesta inmune a nivel histológico y las variables analizadas fueron infiltración, encapsulación y formación de esferoides en el órgano linfoide. Para la elaboración del índice de infiltración tampoco se dio peso a los tejidos. Es decir, por ejemplo un grado 4 (escala de 0 a 4) encontrado en cualquier tejido sería dividido para 4, de esta manera la escala va de 0 a 1. De la misma manera se elaboró el índice de encapsulación. Se realizó además un índice para esferoides basado en los grados de vacualización y tipos de esferoides (A, B y C) descrito por Hasson *et al* (1999a). Para esto se otorgó un peso según el tipo de esferoide, de la siguiente manera: Tipo A = 1; Tipo B = 2; y Tipo C = 3. Los grados de infección fueron divididos para 4. Este resultado fue multiplicado por el peso de cada tipo de esferoide (Tabla 4). El tipo de esferoides encontrado en el órgano linfoide en mayor grado fue el que predominó para la realización de este índice. Al final se obtuvieron promedios de los 5 camarones analizados por cada réplica.

Tabla 4. Ejemplo de la elaboración del índice histológico para la presencia de esferoides en el órgano linfoide.

Grado	Normalización	Tipo	Peso	Norm * Peso	Total
4	$4/4=1$	A	1	1 x 1	1
4	$4/4=1$	B	2	1 x 2	2
4	$4/4=1$	C	3	1 x 3	3

4. RESULTADOS

4.1. BIOENSAYO I: SELECCIÓN DE FAMILIAS

El primer paso consistió en comprobar la existencia de resistencia al WSSV a nivel familiar, para lo cual 27 familias en estadio PL 75 fueron desafiadas experimentalmente con el virus durante 360 hrs (15 días). A los 15 días la máxima supervivencia observada fue del 24%, a diferencia del 63% de las familias estudiadas que presentaron una mortalidad del 100% al final del mismo periodo. Es decir que 17 familias presentaron 0% de supervivencia. Las mismas que fueron consideradas altamente susceptibles: F2, F3, F4, F6, F9, F12, F13, F14, F15, F16, F17, F18, F21, F23, F25, F27 y F28. La Figura 1 muestra el comportamiento de la supervivencia de las familias durante los 15 días.

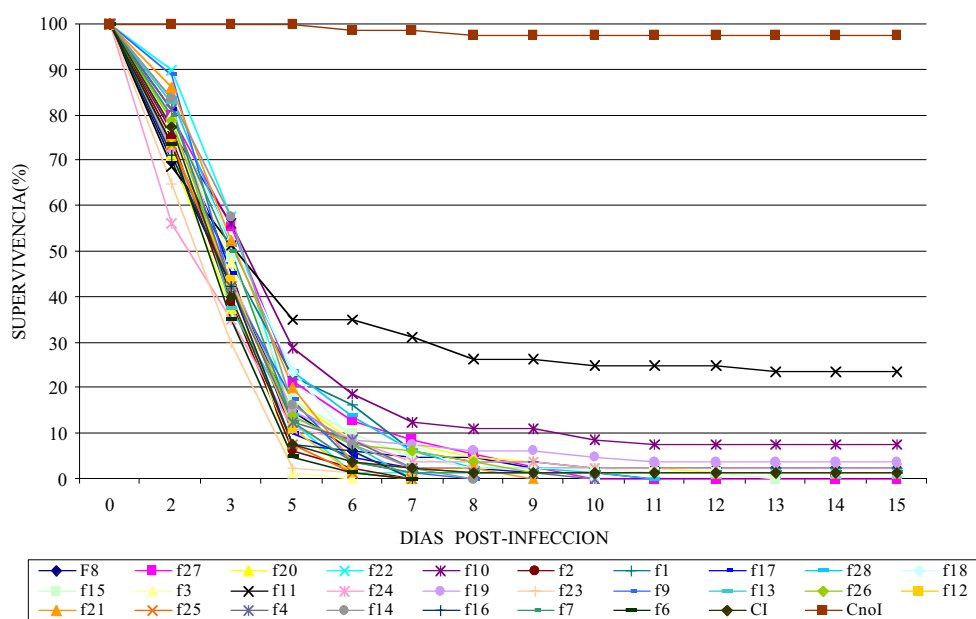


Figura 1: Curvas de supervivencia de familias de *Litopenaeus vannamei* en estadio PL75 infectadas experimentalmente. Se incluye un control infectado (CI) y un control no infectado (CnoI).

La selección de familias de *L. vannamei* resistentes al WSSV se realizó únicamente entre las familias supervivientes al final del experimento. La supervivencia de las familias a

los 15 días de infección estuvo entre el 1 y 24%. Los datos de las familias supervivientes (Anexo II) no presentaron homogeneidad de varianzas (Levene, $p= 0.000$) por tal motivo los datos fueron procesados mediante la prueba no paramétrica Kruskal Wallis. El resultado de esta prueba demostró que no existió diferencias significativas entre las familias supervivientes (F1, F7, F8, F10, F11, F19, F20, F22, F24 y F26) (Tabla 5), por lo que se consideró resistentes a las familias supervivientes.

Tabla 5. Prueba no paramétrica Kruskal Wallis para la supervivencia de familias luego de 15 días de infección

Kruskall Wallis- Anova por rangos		
Variable independiente: Familia		
H (N = 80) = 12.972 chi (9,0.05) 16,919; p = 0.1639		
Familia	N	Suma de rangos
F11	8	475
F10	8	339
F19	8	334
F24	8	328
F8	8	298
F1	8	298
F20	8	292
F22	8	292
F26	8	292
F7	8	292

4.2. BIOENSAYO II: INMUNOESTIMULACIÓN Y SEGUNDA PRUEBA DE DESAFIO AL WSSV

El objetivo de este ensayo fue determinar la reacción de las familias del *L. vannamei* a la inmunoestimulación con β -1,3 glucanos. De las familias seleccionadas en el bioensayo I fueron utilizadas las siguientes familias para este bioensayo: F1, F10, F11, F19 y F22 (resistentes) y F3, F12, F23, (susceptibles). Para determinar el efecto de los β -1,3

glucanos en las familias se utilizó un estudio longitudinal para observar el comportamiento de las familias desde el tiempo que ocurrió la infección hasta su muerte.

Los resultados de las curvas de supervivencia analizadas por la prueba de Kaplan Meier se presentan en las Tablas 6 y 7. En la Tabla 6 se presentan las familias del grupo control que no fueron infectadas ni inmunoestimuladas, las cuales no presentaron diferencias significativas en las curvas de supervivencias durante el tiempo de estudio. (estadístico log-rank; $p=0,2246$). En la Tabla 7 se presenta el análisis de las curvas de supervivencia para observar el efecto de la inmunoestimulación. La familia F11 fue la única que presentó una respuesta positiva a la inmunoestimulación bajo condiciones de infección.

Tabla 6: Datos de supervivencia y esperanza de vida en familias de *Litopenaeus vannamei* no infectadas (control). Los animales no recibieron β -1,3 glucanos.

Familia	% Supervivencia	Esperanza de vida
F12	100	192
F1	100	192
F3	99	191
F23	99	191
F19	99	191
F10	99	191
F11	97	188
F22	94	187

En la familia F11 la supervivencia al final de la prueba de desafío fue del 17 %, en animales que recibieron en su dieta β -1,3 glucanos, a diferencia del 9 % en animales que sólo recibieron la dieta base. La esperanza de vida de la familia F11 inmunoestimulada fue del 106 hrs, a diferencia de 88 hrs cuando no lo fue. Las curvas de supervivencias de la familia F11 inmunoestimulada y no inmunoestimulada se presentan en la Figura 2. Esta misma familia resistente F11 presentó el 9 % de supervivencia luego de 8 días de infección a diferencia del 24 % de supervivencia alcanzado a los 15 días de infección en

el primer bioensayo, demostrando una mayor mortalidad a los 8 días post-infección en el segundo bioensayo.

Tabla 7: Análisis de las curvas de supervivencias de Kaplan Meier en familias de *Litopenaeus vannamei* inmunoestimuladas y no inmunoestimuladas, bajo condiciones de infección durante 8 días (192 horas).

Familia	% de Supervivencia		Curvas de Supervivencia	Esperanza de Vida	
	Con Beta	Sin Beta	p	Con Beta	Sin Beta
F11	17	9	0.0361 ^a	106	88
F1	6	7	0.7139	77	80
F10	1	1	0.9373	70	70
F22	1	1	0.1309	85	75
F19	0	0	0.996	69	67
F3	1	0	0.2979	69	76
F23	1	0	0.1967	68	62
F12	0	1	0.8534	63	65

^aDiferencia significativa en la misma fila ($p < 0,05$).

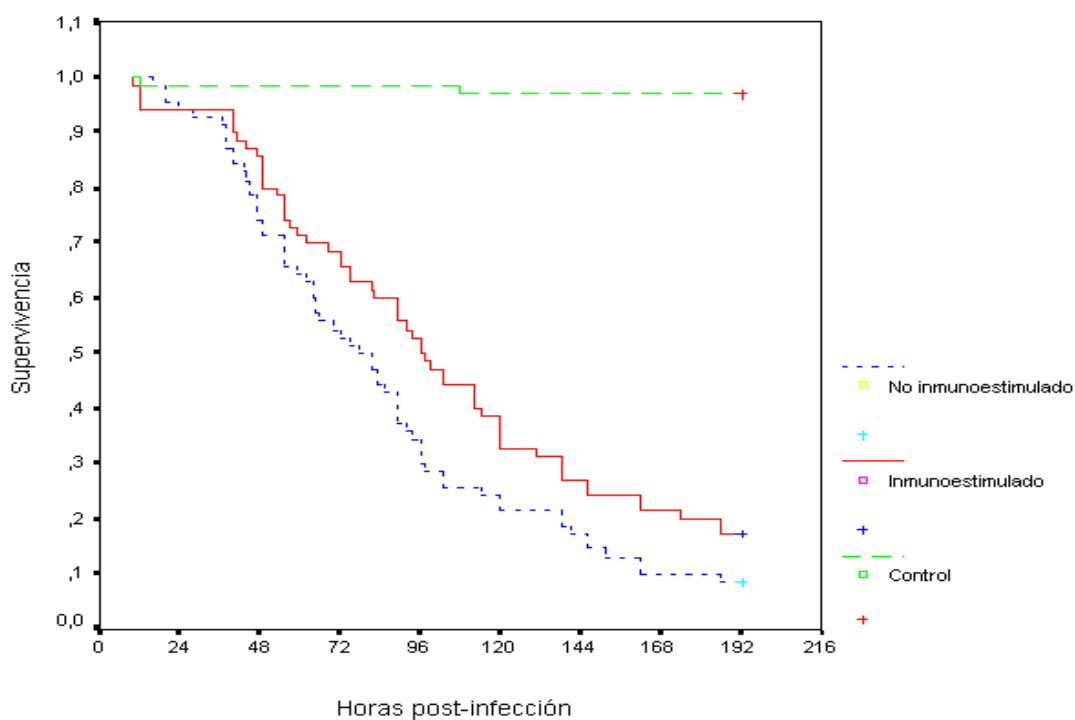


Figura. 2: Curva de supervivencia de la familia F11 desafiada con WSSV durante 192 horas, previamente inmunoestimulada y no inmunoestimulada.

4.3. BIOENSAYO III: PRUEBA DE DESAFIO - EVOLUCIÓN DE LA INFECCIÓN

Este bioensayo estuvo enfocado a comprobar si las supervivencias de familias se debió a una respuesta de tipo inmunitario. Por esta razón se consideraron importante los primeros 3 días para evaluar el comportamiento hemocitario circulante e infiltrante, así como la evolución histopatológica del WSSV en los tejidos blancos. Las familias escogidas para este bioensayo fueron: F1, F11, F22 (resistentes) y F3, F12 y F23 (susceptibles). Las familias fueron sometidas a una prueba de desafío con WSSV y muestreadas durante los primeros tres días de post-infección. En el Anexo III se muestra la supervivencia de estas familias durante el periodo de muestreo. Se tomaron muestras de hemolinfa para pruebas inmunitarias y se fijaron tejidos para observaciones histológicas.

4.3.1. Histopatología

El análisis histológico se realizó únicamente en las familias F1 (resistente) y F12 (susceptible). Las horas escogidas para los muestreos fueron 0, 24, 48 y 72 hrs, evaluándose las siguientes variables: presencia de células infectadas con WSSV y piknosis-karriorexis (índices histológicos), infiltración, encapsulación y presencia de esferoides (índices inmunitarios).

- Índice histológico WSSV

El análisis histológico de animales desafiados con WSSV mostró a las 24 hrs presencia de células infectadas en los siguientes tejidos: corazón, órgano linfoide, tejido conectivo, epitelio del estómago, tejido hematopoyético, glándula antenal y epitelio general del cuerpo. El órgano que se infectó en el mayor número de animales a las 24 hrs y a las 72 hrs fue el corazón (ver Anexo IV). Otros tejidos donde se observaron células infectadas fueron órgano mandibular, apéndices y branquias.

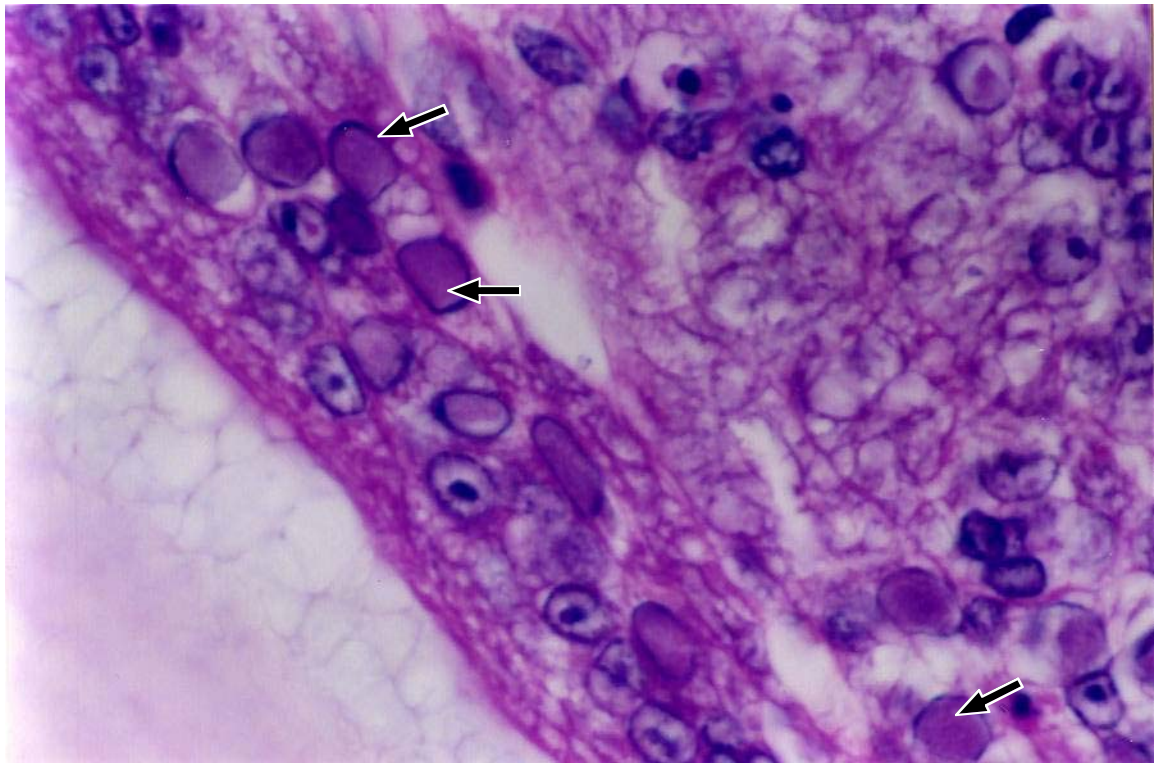


Figura 3: Microfotografía de corte histológico de juvenil de *Litopenaeus vannamei* desafiado con el virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV). Presencia de células infectadas con WSSV en el epitelio del estómago después de 48 horas de infección (flechas) (H & E, 1000 X).

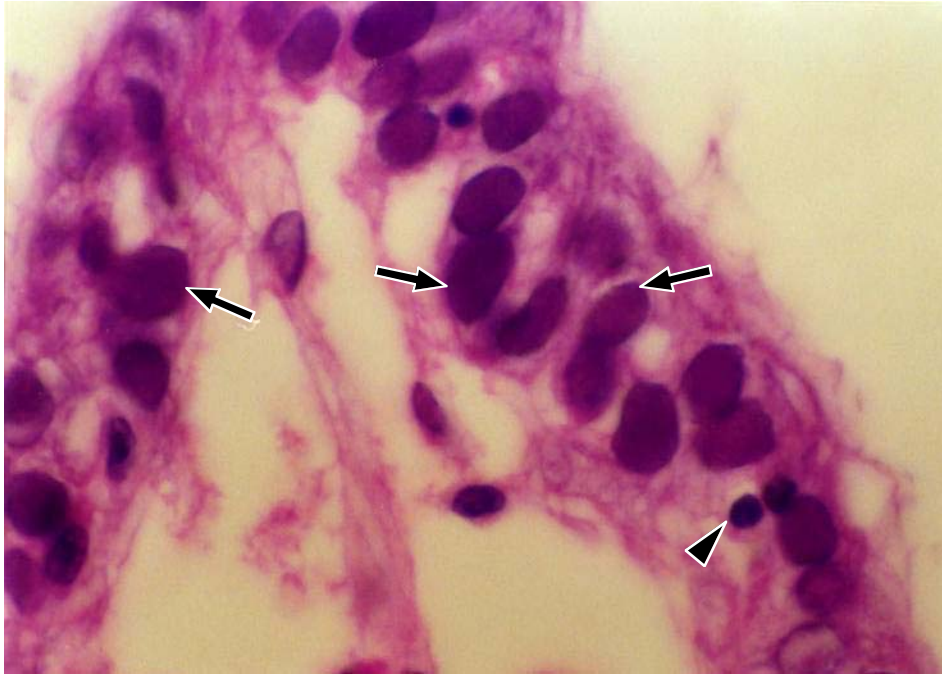


Figura 4: Microfotografía de corte histológico de un juvenil de *Litopenaeus vannamei* desafiado con el virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV). Presencia de células infectadas con WSSV en el epitelio del estómago después de 72 horas de infección (flechas). Note núcleos hipertrofiados y basófilos con una deformación general de la morfología nuclear al transcurrir 72 horas de infección. Además se observa una degeneración de las células columnares del epitelio junto con la presencia de piknosis (cabeza de flecha) (H & E, 1000 X).

Las Figuras 3 y 4 muestran la presencia de células infectadas con WSSV a las 48 hrs y 72 hrs post-infección en el epitelio cuticular del estómago, observándose una degeneración de las células columnares junto con la presencia de piknosis. Al inicio del estudio las familias F1 y F12 presentaron valores similares del índice WSSV (0,283 y 0,275 respectivamente). En la familia F1 el índice WSSV se incrementó de forma constante hasta el final del estudio, alcanzándose un valor de 2,635 (9 veces el valor inicial). Mientras que en la familia F12 ese incremento se produjo hasta las 48 horas (2,207) para luego decrecer hasta 1,888, lo que supuso un aumento de 7 veces sobre el valor inicial (las tablas con los valores medios de los índices calculados se ofrecen en el Anexo V).

Los supervivientes de ambas familias presentaron una gran variabilidad en el grado de infección a las 48 hrs y 72 hrs (Figura 5).

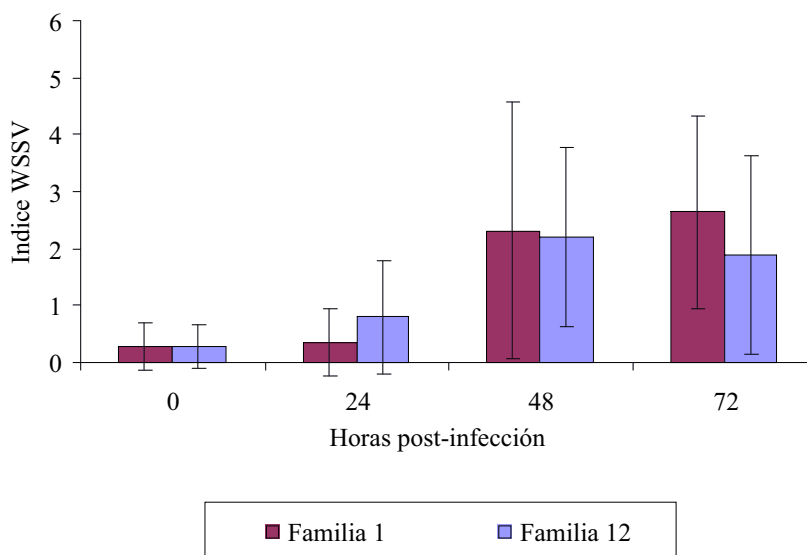


Figura 5. Índice histológico WSSV de las familias F1 y F12 luego de ser infectadas experimentalmente. Cada punto es promedio de un máximo de 20 camarones

- Índice histológico piknosis y kariorrexis

En el día 0 se observó piknosis y kariorrexis en los tejidos de los animales de las familias F1 y F12 con valores de 0,034 y 0,077 respectivamente (Figura 6). La piknosis y kariorrexis se detectó en el órgano linfóide, tejido conectivo del estómago, corazón, glándula antenal, tejido hematopoyético, epitelio del estómago y ceca del estómago. (Figuras 7 y 8). Se observó que en la familia F1 el índice PK aumentó de forma constante entre los supervivientes de cada día de estudio, mientras que en la familia F12 se observó una disminución a las 24 hrs para luego seguir aumentando el valor de dicho índice. Como en el caso del índice WSSV a las 48 hrs y 72 hrs se observó una gran variabilidad en los valores de los individuos supervivientes (Figura 6).

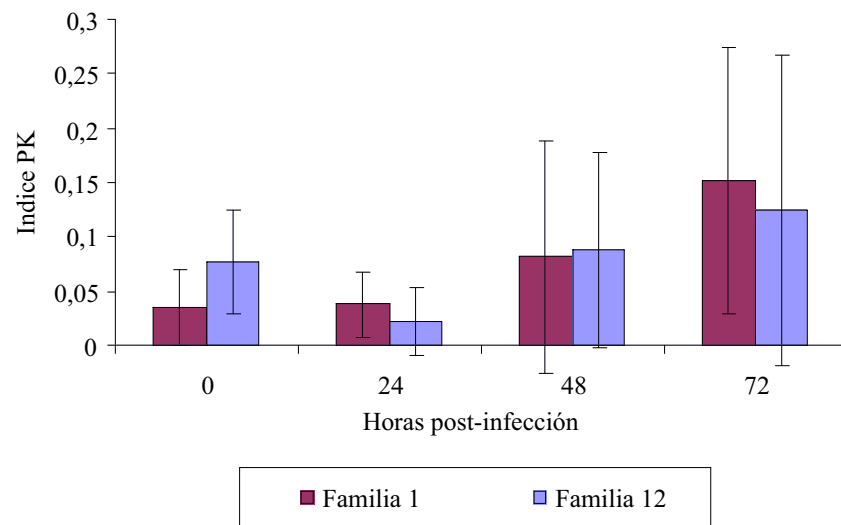


Figura 6. Índice histológico PK de las familias F1 y F12 luego de ser infectadas experimentalmente. Cada punto es promedio de un máximo de 20 camarones

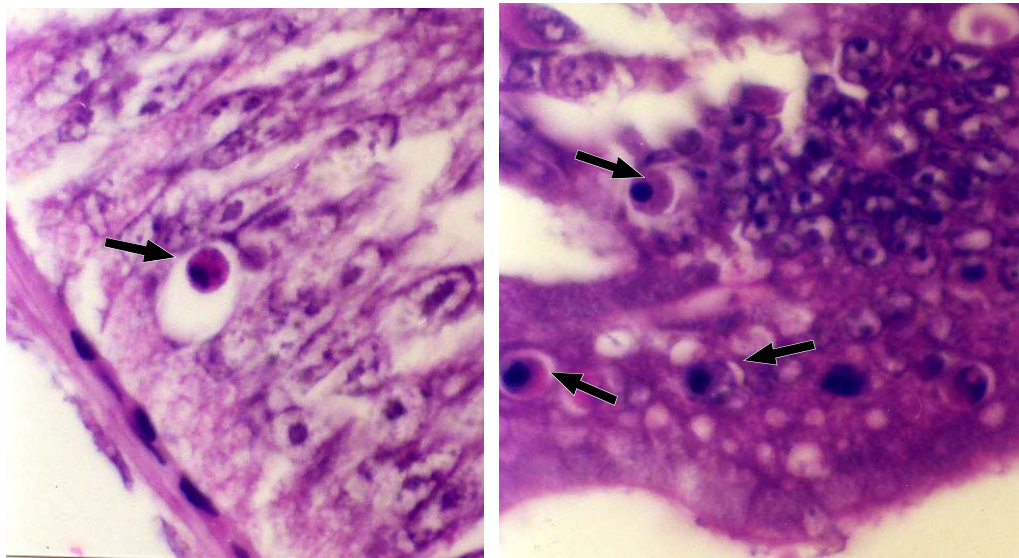


Figura 7. Microfotografías de cortes histológicos de juveniles de *Litopenaeus vannamei* desafiados con el virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV). Núcleos picnóticos en la ceca anterior del estómago 48 horas post-infección (flechas) (H & E, 1000 X). Note la degeneración de la estructura normal del tejido y la formación de núcleos picnóticos en la ceca anterior con células que se distinguen bien separadas del tejido circundante.

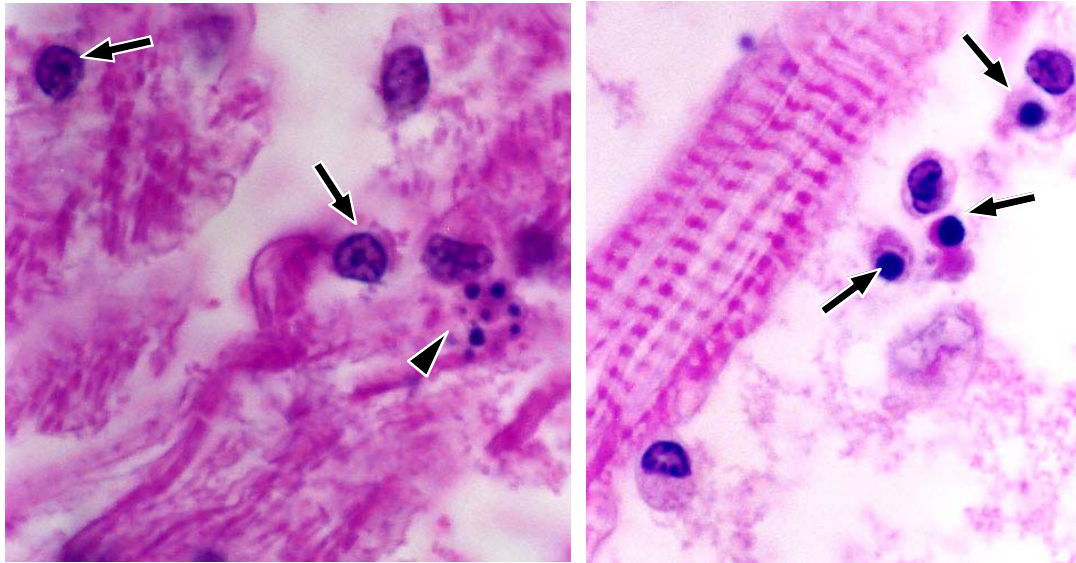


Figura 8: Microfotografías de cortes histológicos de juveniles de *Litopenaeus vannamei* desafiados con el virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV) en el corazón. Izquierda: antes de la infección presencia de núcleos hipertrofiados (flechas) y kariorrexis (punta de flecha). Derecha: 48 horas post-infección, piknosis (flechas). Estos núcleos picnóticos son más basófilos que los de la ceca anterior (H & E, 1000 X).

4.3.2. Comportamiento hemocitario en los tejidos

- Índice inmunitario de infiltración:

Aparentemente el índice de infiltración en la familia F1 (resistente) fue superior al de la familia F12 (susceptible) durante todo el estudio, esta circunstancia se observó de forma más clara tras la infección y especialmente a las 24 hrs post-infección donde alcanza un valor 5,089 veces superior (Figura 9).

Este proceso fue observado en la familia F1 especialmente en los tejidos linfoide, tejido conectivo del estómago, hepatopáncreas y glándula antenal. El tejido hematopoyético y el epitelio general del cuerpo no presentaron infiltración hemocítica. En la familia F12 este proceso fue observado en los tejidos linfoide, hepatopáncreas, hematopoyético, tejido

conectivo del estómago y corazón. La Figura 10 muestra la infiltración hemocítica observada en el tejido conectivo del estómago.

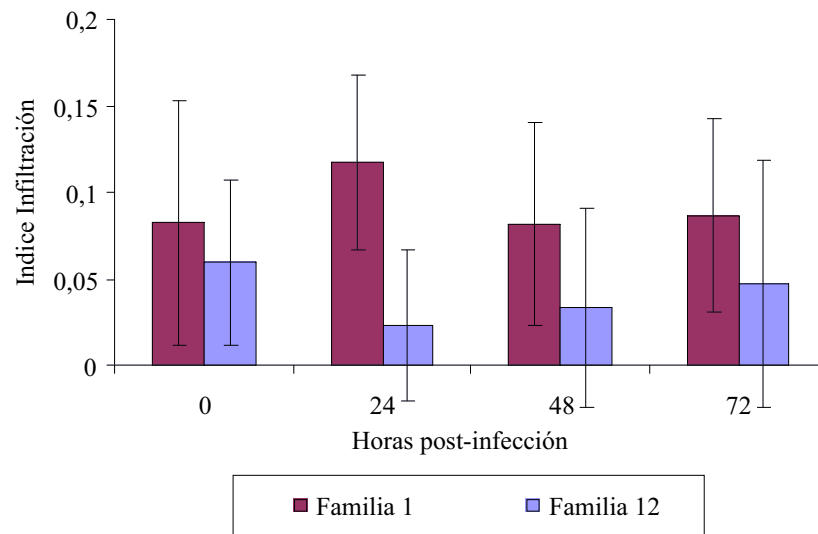


Figura 9: Índice inmunitario de infiltración de las familias F1 y F12 luego de ser infectadas experimentalmente. Cada punto es promedio de un máximo de 20 camarones.

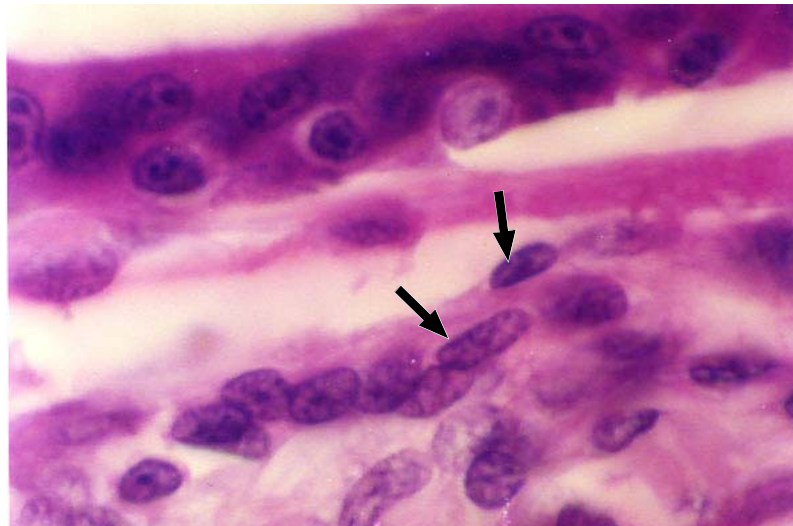


Figura 10: Microfotografía de corte histológico de juveniles de *Litopenaeus vannamei* desafiado con el virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV). Nótese la presencia de hemocitos infiltrantes en el tejido conectivo del estómago de la familia F1 (flechas) (H & E, 1000 X).

- Índice inmunitario de encapsulación

En las primeras 48 hrs del estudio el nivel del índice de encapsulación se mantuvo por debajo de 0,05 en ambas familias. Los supervivientes a las 72 hrs post-infección mostraron un aumento de la encapsulación con gran variabilidad en la respuesta según los individuos, especialmente en los pertenecientes a la familia F1 (Figura 11).

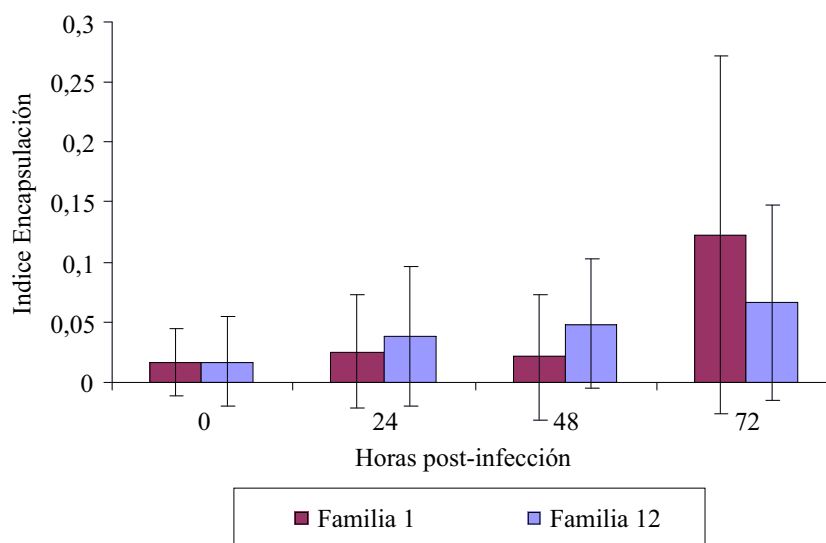


Figura 11: Índice inmunitario de encapsulación de las familias F1 y F12 luego de ser infectadas experimentalmente. Cada punto es promedio de un máximo de 20 camarones.

En la familia F1 (resistente), la encapsulación fue muy evidente en tejidos como hepatopáncreas, glándula antenal, tejido conectivo del estómago, epitelio general del cuerpo, corazón, epitelio del estómago, tejido hematopoyético y órgano linfoide. Las cápsulas se formaron alrededor de células con núcleos picnóticos y no estuvieron melanizadas. La Figura 12 muestra encapsulaciones en el órgano linfoide (entre los túbulos) y en el tejido conectivo del estómago a las 72 hrs post-infección. La familia F12 (susceptible) no mostró evidencia de encapsulación en el órgano linfoide, sólo en los

tejidos conectivo del estómago, epitelio cuticular general, corazón, epitelio del estómago y hepatopáncreas.

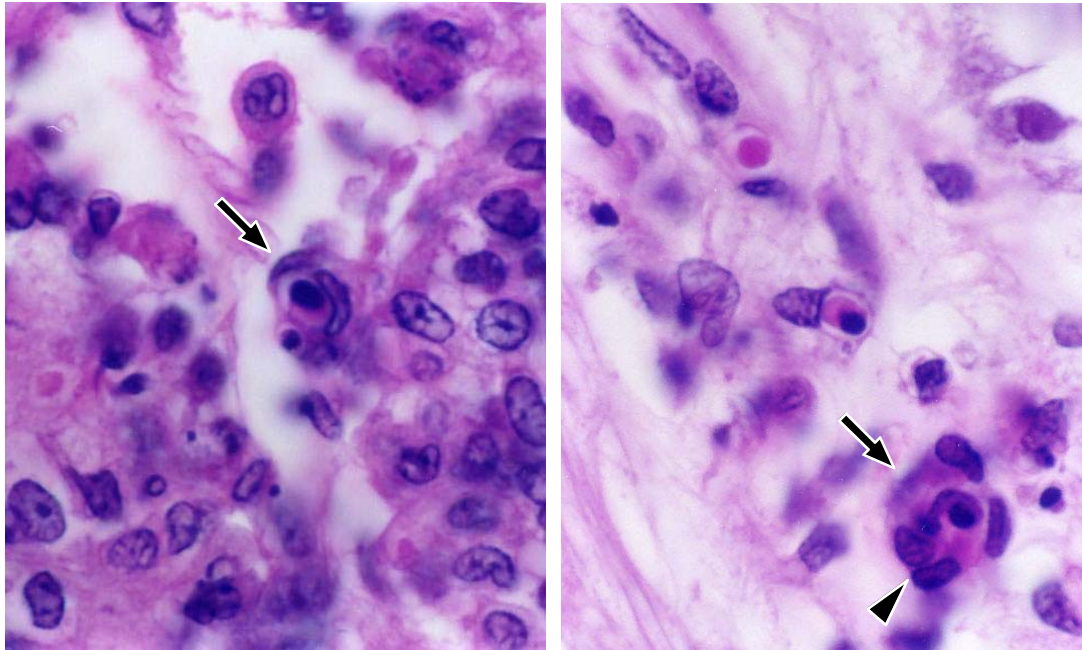


Figura 12: Microfotografías de cortes histológicos de juveniles de *Litopenaeus vannamei* desafiados con el virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV). Derecha: encapsulaciones en el órgano linfoide (entre los túbulos) (flecha). Izquierda: tejido conectivo del estómago a las 72 horas post-infección (flecha). Nótese como los hemocitos rodean a una célula afectada (punta de flecha) (H & E, 1000 X).

- Índice inmunitario de esferoides en el órgano linfoide

El análisis histológico mostró la presencia de esferoides en el órgano linfoide de las familias F1 y F12. Según la clasificación realizada por Hasson *et al.* (1999a) se identificaron tres morfotipos de esferoides dentro del órgano linfoide: Tipo A, Tipo B y Tipo C. Los esferoides se presentaron bien delineados o como una masa de células hipertrofiadas de forma esférica a irregular. Se observó distintos grados de vacuolización y células necróticas. Se detectaron además células con núcleos picnóticos, kariorrexis y

cromatina marginada. Esto fue observado en mayor grado en los animales supervivientes a las 72 hrs de post-infección (Figura 13).

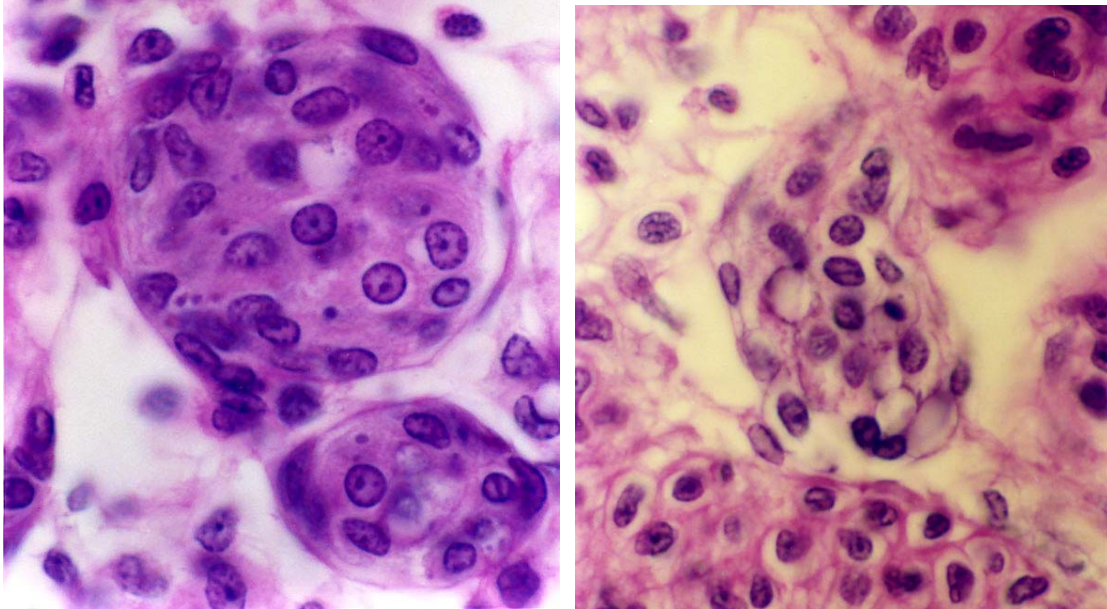


Figura 13: Microfotografías de cortes histológicos de juveniles de *Litopenaeus vannamei* desafiados con el virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV). Nótese la presencia de esferoides en el órgano linfoide (izquierda) tipo A y (derecha) tipo B (H & E, 1000 X).

Los esferoides de tipo A y B fueron encontrados tanto en animales infectados experimentalmente como en los no infectados. En ocasiones, diferentes morfotipos fueron encontrados en el mismo tejido y tiempo de infección pero en distinto grado.

La Figura 14 muestra el índice histológico de los esferoides siguiendo el curso de la infección. Este índice aumentó considerablemente en la familia F1 (resistente) mientras que la familia F12 (susceptible) apenas registró variaciones en las primeras 72 hrs post-infección. Se observó que a las 48 hrs y 72 hrs los supervivientes de la familia F1 presentaron una gran variabilidad en los valores de este índice.

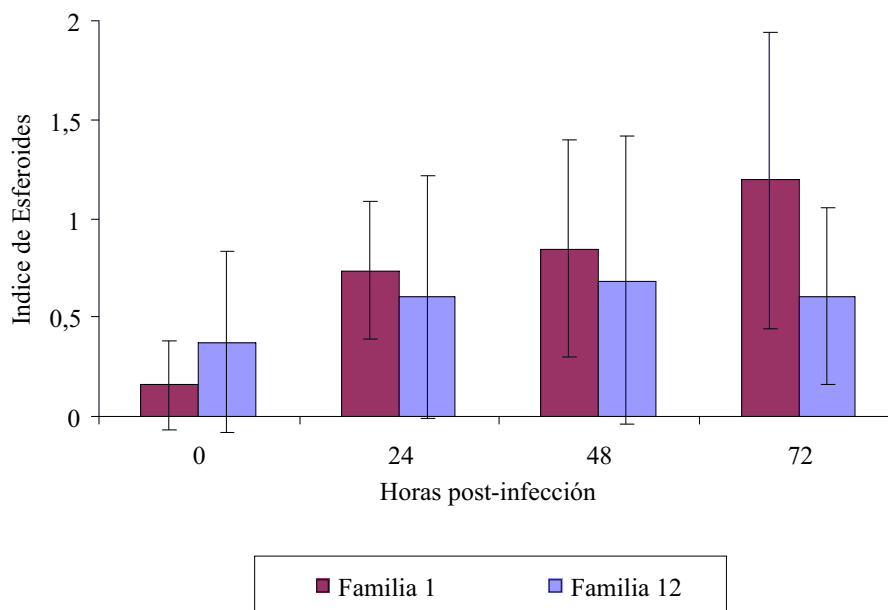


Figura 14: Índice inmunitario de esferoides de las familias F1 y F12 luego de ser infectadas experimentalmente. Cada punto es promedio de un máximo de 20 camarones

La Figura 15 muestra que antes de la infección aproximadamente un 40% de los individuos de las familias F1 y F12 presentaron esferoides (todos ellos de tipo A en el primer caso y de ambos tipos en el segundo). A las 24 hrs post-infección todos los individuos de la familia F1 mostraron esferoides de ambos morfotipos los que además aumentaron en número según se desprende del índice de esferoides. A las 48 hrs más del 80% de los supervivientes mostraron esferoides. Sin embargo en la familia F12 apenas aumentó el porcentaje de individuos que presentaron esferoides a partir de las 24 hrs, y los casos que los presentaron fueron mayoritariamente de tipo B.

El morfotipo C se observó en pocos camarones al tercer día de infección (datos no mostrados) y esferoides ectópicos fueron encontrados en 4 camarones de la familia F1 y en 3 de la familia F12. Estos estuvieron localizados entre los túbulos del hepatopáncreas,

epitelio del estómago y apéndices (familia F1) y en el corazón y en el hepatopáncreas (familia F12).

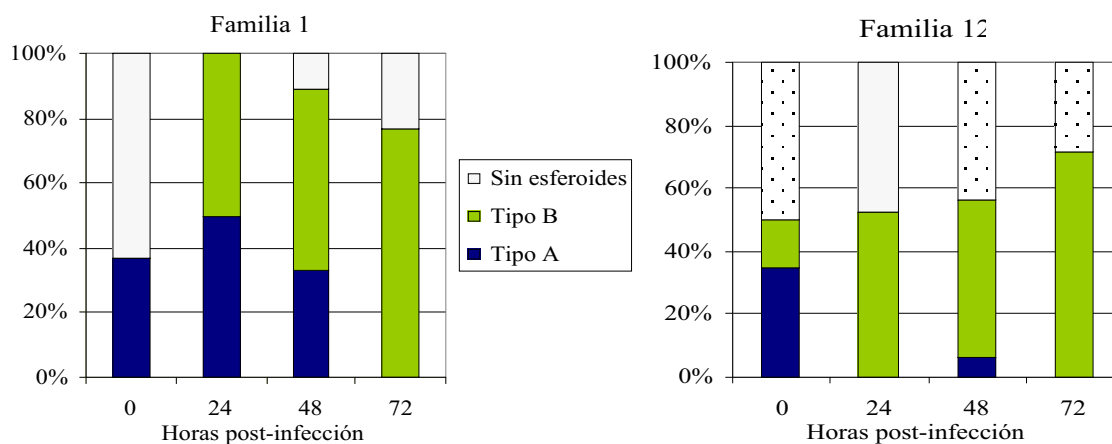


Figura 15: Presencia de esferoides según el morfotipo en juveniles de *Litopenaeus vannamei* infectados experimentalmente durante tres días con WSSV.

4.3.3. Comportamiento de hemocitos en circulación

En esta sección se analizó el comportamiento de los hemocitos circulantes mediante hemograma. Todas las familias fueron incluidas en el análisis estadístico. Se realizó un análisis al tiempo 0, donde se evaluó el comportamiento antes de la infección, un análisis a las 24 hrs donde se observó la respuesta al virus antes de iniciarse la mortalidad. Además se evaluó la respuesta inmune celular en todo el tiempo de infección para las familias de *L. vannamei*, considerando el factor mortalidad.

- Hemograma antes de iniciar la infección experimental

El análisis inicial fue realizado para cada una de las subpoblaciones hemocitarias tanto en número como en porcentaje, evaluando de esta manera la respuesta innata sin la presencia del agente patógeno introducido por medio de la infección experimental. Para esto se comprobó que los datos presenten normalidad y homogeneidad de varianza (Anexo VI).

El análisis de varianza mostró que existió efecto significativo en por lo menos una familia en las variables estudiadas a excepción del porcentaje de hemocitos granulosa (Tabla 8).

Tabla 8: Análisis de varianza de los hemogramas antes de la infección experimental

Variables	Tiempo 0
Nº Total de hemocitos	0,0001 ^a
Nº granulosa	0,0006 ^a
Nº semigranulosa	0,0001 ^a
Nº hialina	0,001 ^a
Nº atípica	0,0001 ^a
% granulosa	0,249
% semigranulosa	0,001 ^a
% hialina	0,001 ^a
% atípica	0,001 ^a

^aDiferencia significativa ($p < 0.05$)

Las comparaciones múltiples fueron realizadas con la prueba de Duncan. Los resultados de esta prueba se presentan en la Tabla 9. El número de hemocitos totales se presentó en tres categorías, 1) bajo número de hemocitos para las familias F11 y F22 ($3,47$ y $4,15 \times 10^6 \cdot \text{ml}^{-1}$); 2) mediano número de hemocitos para las familias F12 y F23 ($8,14 \times 10^6 \cdot \text{ml}^{-1}$) y 3) alto número de hemocitos para las familias F3 y F1 (16 y $21 \times 10^6 \cdot \text{ml}^{-1}$) respectivamente.

Se analizó además las subpoblaciones hemocitarias para comprender el origen de las variaciones en el número total de hemocitos en cada familia. Las familias F11 y F22 fueron semejantes en las subpoblaciones de hemocitos granulosa, semigranulosa, hialina y atípica, y se caracterizaron por tener cantidades inferiores al resto de las familias. Al contrario las familias F1 y F3 tuvieron cantidades altas de hemocitos granulosa y hemocitos semigranulosa. Sin embargo la diferencia estuvo en el número

de hemocitos hialinos y atípicos. La familia F1 reportó un alto número de hemocitos hialinos y poca cantidad de hemocitos atípicos, en tanto que la familia F3 tuvo alto contenido de atípicos y bajo contenido de hialinos. La familia F1 tuvo un bajo número de hemocitos atípicos al igual que las familias F11 y F22, cuyas cantidades fueron inferiores al resto de las familias. En tanto que en las familias F3, F12 y F23 el número de hemocitos atípicos sobrepaso los cuatro millones de células por ml.

Tabla 9: Concentraciones de hemocitos (10^6 ml^{-1}) en diferentes familias de *Litopenaeus vannamei*. Las medias en la misma columna con diferentes letras son significativamente diferentes ($p < 0.05$)

Familias	No. Total de hemocitos	Hemocitos granulados	Hemocitos semigranulosos	Hemocitos hialinos	Hemocitos atípicos
F1	21.3 ^c ± 8.1	3.61 ^c ± 2.0	9.32 ^c ± 4.5	6.84 ^d ± 2.4	1.57 ^a ± 0.3
F11	3.47 ^a ± 1.0	0.35 ^a ± 0.1	0.92 ^a ± 0.6	0.37 ^a ± 0.1	1.83 ^a ± 0.3
F22	4.15 ^a ± 1.4	0.45 ^a ± 0.3	0.81 ^a ± 0.2	0.48 ^a ± 0.2	2.41 ^a ± 1.3
F3	17 ^c ± 6.7	2.21 ^{bc} ± 0.9	8.83 ^c ± 3.9	1.68 ^{bc} ± 0.8	4.29 ^b ± 1.4
F12	14.1 ^{bc} ± 4.5	0.98 ^{ab} ± 0.7	2.61 ^b ± 1.5	2.95 ^c ± 0.8	7.51 ^c ± 2.0
F23	8.41 ^b ± 0.7	0.67 ^a ± 0.4	1.06 ^a ± 0.7	1.28 ^b ± 0.7	5.4 ^{bc} ± 0.7

En la Tabla 10 se presentan el porcentaje de las subpoblaciones hemocitarias. Las familias F1 y F3 tuvieron porcentajes altos de hemocitos semigranulosos en comparación con el resto de familias. Estas dos familias se diferenciaron entre ellas en el porcentaje de hemocitos hialinos y atípicos. La familia F1 presentó el porcentaje más alto de hemocitos hialinos y el más bajo de hemocitos atípicos.

Tabla 10: Porcentajes de hemocitos (%) en diferentes familias de *Litopenaeus vannamei*. Las medias en la misma columna con diferentes letras son significativamente diferentes ($p < 0.05$)

Familias	Hemocitos semigranulosos	Hemocitos hialinos	Hemocitos atípicos
F1	42 ^b ± 4	34 ^c ± 7	8.6 ^a ± 4
F11	23 ^a ± 5	11 ^a ± 1	56 ^c ± 5
F22	26 ^a ± 13	11 ^a ± 4	54 ^c ± 11
F3	46 ^b ± 10	11 ^a ± 2	31 ^b ± 12
F12	17 ^a ± 6	21 ^b ± 4	55 ^c ± 5
F23	13 ^a ± 8	16 ^{ab} ± 9	63 ^c ± 10

- Respuesta inmune celular inmediata (24 hrs) a la infección con WSSV

El análisis de varianza para cada una de las variables estudiadas se muestra en la Tabla 11. El análisis mostró diferencias significativas para todas las variables a excepción del número total de hemocitos y de las subpoblaciones de hemocitos granulosos (número y porcentaje) y hemocitos hialinos (número). Para esto se comprobó que los datos presenten normalidad y homogeneidad de varianza (Anexo VII).

Tabla.11: Análisis de varianza del hemograma luego de 24 horas de infección

Variabes	24 hrs
Nº granulosos	0.52
Nº semigranulosos	0.037 ^a
Nº hialinos	0.103
Nº atípicos	0.002 ^a
Nº Total de hemocitos	0.255
% granulosos	0.522
% semigranulosos	0.005 ^a
% hialinos	0.016 ^a
% atípicos	0.0001 ^a

^aDiferencia significativa ($p < 0,05$)

El análisis de rangos múltiples de Duncan (Tabla 12) destaca que la familia F11 (resistente) tuvo el menor número y porcentaje de hemocitos atípicos. Las familias de mayor susceptibilidad F12 y F23 presentaron bajos porcentajes de hemocitos semigranulosos.

Tabla 12: Hemograma después de 24 horas post-infección en número (10^6 ml^{-1}) y en porcentaje en familias de *Litopenaeus vannamei*. Las medias en la misma columna con diferentes letras son significativamente diferentes ($p < 0.05$)

Familias	Hemocitos (10^6 ml^{-1})		Hemocitos (%)		
	Hemocitos semigranulosos	Hemocitos atípicos	Hemocitos semigranulosos	Hemocitos hialinos	Hemocitos atípicos
F1	15 ^b ±4.	6 ^{bc} ±2	57 ^c ±2	3 ^{ab} ±1	27 ^{bc} ±4
F11	11 ^b ±2	2 ^a ±0.52	66 ^c ±12	10 ^c ±9	10 ^a ±3
F22	9 ^{ab} ±2	3 ^a ±1	55 ^{bc} ±14	7 ^{bc} ±2	25 ^b ±8
F3	13 ^b ±6	3 ^{ab} ±2	62 ^c ±5	2 ^a ±1	21 ^b ±5
F12	5 ^a ±2	6 ^c ±2	33 ^a ±7	10 ^c ±5	48 ^d ±7
F23	12 ^b ±6	7 ^c ±2	42 ^{ab} ±8	7 ^{bc} ±2	37 ^c ±9

- Respuesta inmune celular en familias de *L. vannamei* según el tiempo de infección

En este análisis, la mortalidad se consideró como parte de una variable no controlable, a la que se atribuyó la causa de la variación en los grupos hemocitarios a las 72 hrs para las familias resistentes y desde las 48 hrs para las familias susceptibles, lo que implicaría sólo la respuesta inmunitaria de los animales supervivientes a tal evento y no la respuesta de toda la población. Por tal motivo para que la respuesta evaluada sea de una población homogénea, los datos utilizados se escogieron de manera aleatoria en cada tiempo, teniendo como base el número menor de animales vivos en cada réplica. El modelo

utilizado para este bioensayo permitió evaluar los efectos principales (familia y tiempo), interacciones y efectos simples en cada una de las variables estudiadas. Los datos fueron revisados para normalidad y homogeneidad de varianzas (Anexo VIII). En la Tabla 13 se muestra un resumen del análisis de varianza para cada una de las variables analizadas y en el anexo IX se detalla cada una de las variables.

Tabla 13: Valores de probabilidad (p) del análisis de varianza de los hemogramas de familias de *Litopenaeus vannamei* desafiadas al WSSV

	NTH	Subpoblaciones hemocitarias							
		GN	SN	HN	AN	GP	SP	HP	AP
Replica	0.2303	0.047 ^a	0.453	0.204	0.992	0.326	0.99	0.33	0.48
Familia	0.0229 ^a	0.004 ^a	0.001 ^a	0.039 ^a	3E-04 ^a	0.073	0.0003 ^a	0.327	7E-04 ^a
Tiempo	0.0008 ^a	4E-04 ^a	1E-04 ^a	9E-04 ^a	0.001 ^a	0.0001 ^a	0.0029 ^a	1E-04 ^a	1E-04 ^a
Tiempo*Familia	0.1813	0.249	0.015 ^a	0.034 ^a	0.002 ^a	0.0146 ^a	0.0024 ^a	0.062	0.001 ^a

^aDiferencias significativas $p < 0.05$. NTH: Número total de hemocitos; GN: Número Hemocitos granulados; SN: Número Hemocitos semigranulosos; HN: Número Hemocitos hialinos; AN: Número Hemocitos atípicos; GP: Porcentaje Hemocitos granulados; SP: Porcentaje Hemocitos semigranulosos; HP: Porcentaje Hemocitos hialinos; AP: Porcentaje Hemocitos atípicos.

En forma general podemos decir que la evidencia de interacción mostró que la producción de los tipos de hemocitos se vio influenciada por la interacción de las familias con el tiempo de post-infección. En otras palabras, el número de hemocitos esperados varió según la familia y según el tiempo de post-infección. Los efectos principales significativos demostraron el cambio promedio en la respuesta esperada es decir la respuesta media de la población.

- Hemogramas: Número total de hemocitos (NTH)

En el número total de hemocitos (NTH), no hubo evidencia ($p = 0.181$) de interacción entre familia y tiempo de post-infección. Sin embargo los efectos principales de familia y tiempo de post-infección fueron significativos ($p = 0,023$ y $p = 0,0008$, respectivamente) lo que indicó diferencias en las respuestas esperadas en las diferentes familias y tiempos de post-infección. Para examinar la naturaleza de los efectos principales de las familias y tiempo de post-infección, se realizó un análisis de rangos múltiples Duncan (Tabla 14). El resultado de este análisis mostró que la producción media global esperada del número total de hemocitos fue inferior en las familias F11 y F22. Las familias que mostraron mayores cantidades fueron la F1 y F3. En valores medios estuvieron las familia F12 y F23. El factor tiempo de infección, indicó que fue el tiempo 0 quién presentó las menores cantidades de hemocitos totales.

Tabla 14: Prueba de rangos múltiples (Duncan) del NTH en familias de *Litopenaeus vannamei* y tiempo de infección con WSSV

NTH (10^6 cel/ml)			NTH (10^6 cel/ml)		
Familias	Media	Rangos	Tiempo	Media	Rangos
F 11	12.6	a	0	9.8	a
F 22	12.2	a	24	17.0	b
F 12	14.5	a b	48	22.1	b
F 23	18.7	a b	72	16.3	b
F 3	18.2	b			
F 1	21.7	b			

- Hemograma: Conteo diferencial de hemocitos

En el número de hemocitos granulados no hubo evidencia ($p = 0.249$) de interacción entre familia y tiempo de post-infección. Sin embargo los efectos principales de familia y

tiempo de post-infección fueron ambos significativos ($p = 0,004$ y $p = 0,0004$, respectivamente). Para examinar la naturaleza de los efectos de las familias y tiempo de post-infección, se realizó un análisis de rangos múltiples Duncan (Tabla 15). El resultado de este análisis mostró que la producción media global esperada de hemocitos granuloso fue menor en las familias F12, F22 y F11 que en las familias F1 y F3. Luego de analizar la naturaleza del efecto tiempo de post-infección se observó que la concentración de hemocitos granuloso fue alta en el tiempo 0, encontrándose una disminución marcada a las 48 hrs de post-infección.

Tabla 15: Prueba de rangos múltiples (Duncan) del número de hemocitos granuloso en familias de *Litopenaeus vannamei* y tiempo de infección con WSSV

Hemocitos Granulosos 10^6 (cel /ml)			Hemocitos Granulosos 10^6 (cel /ml)			
Familias	Media	Rangos	Tiempo	Media	Rangos	
F 12	1.6	a	0	1.1	a	
F 22	1.7	a	24	1.1	a	b
F 11	1.9	a	72	0.3	b c	
F 23	3.4	a b	48	0.7	c	
F 3	3.3	b				
F 1	4.1	b				

En el número de hemocitos semigranulosos hubo evidencia ($p = 0.0149$) de interacción entre familia y tiempo de post-infección. En otras palabras el efecto de cambio en los diferentes periodos de tiempo no fue el mismo en las 6 familias. Como se puede observar en la Figura 16, en el período de 0 hrs a 24 hrs se incrementó el número de hemocitos semigranulosos de todas las familias. Luego de este periodo de tiempo las familias F1, F3 y F11 presentaron una disminución en la cantidad de hemocitos semigranulosos desde las 24 hrs hasta las 48 hrs para la familia F3 y hasta las 72 hrs para las dos restantes, a diferencia de las familias F22, F12 y F23, donde se observó un incremento, para después

comenzar a disminuir las cantidades desde las 48 hrs. Es decir que el efecto de cambio de nivel de infección también provocó una disminución en general de los hemocitos semigranulosos.

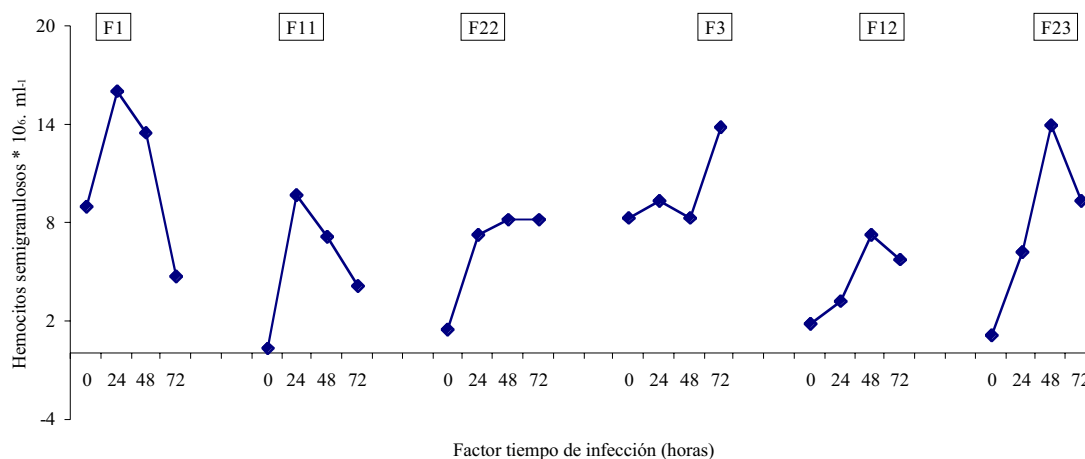


Figura 16: Comportamiento del número de hemocitos semigranulosos en la hemolinfa de camarones infectados con WSSV.

En el número de hemocitos hialinos existió un efecto de interacción ($p = 0.034$) entre los factores familia y tiempo de post-infección. La respuesta esperada del número de hemocitos hialinos disminuyó en las familias F1, F3 y F12 cuando el periodo de tiempo de infección cambió de nivel de 0hrs a 24 hrs, a diferencia de un incremento producido en las familias F11 y F23 durante el mismo periodo. Todas las familias proliferaron hemocitos hialinos de las 24 hrs a las 48 hrs, cuando comenzó una disminución de esta población. El comportamiento hemocitario de la subpoblación de hemocitos hialinos en las familias resistentes y susceptibles se muestra en la Figura 17.

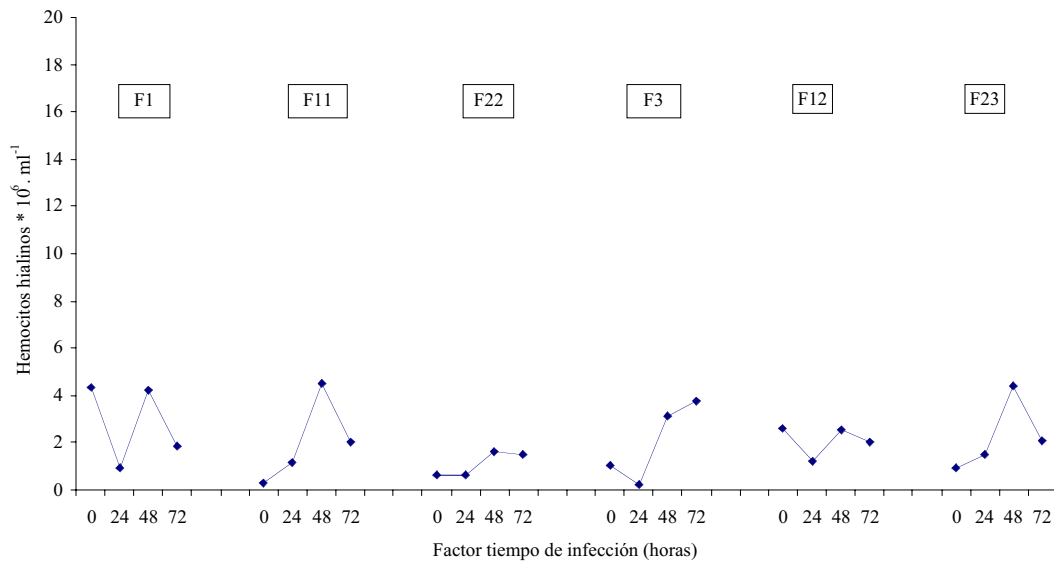


Figura 17: Comportamiento del número de hemocitos hialinos en la hemolinfa de camarones infectados con WSSV.

El número de hemocitos atípicos mostró interacción ($p = 0.002$) entre los factores familia y tiempo de post-infección. En otras palabras se pudo concluir que el efecto de cambio del nivel del tiempo de infección no fue el mismo en las 6 familias. La Figura 18 muestra los cambios efectuados en el número de hemocitos atípicos en los periodos de tiempo de infección. Se observó un incremento de esta subpoblación hemocitaria en todas las familias al cambiar de 0 hrs a 24 hrs post-infección. Observando el efecto principal familia, las familias F12 y F23 tuvieron el más alto número de hemocitos atípicos como promedio de todo el tiempo de experimento (datos no mostrados).

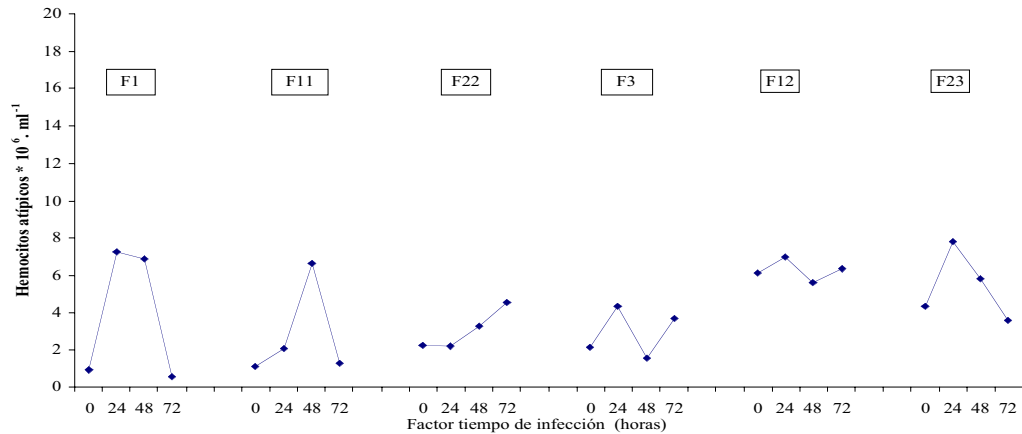


Figura 18: Comportamiento del número de hemocitos atípicos en la hemolinfa de camarones infectados con WSSV

- Hemograma: Fórmula hemocitaria

El análisis del porcentaje de hemocitos granulados, nos hizo inferir sobre la existencia de interacción entre los factores familia y tiempo de post-infección ($p = 0,0146$). Observando la Figura 19 podemos evidenciar que para el primer periodo de exposición al virus, las familias reaccionaron diferentes y no existió un patrón definido en la presencia de hemocitos granulados. A las 24 hrs desciende el porcentaje de hemocitos granulados pero sí analizamos el cambio ocurrido entre las 24 hrs y 72 hrs, todas las familias incrementaron el porcentaje a excepción de la F12. La tendencia al incremento se vio en tres familias F1, F11 y F23, al final de las 72 hrs. El efecto principal tiempo de infección fue significativo en esta variable.

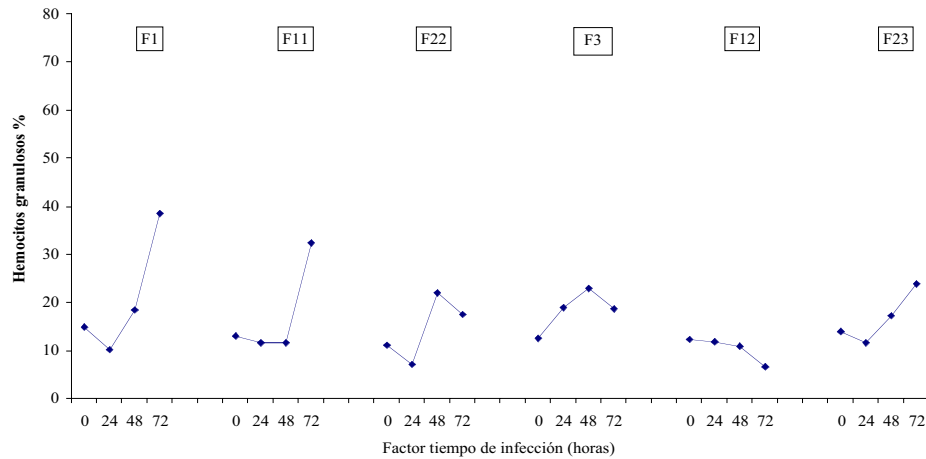


Figura 19: Comportamiento del porcentaje de hemocitos granulosos en la hemolinfa de camarones infectados con WSSV.

El análisis del porcentaje de hemocitos semigranulosos, nos hace inferir sobre la existencia de interacción entre los factores familia y tiempo de infección ($p = 0,0024$). El porcentaje de hemocitos semigranulosos en el primer periodo de infección (0 hrs a 24 hrs) demostró un incremento en todas las familias a excepción de la familia F3. Sin embargo a partir de las 24 hrs hasta las 72 hrs, se presentó un descenso del porcentaje de hemocitos semigranulosos en las familias a excepción las susceptibles, la F12 y F23 en las que el porcentaje de semigranulosos se incrementó hasta las 48 hrs (Figura 20).

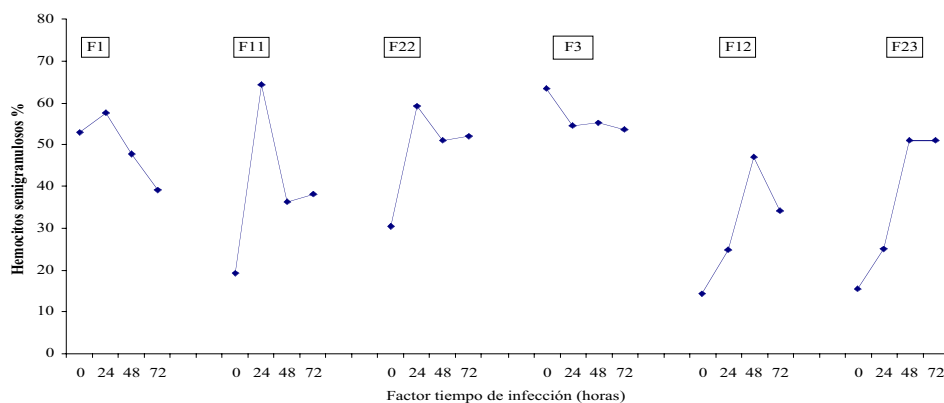


Figura 20: Comportamiento del porcentaje de hemocitos semigranulosos en la hemolinfa de camarones infectados con WSSV.

El análisis del porcentaje de hemocitos hialinos no mostró evidencia de una interacción entre las familias y el tiempo de post-infección ($p = 0,0621$). Al analizar los efectos principales sólo se encontró diferencias significativas ($p = 0,0001$) en el factor tiempo de infección. La Tabla 16 presenta los resultados de un análisis de comparaciones múltiples, en donde se apreció que el promedio en porcentaje de los hemocitos hialinos fue diferente a las 24 hrs de infección. El porcentaje medio de hemocitos hialinos alcanzado por todas las familias fue del 7 %, siendo este valor el más bajo presentado en todo el tiempo del experimento.

Tabla 16: Prueba de rangos múltiples (Duncan) de la subpoblación de hemocitos hialinos (%) en los diferentes tiempos de infección

Tiempo	Media	Rangos
24	7	a
72	14	b
48	15	b
0	16	b

El análisis del porcentaje de hemocitos atípicos nos hizo inferir sobre la existencia de interacción entre los factores familia y tiempo de post-infección ($p = 0,0014$). En el periodo de 24 hrs a 72 hrs, todas las familias tuvieron un mismo patrón, es decir al incrementarse el periodo de infección el porcentaje de hemocitos atípicos disminuyó. Las familias F12 y F23 mantienen altos hemocitos atípicos hasta las 24 hrs. La familia F1 y la F3 son las únicas que incrementaron el porcentaje de hemocitos atípicos a las 24 hrs antes de perderlos desde las 48 hrs (Figura 21).

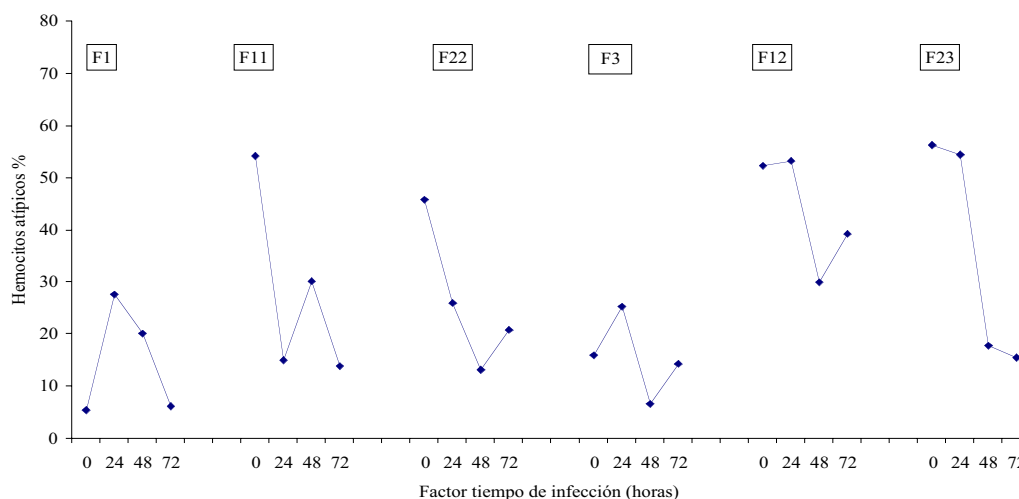


Figura 21: Comportamiento del porcentaje de hemocitos atípicos en la hemolinfa de camarones infectados con WSSV.

4.3.4. Proteínas Plasmáticas

Cabe indicar que éste parámetro fisiológico adicional se midió como un marcador de buena salud. El análisis de varianza en el tiempo 0 (antes de la infección) y 24 hrs (después de la infección) fue significativo ($p = 0.0173$ y $p = 0.0001$ respectivamente). Los resultados de las comparaciones múltiples se presentan en la Tabla 17. En general todas las familias en el tiempo 0 presentaron valores bajos. Sin embargo, la familia F23

tuvo la mayor concentración de proteínas plasmáticas en relación a las demás. Las familias F11 y F22 comenzaron con bajas concentraciones de proteínas plasmáticas. En tanto que las familias F1, F3 y F12 tuvieron cantidades similares y nos atreveríamos a decir que representaron valores intermedios. A las 24 hrs de infección las familias con mayor concentración de proteínas plasmáticas fueron las F1, F11, F12, F22 y F23. La familia F3 tuvo baja concentración de proteínas plasmáticas.

Tabla 17: Prueba de rangos múltiples (Duncan) en la concentración de proteínas plasmáticas en familias de *Litopenaeus vannamei* (tiempos 0 y 24)

Familias	Proteínas Plasmáticas ($\mu\text{g. } \mu\text{l}^{-1}$)	
	0 hrs	24 hrs
F1	60 ^{bc} \pm 4	79 ^c \pm 7
F11	45 ^a \pm 10	68 ^{bc} \pm 11
F22	54 ^{ab} \pm 9	58 ^b \pm 12
F3	61 ^{bc} \pm 11	37 ^a \pm 9
F12	60 ^{bc} \pm 8	72 ^c \pm 4
F23	74 ^c \pm 11	71 ^c \pm 4

El análisis de proteínas plasmáticas de todas las familias en los diferentes tiempos de infección mostraron que no hubo evidencia ($p = 0.267$) de interacción entre familia y tiempo de infección. Como se puede apreciar la variable tiempo de infección no ejerció ningún efecto significativo ($p = 0,747$), indicando que las diferencias en las respuestas esperadas se debieron a las familias y no al tiempo de exposición al virus. Sin embargo el efecto de la variable familia sobre la concentración de proteínas plasmáticas fue significativo ($p = 0.012$). Para examinar la naturaleza de los efectos del factor familia, se realizó un análisis de rangos múltiples de Duncan (Tabla 18). El resultado de este análisis

mostró que la producción media global esperada en la concentración de proteínas fue más alta en la familia F1(resistente) y el valor más bajo en la familia F3 (susceptible).

Tabla 18: Prueba de rangos múltiples (Duncan) en la concentración de proteínas plasmáticas de las familias de *Litopenaeus vannammei* que fueron desafiadas al WSSV

Familias	Media	Rangos	
F 3	49.50	a	
F 11	54.17	a	b
F 22	58.30	a	b
F 12	64.97	b	c
F 23	65.95	b	c
F 1	71.78		c

5. DISCUSION

Este estudio reporta tres pruebas de desafíos efectuadas experimentalmente en diferentes estadios de desarrollo (PL 75 y camarones juveniles) de familias de *L. vannamei*. Los resultados mostraron una alta susceptibilidad a la ingestión de WSSV a través del músculo de animales infectados. Los tres bioensayos fueron secuenciales, los mismos que estuvieron enfocados a cumplir el objetivo principal de esta investigación, el cual fue observar la respuesta inmunitaria en familias de baja susceptibilidad al WSSV bajo condiciones de infección experimental.

5.1. BIOENSAYO I: SELECCIÓN DE FAMILIAS

Pérez *et al.* (2002) reportaron supervivencias significativamente más altas en unas familias que en otras de *L. vannamei*. Por tal motivo el primer paso fue comprobar la existencia de familias resistentes o menos susceptibles al WSSV en el material biológico seleccionado para los experimentos. La característica de selección fue la supervivencia al final del estudio. En 17 familias (63 %) la mortalidad fue del 100%. Estos resultados explican las bajísimas supervivencias encontradas en estanques de producción. La determinación de familias altamente susceptibles en este estudio fue realizada en base a la supervivencia, así familias que alcanzaron 0% de supervivencia antes de terminar el ensayo fueron clasificadas como tal. La selección de estas familias se realizó en base a la disponibilidad de animales. En 10 familias (37%) hubo supervivientes al final del estudio. Sin embargo el análisis estadístico no mostró diferencias significativas entre estas familias, por lo que todas las familias supervivientes se consideraron resistente o de baja susceptibilidad. Estos resultados muestran la existencia de variabilidad a nivel familiar en la respuesta al virus. La existencia de variabilidad en la supervivencia de

familias es fundamental para los programas de selección genética e implica que un proceso de mejoramiento podría ser exitoso a mediano plazo (Pérez *et al.* 2002).

La bibliografía señala análisis de resistencia al WSSV en especies y familias al 6^{to} día de infección. Así Lightner *et al.* (1998), reportaron que juveniles de *L. vannamei* presentaron bajas supervivencias al 6^{to} día de infección con WSSV, a diferencia de especies como *P. aztecus* y *P. duodarum* que mostraron resistencia al virus (73 % de supervivencia). Por otra parte, Pérez *et al.* (2002) identificaron familias resistentes de *L. vannamei* al 6^{to} día de post-infección, mientras que otras llegan con 0% de supervivientes. En el mismo sentido, Sonnenholzner *et al.* (2002) mediante técnicas histológicas y PCR, y Chen *et al.* (2002) por ensayos de ELISA, han reportado que al 6^{to} día se alcanza el máximo nivel de infección por WSSV. Los animales que pasen este límite, serían capaces de soportar altas cargas virales y un segundo rebrote viral.

Sin embargo, nuestros resultados indicaron que muchas familias seleccionadas como resistentes al 6^{to} día son potencialmente susceptibles al WSSV. Como ejemplo podemos citar la supervivencia de las familias F27 y F28, en las cuales se observaron supervivencias significativamente altas al 6^{to} día mediante Anova (datos no mostrados) pero alcanzaron el 100% de mortalidad antes de terminar el estudio. Es decir que pasaron la frontera, pero no soportaron una reinfección. Recientemente White *et al.* (2002) proponen un protocolo de desafío frente a TSV en el que establecen que la duración de este tipo de pruebas debe ser un mínimo de 14 días y que al menos en los dos últimos días de la prueba no se produzca mortalidad. Por lo cual para el segundo bioensayo se seleccionó 5 familias arbitrariamente en base a la mayor supervivencia promedio y a la disponibilidad de animales.

5.2. BIOENSAYO II: INMUNOESTIMULACIÓN Y SEGUNDA PRUEBA DE DESAFÍO AL WSSV

El objetivo del segundo bioensayo fue comprobar la reacción al desafío con WSSV de las familias previamente inmunoestimuladas durante 15 días con β -1,3 glucanos. Los resultados demostraron que el efecto de los β -1,3 glucanos en familias infectadas con WSSV tuvo un carácter selectivo, es decir que observar un efecto significativo dependió de las características de las familias. Este efecto se vio reflejado como una respuesta a la inmunoestimulación en una sola familia, la F11 (esta familia había presentado la mayor supervivencia en el bioensayo I). Cuando fue inmunoestimulada se observó un 17 % de supervivencia a los 8 días, frente al 9 % cuando no lo fue. Chang *et al.* (1999) reportaron mortalidades en postlarvas y juveniles de *P. monodon* del 100% al 5^{to} día post-infección en animales desafiados al WSSV alimentados con una dieta libre de β -1,3 glucanos, a diferencia de los alimentados con β -1,3 glucanos que presentaron un 16% de supervivencia, con un suministro de 10 días en la alimentación; la supervivencia se incrementó al 20% en el 6^{to} día de post-infección, con un suministro de 20 días en la alimentación.

En el bioensayo I, la supervivencia final de la familia F11 a los 15 días de infección fue del 24 %, en tanto que en el segundo bioensayo, la supervivencia al 8^{vo} día sin inmunoestimulación previa fue 9 %. Este resultado sugiere que la cohabitación entre familias durante el segundo bioensayo podría haber provocado severas reinfecciones, motivadas por la liberación de partículas virales al medio por parte de las familias más susceptibles. Pérez *et al.* (2002) han reportado mayor susceptibilidad en PL75 que en PL55. Sin embargo, en el bioensayo de esta investigación los animales son de 2 g y de mayor edad que PL 75. Por otra parte en desafíos con WSSV realizados con un lote de

camarones de *L. vannamei* a distintas edades, Melena (comunicación personal, Fundación CENAIME-ESPOL, Guayaquil, Ecuador) ha observado decrecimientos en la mortalidad de individuos de mayor edad. Pramod *et al.* (2002) encontraron que animales subadultos y adultos de *M. rosenbergii* presentaron menor mortalidad atribuida por WSSV, que las larvas y juveniles. Sin embargo, en nuestro estudio la mortalidad se incremento en el 2^{do} bioensayo. Estos resultados coinciden con los reportados por Lotz (1997), donde la susceptibilidad al virus de Taura en *L. vannamei* no disminuyó al incrementar el tamaño del animal. Para establecer tal efecto con WSSV, las variables edad y cohabitación deben ser evaluadas individualmente en futuras investigaciones.

5.3. BIOENSAYO III: EVOLUCIÓN DE LA INFECCIÓN

El bioensayo III estuvo enfocado a comprobar si las diferencias en las supervivencias de familias se debió a una respuesta de tipo inmunitario. Por esta razón se consideraron importante los primeros 3 días para evaluar el comportamiento hemocitario circulante e infiltrante, así como la evolución histopatológica del WSSV en los tejidos blancos.

El índice histológico de WSSV reportado por Sonnenholzner *et al.* (2002) en animales infectados a 27°C fue similar al encontrado en este trabajo, corroborando que el nivel de infección encontrado al tercer día produce cerca del 50 % de la mortalidad para familias susceptibles como para grupos de individuos en infecciones experimentales con WSSV. Una posible resistencia fue observada por Sonnenholzner *et al.* (2002) quienes reportaron la existencia de animales que mueren con mayor carga viral entre el 4^{to} y 6^{to} día post-infección, a diferencia de otros que presentando menor carga viral mueren entre el 2^{do} y 3^{er} día. Esta observación fue ratificada en nuestro estudio, el cual además sugiere que estas diferencias de susceptibilidad en grupos de animales estarían dadas por diferencias

familiares. Así la familia F1 (resistente) soportó cargas virales más fuertes que la familia F12 (susceptible). Además la familia F12 presentó un índice de infección mayor a las 24 hrs post-infección que la familia F1. Estos resultados indican que la familia F12 presenta un sistema inmune incapaz de enfrentar al patógeno las primeras horas de infección y una baja tolerancia a fuertes cargas virales. Tang y Lightner (2000) establecen que entre las 24 y 36 hrs post-infección el WSSV es capaz de incrementar 140 veces su presencia en los tejidos. Este intervalo de infección es considerado el inicio clínico de la enfermedad (Sonnenholzner *et al.*, 2002) es decir el periodo de incubación. Otra observación realizada por los mismos autores y que coincide con nuestros resultados es que entre las 48 hrs y 76 hrs el índice de infección se desacelera, situación atribuida al incremento de los hemocitos en circulación y a la migración de estos a los tejidos infectados en los animales supervivientes (Tang y Lightner 2000).

Otras patologías consideradas en las observaciones histológicas fueron la piknosis y kariorrexis (PK) las cuales han sido asociadas a varios virus (TSV, YHV y WSSV). Según Rodríguez *et al.* (in press) las células picnóticas serían células apoptóticas (que se han suicidado para no replicar al virus). Sonnenholzner *et al.* (2002) también señalan que la PK es mayor en animales que toleran altas cargas de WSSV o en supervivientes. En este estudio, al tercer día de infección los supervivientes de la familia F1 tuvieron más alto nivel de PK que la familia susceptible F12.

Diferentes tipos de respuesta inmune se observaron entre las familias resistentes y susceptibles. Estos son los primeros datos de respuesta inmune reportados en familias de camarón expuestas a una infección con WSSV. Es necesario recordar que en los crustáceos cada tipo de célula tiene su rol en las reacciones de defensa. En el cangrejo de

río las células hialinas están implicadas directamente en fagocitosis, mientras que las células granulares participan en el almacenamiento y liberación del sistema profenoloxidasa (proPo) y en citotoxicidad (Johansson *et al.* 2000).

Los resultados de los hemogramas mostraron gran variabilidad del número total de hemocitos y de la fórmula hemocitaria. La variación en el número de hemocitos es regulada por la liberación de células desde el tejido hematopoyético y por la migración de hemocitos a diferentes tejidos (Muñoz *et al.* 2002). En nuestro estudio las características propias de cada familia antes de iniciar la infección experimental demostraron que existieron familias que empezaron con un número alto de hemocitos. Le Moullac *et al.* (1998) relacionan esto a resistencia a patógenos, individuos que tengan en circulación una alta cantidad de hemocitos resistirán mejor la presencia de un patógeno, aunque en este estudio esto fue observado entre familias consideradas resistentes y susceptibles (F1 y F3). La familia F3 al igual que la F1 también presentó un alto número de hemocitos semigranulosos y granulosos al tiempo 0. Sin embargo, la familia F3 tuvo poca cantidad de hialinos y alto número de atípicos. Esto último fue también característico de las familias susceptibles F12 y F23, las cuales tuvieron un alto contenido de hemocitos atípicos en circulación, demostrando un deficiente estado inmunitario antes de iniciar la infección experimental. Además relaciona porcentajes altos de hemocitos atípicos con una baja capacidad de reemplazo por hemocitos nuevos y una libre circulación de células inmunitarias desgastadas o apoptóticas, las cuales no son eliminadas por hemocitos sanos y activos. La familia F11 (resistente) se merece un análisis particular. Esta familia se inició con pocas cantidades de hemocitos y alto porcentaje de hemocitos atípicos.

Es importante destacar que la reacción a la infección, independientemente de la familia, fue el aumento en la producción de hemocitos ante la presencia del virus. Esto fue observado desde las 24 hrs de infección para el número total de hemocitos, hemocitos semigranulosos y atípicos; y desde las 48 hrs para los hemocitos hialinos y granulosos. La bibliografía indica que la variación de la fórmula hemocitaria y el grado de respuesta se ven influenciados por el tipo de patógeno o partícula extraña reconocida por el hospedero como no propia. Jiravanichpaisal *et al.* (2001) reportaron que en el cangrejo de río inyectado con tejidos de branquias homogeneizadas en medio L15 con o sin WSSV, la cantidad de hemocitos granulosos se incrementó desde el tercer día post-infección; sugiriendo que el homogenizado debió contener moléculas extrañas que estimularon los mecanismos de defensa celular. Al 5^{to} día, el balance normal de los hemocitos se restauró (Jiravanichpaisal *et al.* 2001).

La subpoblación hemocitaria de mayor peso en el número total de hemocitos fue la de los semigranulosos (en porcentaje y en número). Tanto en las familias resistentes como en las susceptibles, los hemocitos semigranulosos se incrementaron rápidamente a las 24 hrs post-infección. Esto concuerda con las investigaciones de Holmblad y Söderhäll. (1999), quienes establecen que los hemocitos semigranulosos son los más sensibles y los que reaccionan primero en la respuesta inmune.

La causa de un descenso en el número de hemocitos es origen de controversias. Según Henning *et al.* (1998) el virus es el responsable de la disminución de los hemocitos, posiblemente debido a la explosión de las células o por apoptosis inducida por el virus, dando como resultado un rebrote del virus. Otros autores como Montesdeoca (2001) también reportan apoptosis en los hemocitos de camarón infectado con WSSV. Sin

embargo, Sonnenholzner *et al.* (2002) observaron en hemogramas seriados de una población de animales infectados con WSSV a 33°C (sin mortalidad), una disminución de hemocitos semigranulosos al tercer día de infección. Esta disminución fue relacionada por los autores con una migración de los hemocitos a los tejidos y la presencia del proceso de encapsulación en los tejidos blancos del WSSV (Sonnenholzner *et al.*, 2002). Nuestros resultados sugieren un comportamiento similar en las familias resistentes. En efecto a las 24 hrs post-infección hubo una fuerte generación de hemocitos semigranulosos en tanto que a las 48 hrs (cuando no se había desencadenado aún la mortalidad en estas familias) se observó un cambio de la pendiente de los hemocitos semigranulosos. Cambio que coincidió con un incremento en el índice de encapsulación para la familia F1. Esta tendencia en la pérdida de hemocitos semigranulosos se mantuvo en los animales sobrevivientes del 3^{er} día en estas dos familias.

Un comportamiento diferente fue observado en las familias F12 y F23 (susceptibles). En ellas se detectaron incrementos de hemocitos semigranulosos en circulación a las 24 hrs (pero en menor grado que en las familias resistentes). A las 48 hrs y 72 hrs los animales supervivientes mantuvieron mayor porcentaje de hemocitos semigranulosos que a las 24 hrs, en tanto que los índices de migración y encapsulación fueron bajos para la familia F12. Esto sugiere que además de la concentración de hemocitos saludables es importante el grado de activación hemocitaria. Ensayos como detección de O_2^- , actividad PO y detección de moléculas inmunitarias celulares podrían ser muy informativos sobre el nivel de activación celular en familias resistentes y susceptibles.

El análisis estadístico sugiere que la pérdida de hemocitos hialinos tanto en porcentaje como en número a las 24 hrs de post-infección estuvo relacionada con el inicio de la

infección. La familia F1 (resistente) tuvo altos porcentajes de hemocitos hialinos al inicio del experimento (tiempo 0), los cuales decrecieron a las 24 hrs de infección, momento en que se incrementaron considerablemente los hemocitos atípicos en esta familia. En el trabajo de Montesdeoca (2001) se enfatiza que los hemocitos hialinos tienen una relación inversa con los atípicos.

No se encontró un patrón característico para el porcentaje de hemocitos granulosos entre las familias pero si una reacción a la infección. Se observó una pérdida de esta subpoblación a las 24 hrs de infección, sugiriendo su participación en la formación de cápsulas en los tejidos infectados. Al respecto Montesdeoca (2001) y Sonnenholzner *et al.* (2002) señalan que los hemocitos granulosos decrecen con la infección por WSSV, sin embargo ellos sugieren que el decrecimiento está dado por migración y participación de estas células en encapsulación, coincidiendo esto con los resultados de Van de Braak *et al.* (2002) quienes encontraron gran cantidad de hemocitos granulosos en los tejidos de animales infectados con WSSV. Otra característica observada en este estudio fue el incremento desde las 48 hrs de infección. Jiravanichpaisal *et al.* (2001) encontraron una relación inversa entre el grado de infección y los hemocitos granulosos, otorgándole a los hemocitos granulosos mayor resistencia al virus que las células que no tienen gránulos y que se requieren periodos más largos de infección para que sean destruidos por el virus. Por otra parte, Wang *et al.* (2000) reportaron que las células granulares en cultivo celular del órgano linfoide presentaron un menor porcentaje de infección al WSSV.

Otro factor importante relacionado a la respuesta inmunitaria es la presencia de esferoides en el órgano linfoide, los cuales se han asociado a muchos virus como por ejemplo el TSV, donde los esferoides están relacionados a la respuesta inmune celular del hospedero

(Hasson *et al.*, 1999). En su estudio las características histológicas de los animales infectados con TSV incluyeron un órgano linfoide hipertrofiado resultado de la proliferación de los esferoides (Hasson *et al.*, 1999). Khanobdee *et al.* (2002) encontraron cambios patológicos en células del órgano linfoide en las primeras horas de infección con YHV. En la familia resistente F1, el índice de esferoides se incrementó a las 24 hrs de post-infección observándose en ella muchos esferoides de tipo A, al contrario de la familia susceptible F12 en la cual el incremento fue mínimo presentando además muchos esferoides de tipo B. El tipo de esferoides A ha sido asociado a una infección ínfima casi indetectable o una eliminación del virus por mecanismos aún desconocidos (Hasson *et al.*, 1999). Los esferoides de tipo B han sido encontrados en los niveles más altos de infección. Hasson *et al.* (1999) sugieren que este tipo de esferoides está relacionado con replicación viral en el órgano linfoide, ellos muestran una mayor prevalencia viral y por consiguiente una mayor destrucción celular de los esferoides de tipo B. A las 72 hrs de post-infección cuando se inicia la mortalidad, los supervivientes de la familia F1 presentaron esferoides de tipo B. Sin embargo, otras herramientas de diagnóstico son necesarias para corroborar la presencia o ausencia del virus del WSSV en los esferoides de tipo B. Un mayor tiempo de infección es necesario para la formación de esferoides de tipo C, los cuales aparecieron en nuestro estudio al 3^{er} día de infección (en animales supervivientes). Una ausencia viral en los esferoides de tipo C podría demostrar que los esferoides juegan un importante rol en la eliminación del patógeno como lo reportó Hasson *et al.* (1999) para TSV. Por otra parte no hay que olvidar que el órgano linfoide es el sitio donde se ha detectado la presencia de fagocitosis de partículas virales del WSSV (Rodríguez, en preparación) y que posiblemente esta fagocitosis sea realizada por hemocitos hialinos. Por lo tanto no se podría descartar que el incremento de los esferoides a las 24 hrs en la familia resistente F1 esté relacionado con la caída de

hemocitos hialinos en circulación observada en esta familia. La presencia de esferoides en el órgano linfoide en los animales al día 0 puede estar relacionada con una respuesta inmune innata inducida por alguna infección viral previa, posiblemente el mismo WSSV.

Un parámetro adicional que se evaluó en familias resistentes y susceptibles fue la concentración de proteínas plasmáticas (este parámetro se tomó como indicador de buena salud). La concentración de proteínas plasmáticas fue baja tanto en las familias susceptibles como en las resistentes, observándose un incremento a las 24 hrs en una familia susceptible y en dos familias resistentes. Este incremento podría estar relacionado al intento de los animales de responder al desafío incrementando la capacidad microbicida del plasma. Al respecto Bachère (2002) ha reportado las cualidades microbicidas de la hemocianina, principal proteína del plasma de los crustáceos.

Resumiendo la información obtenida de las familias resistentes podemos decir que la familia F11, en el tiempo 0 presentó bajo contenido de hemocitos saludables en circulación, en especial hialinos, mostrando por este motivo un alto porcentaje de atípicos, sin embargo el número de atípicos siempre fue bajo. Por otra parte esta familia mostró la capacidad de reaccionar con mucha rapidez al desafío microbiano, incrementando los hemocitos circulantes en especial los hialinos y semigranulosos, decreciendo el porcentaje de hemocitos atípicos. Esta familia tuvo además una mejor concentración de proteínas plasmáticas a las 24 hrs que en el tiempo 0. Como se recordará la F11 fue la única familia que reaccionó a la inmunoestimulación. Estos resultados sugieren dos tipos de comportamiento: 1) esta familia mantiene bajo niveles de proliferación en ausencia de alerta inmunitaria; o 2) el alto porcentaje de hemocitos atípicos podría explicarse por migración a los tejidos de los hemocitos saludables, es decir

que posee hemocitos muy activos. Esta familia, a diferencia de las otras, nunca perdió hemocitos hialinos circulantes. Varios autores han observado un incremento del porcentaje de hemocitos hialinos entre los picos de infección en animales de alta carga viral (Henning *et al.* 1999; Kim *et al.* 1999). En tanto que Montesdeoca (2001) y Sonnenholzner *et al.* (2002) observaron altos porcentajes de hemocitos hialinos en los animales que oponen resistencia al virus.

El hemograma y la histología de la familia F1 al tiempo 0 indican que los animales de esta familia, si tuvieron una infección previa, ésta fue muy leve. Antes de la infección la familia F1 tuvo bajo el número y porcentaje de hemocitos atípicos, bajo índice de piknosis-kariorrexis (PK) y bajo índice de esferoides (siendo estos en particular del tipo A). Ante la infección esta familia perdió hemocitos hialinos ganando atípicos, pero al igual que la F11 generó muchos semigranulosos, en los que se observó un cambio de pendiente a las 48 hrs, en tanto que mantuvo alto el porcentaje de granulosos en los supervivientes a las 72 hrs de post-infección. La F1 tuvo alto contenido de hemocitos totales indiferentemente del tiempo de infección. Por otra parte la familia F1 tuvo las mayores concentraciones de proteínas plasmáticas durante todo el muestreo.

Antes de iniciar la infección la familia resistente F22 fue similar a la F11 pero reaccionó de manera diferente a la infección a las 24 hrs. En ella se observó mayor porcentaje de hemocitos atípicos que en la F11. Además mantuvo alto el porcentaje de hemocitos semigranulosos desde las 24 hrs (contrariamente a lo observado en la F1 y F11) y ella nunca perdió hemocitos atípicos. De las 3 familias consideradas resistentes la F22 presentó la menor supervivencia en los 3 bioensayos.

En cuanto a las familias susceptibles F12 y F23, los resultados de hemogramas al tiempo 0 (alto número y porcentaje de hemocitos atípicos) sugieren una infección previa. Montesdeoca (2001) reportó que la concentración de hemocitos atípicos guarda relación con el nivel de infección con WSSV. Al respecto la familia F12 presentó un alto índice de PK y esferoides de los morfotipos A y B en el órgano linfoide antes de la infección experimental, confirmando la posible infección previa. Se ha reportado la presencia de esferoides en varias infecciones virales (Hasson *et al.*, 1999), de hecho la histología de los animales de la F12 mostraron una incipiente infección con WSSV. El hemograma mostró incremento de semigranulosos (en número y porcentaje) a las 24 hrs post-infección, pero el porcentaje de semigranulosos en estas familias fue el más bajo. El contenido de semigranulosos se incrementó en los supervivientes desde las 48 hrs, en tanto que la histología realizada en la familia F12 mostró bajos niveles de migración y encapsulación, sugiriendo en estos animales baja activación celular. La familia susceptible F3 tuvo un comportamiento hemocitario similar a la F1 pero se diferenció por el bajo contenido de hemocitos hialinos y el alto contenido de hemocitos atípicos. Además, esta familia tuvo la menor concentración de proteínas plasmáticas durante el muestreo.

Nuestros resultados sugieren que en las familias resistentes existe una constante reacción de los hemocitos, en mecanismos de infiltración, encapsulación y formación de esferoides. En lo fundamental la respuesta celular (hemograma y migración) de las familias resistentes fue muy similar a la reportada por Sonnenholzner *et al.* (2002) para animales desafiados bajo condiciones de hipertermia. Siendo esenciales tanto la cantidad de hemocitos circulantes con los que un individuo se enfrenta a un agente patógeno de la índole del WSSV, como la intensidad de respuesta al primer estímulo, proliferando y manteniendo cantidades suficientes de hemocitos activos en circulación (en particular los

hemocitos hialinos y semigranulosos) y en los tejidos, para cumplir al mismo tiempo con varios procesos de defensa.

A continuación se presenta la Tabla 19 que resume la respuesta inmunitaria celular de los camarones y otros crustáceos reportados por la literatura y las observaciones del hemograma y órgano linfoide en las familias resistentes F11 y F1 y en las familias susceptibles F12 y F23.

Tabla 19: Comparaciones del comportamiento hemocitario circulante e infiltrante entre 4 familias, 2 resistentes y 2 susceptibles al WSSV y la información bibliográfica disponible para peneidos

	Hemocitos Totales (NTH)	Hialinos (HH)	Semigranulosos (HSG)	Granulosos (HG)	Esferoides
Procesos inmunitarios reportados por la literatura para Peneidos	Proliferación y migración: Modificación n° HC	Fagocitosis	Encapsulación Nódulos Fagocitosis Actividad PO Péptidos antimicrobianos	Encapsulación Nódulos Fagocitosis Actividad PO Péptidos antimicrobianos	OL: filtro PV Esferoides
Bajo condiciones de WSSV	Incremento a 24 hrs PI	Fagocitosis de PV en OL Fagocitosis de células infectadas Modificación n° HC	Encapsulación de células picnóticas Infiltración en tejidos diana del virus Modificación n° HC	Modificación del n° HC	Presencia de esferoides Sitio de fagocitosis del WSSV
Familia resistente (F11)	Incremento de HC luego de la infección Bajo n° HA	No pierde HH circulantes a las 24 hrs de infección	Fuerte incremento % HSG A 24 hrs.PI. Infiltrantes a 0 hrs?	Incremento % de HG en sobrevivientes del 3 ^{er} día	
Familia resistente (F1)	Al tiempo 0, alto contenido de HC. Bajo n° y % de HA	Alto contenido de HH al tiempo 0 Fuerte pérdida a 24 hrs PI	Fuerte incremento % HSG a 24 hrs. PI. Fuerte infiltración	Incremento % HG en supervivientes del 3 ^{er} día	Esferoides de tipo A y B primeras 48 hrs PI
Familia susceptible (F12)	Alto n° y % de HA al tiempo 0	Pérdida de HH las primeras 24 horas	Bajo % SHG 24 hrs PI Baja infiltración		Esferoides de tipo B primeras 24 hrs PI
Familia susceptible (F23)	Alto % HA al tiempo 0	Pérdida de HH desde las 48 hrs	Bajo % HSG 24 hrs PI		

PI: Post-Infección; OL: Órganos Linfoide; PV: Partículas virales; HC: Hemocitos circulantes; HA: Hemocitos Atípicos

CONCLUSIONES

1. Se encontró variabilidad en la susceptibilidad de las familias al WSSV, ratificando la utilidad de la selección genética a nivel familiar.
2. El 63% de las familias (17/27) tuvieron supervivencias del 0% al desafío con WSSV, es decir que el 63% de las larvas que se siembran estarían destinadas a no sobrevivir a un brote del WSSV en los estanques.
3. La supervivencia de las familias resistentes al WSSV puede disminuir si cohabitan con animales de mayor infectividad (sensibles) durante la prueba de desafío al virus. Las sensibles se comportarían como fuente de reinfección.
4. Familias consideradas potenciales resistentes (resistentes hasta el 6^{to} día) no soportaron una reinfección que pudo estar ocasionada por un segundo rebrote viral.
5. El efecto de la inmunoestimulación es de carácter selectivo, es decir que el efecto se observó sólo en una familia, la misma que tuvo características de resistencia en el primer bioensayo.
6. El nivel de infección encontrado al tercer día produjo cerca del 50% de la mortalidad para familias susceptibles.

7. Las familias resistentes prolongan el proceso de infección durante las primeras 24 hrs y pueden sobrevivir con mayores cargas virales a las 72 hrs de infección (mayor periodo de incubación).
8. Las familias sensibles alcanzan altos índices de infección los primeros días y mueren rápidamente.
9. Un nivel alto de piknosis-kariorrexis (P-K) en animales supervivientes al tercer día de infección indicaría que el sistema inmune desarrolla una buena estrategia de resistencia al virus. Esto fue observado en la familia resistente F1, con un mayor nivel de PK que la familia susceptible F12.
10. En familias que presentan resistencia al WSSV se incrementó el índice de formación de esferoides (mecanismo implicado en la eliminación de partículas virales), en particular los del morfotipo A.
11. Los animales de las familias resistentes tuvieron un alto número de hemocitos totales al inicio (F1) o éste se incrementó al primer contacto con el virus (F11).
12. Nuestros resultados demuestran que una familia resistente incrementó los hemocitos semigranulosos en las primeras horas de infección, mantuvo altos índices de infiltración y aumentó el proceso de encapsulación en los tejidos de los animales supervivientes al tercer día de infección con WSSV.

13. Una familia susceptible incrementa la cantidad de hemocitos semigranulosos en las primeras horas de infección y presenta un índice bajo de migración hemocitaria y encapsulación en los tejidos de animales supervivientes al tercer día de infección. Sugiriendo que en su susceptibilidad estaría también involucrado un bajo nivel de activación celular.
14. La disminución de los hemocitos hialinos, en porcentaje, estuvo relacionada con el comienzo de la infección y el incremento del número de hemocitos atípicos.
15. Al tiempo 0, el número de hemocitos atípicos, el índice de PK y la formación de esferoides de los morfotipos A y B (en el órgano linfoide) fueron más altos en la familia susceptible que para la familia resistente; indicando una posible infección previa.
16. Las familias resistentes al WSSV fueron inmunitariamente eficaces y por lo tanto podrían ser a la vez resistentes a otros patógenos.
17. Una respuesta celular intensa e inmediata sería necesaria para combatir al WSSV. Se encontró que la mayor supervivencia de las familias resistentes estaría asociada con la respuesta inmune celular del hospedero, lo que significa mantener en circulación cantidades suficientes de hemocitos activos que estén involucrados en infiltración hemocítica, encapsulación y formación de esferoides en el órgano linfoide.
18. Nuestros resultados señalan que el hemograma es una herramienta útil, rápida y de fácil acceso para evaluar el estado inmunitario del camarón y establecer en que momento

el animal se encuentra inmunodeprimido. Esta información es necesaria para poder modular el sistema inmunitario del camarón.

RECOMENDACIONES

1. Sembrar familias resistentes en las piscinas de producción para disminuir la mortalidad por cohabitación.
2. Estudiar la utilidad del inmunoestimulante para incrementar las supervivencias de las familias resistentes.
3. Utilizar el hemograma como una herramienta práctica de diagnóstico inmunitario, en sistemas de cultivo.
4. Realizar más estudios para entender las interacciones camarón/WSSV.
5. Utilizar técnicas que muestren evidencia de ADN fragmentado y/o cromatina condensada como característica de la presencia de células apoptóticas en los tejidos infectados con WSSV. Esto sería necesario para determinar si el nivel alto de células picnóticas en animales supervivientes a una infección está relacionado con este mecanismo de suicidio celular.
6. Analizar el nivel de activación celular en familias resistentes y susceptibles mediante detección del O_2^- , cuantificación de la actividad PO y/o cuantificación de proteínas inmunitarias celulares.

BIBLIOGRAFÍA

- Alday, V. 1999. Diagnóstico y prevención de la enfermedad del punto blanco. *Mundo Acuícola* 5(1):3-6.
- Anggraeni, M.S. y L. Owens. 2000. The haemocytic origin of lymphoid organ spheroid cells in the penaeid prawn *Penaeus monodon*. *Diseases of Aquatic Organisms* 40:85-92.
- Argue, B., S. Arce, J. Lotz, y S. Moss. 1999. Heretability for resistance to Taura syndrome virus in specific pathogen free *Litopenaeus vannamei*. *Página 28 in World Aquaculture '99 Book of Abstracts, 26 April-2 May 1999, Sidney, Australia. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, EE.UU.*
- Bachère, E. 2000. Shrimp immunity and disease control. *Aquaculture* 191:3-11.
- Bachère, E., E. Mialhe, y J. Rodríguez. 1995. Identification of defense effectors in the haemolymph of Crustacean with particular reference to the shrimp *Penaeus japonicus* (Bate): prospects and application. *Fish and Shellfish Immunology* 5:597-612.
- Bachère, E., D. Destoumieux, y P. Bulet. 2000. Penaeidins, antimicrobial peptides of shrimp: a comparison with other effectors of innate immunity. *Aquaculture* 191:71-88.
- Bayot, B., X. Ochoa, Z. Cisneros, I. Apolo, T. Vera, L. Van Biesen, J. Calderón y M. Cornejo. 2002. Sistema de alerta para la acuicultura del camarón. *El Mundo Acuícola* 8(1):9-13
- Bell, T., y D. Lightner. 1988. *A Handbook of Normal Penaeid Shrimp Histology. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, EE.UU.*

- Berger, C. 2000. Aportes de la bio-tecnología a la alimentación y a la inmunoestimulación de camarones peneidos. Páginas 102-110 in L.E. Cruz-Suarez, D. Ricque-Marie, M. Tapia-Salazar, M.A. Olvera-Noboa, R. Civera-Cerecedo, (editores). Avances en Nutrición Acuícola, Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola, Mérida-Yucatán, México.
- Bonami, J.R., D.V. Lightner, R.M. Redman, y B.T. Poulos. 1992. Partial characterization of a togavirus (LOVV) associated with histopathological changes of the lymphoid organ of penaeid shrimp. *Diseases of Aquatic Organisms* 14:145-152.
- Calderón J., B. Bayot, I. Betancourt, y V. Alday de Graindorge. 1999. Monitoreo del virus de la mancha blanca en Ecuador. *El Mundo Acuícola* 5:211-214.
- Cámara Nacional de Acuicultura. 2002. Análisis general de las exportaciones de camarón. *Acuicultura del Ecuador* 46:52-54.
- Chang, C.-F., M.-S. Su, H.-Y. Chen, C.-F. Lo, G.-H. Kou y I.-C. Liao. 1999. Effect of dietary β -1,3-glucan on resistance to white spot syndrome virus (WSSV) in postlarval and juvenil *Penaeus monodon*. *Diseases of Aquatic Organisms* 36:163-168.
- Chang, C.-F., H.-Y. Chen, M.S. Su, y 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.
- Chen, Z.J., C.S. Wang, y H.H. Shih. 2002. An assay for quantification of white spot syndrome virus using a capture ELISA. *Journal of Fish Diseases* 25:249-251.
- Corbel, V., Zuprizal, Z. Shi, C. Huang, Sumartono, J.-M. Arcier, y J.-R. Bonami. 2001. Experimental infection of European crustaceans with white spot syndrome virus (WSSV). *Journal of Fish Diseases* 24:377-382.

- Dalmo, R.A., B. Martinsen, T.E. Horsberg, A. Ramstad, C. Syvertsen, R. Seljelid, y K. Ingebrigtsen. 1998. Prophylactic effect of $\beta(1,3)$ -D-glucan (laminaran) against experimental *Aeromonas salmonicida* and *Vibrio salmonicida* infections. *Journal of Fish Diseases* 21:459-462.
- Destoumieux, D., P. Bulet, D. Loew, A. Van Dorselaer, J. Rodríguez, y E. Bachère. 1997. Penaeidins, a new family of antimicrobial peptides isolated from the shrimp *Penaeus vannamei* (Decapoda). *The Journal of Biological Chemistry* 272(45):28398-28406.
- Destoumieux, D., M. Muñoz, C. Cosseau, J. Rodríguez, P. Bulet, M. Comps, y E. Bachère. 2000. Penaeidins, antimicrobial peptides with chitin-binding activity, are produced and stored in shrimp granulocytes and released after microbial challenge. *Journal of Cell Science* 113:461-469.
- Destoumieux-Garzón, D., D. Saulnier, J. Garnier, C. Jouffrey, P. Bulet, y E. Bachère. 2001. Crustacean immunity: antifungal peptides are generated from the C-terminus of shrimp hemocyanin in response to microbial challenge. *The Journal of Biological Chemistry* 276:47070-47077.
- Djangmah, J.S. 1970. The effects of feeding and starvation on copper in the blood and hepatopancreas, and on blood proteins of *Crangon vulgaris* (Fabricius). *Comparative Biochemistry and Physiology* 32:709-731.
- Durand, S., D.V. Lightner, R.M. Redman, y J.-R. Bonami. 1997. Ultrastructure and morphogenesis of White Spot Syndrome Baculovirus (WSSV). *Diseases of Aquatic Organisms* 29:205-211.

- Duvic, B., y K. Söderhäll. 1990. Purification and characterization of a β -1,3-Glucan binding protein from plasma of the Crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *The Journal of Biological Chemistry* 265(16):9327-9332.
- Flegel, T.W. 1997. Special topic review, major viral diseases of the black tiger prawn *Penaeus monodon* in Thailand. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 13:433-442.
- Flegel, T.W. y T. Pasharawipas. 1998. Active viral accommodation: a new concept for Crustacean response to viral pathogens. Páginas 245-250 in T.W. Flegel (editor), *Advances in Shrimp Biotechnology*. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok, Tailandia.
- Granja. C., L. Aranguren., O. M. Vidal., L. Aragón, y M. Salazar. 2003. Does hyperthermia increase apoptosis in white spot syndrome virus (WSSV)-infected *Litopenaeus vannamei*? *Diseases of Aquatic Organisms* 54:73-78.
- Hasson, K., D.V. Lightner, L. Mohny, R. Redman, y B.L. White. 1999a. Role of lymphoid organ spheroids in chronic Taura syndrome virus (TSV) infections in *Penaeus vannamei*. *Diseases of Aquatic Organisms* 38:93-105.
- Hasson, K., D.V. Lightner, L. Mohny, R. Redman, B.T. Poulos, y B.L. White. 1999b. Taura Syndrome Virus (TSV) lesion development and the disease cycle in the Pacific white shrimp *Penaeus vannamei*. *Diseases of Aquatic Organisms* 36:81-93.
- Henning, O., T. Itami, M. Maeda, M. Kondo, Y. Natsukari, y Y. Takahashi. 1998. Analyses of hemolymph immunoparameters in kuruma shrimp infected with penaeid rod-shaped DNA virus. *Fish Pathology* 33(4):389-393.
- Holmblad, T., y K. Söderhäll. 1999. Cell adhesion molecules and antioxidative enzymes in a crustacean, possible role in immunity. *Aquaculture* 172:111-123

- Hose, J.E., y G. Martin. 1989. Defense functions of granulocytes in the ridgeback prawn *Sicyonia ingentis*. *Journal of Invertebrate Pathology* 53:335-346.
- Itami, T., M. Asano, K. Tokushige, K. Kubono, A. Nakagawa, N. Takeno, H. Nishimura, M. Maeda, M. Kondo, y Y. Takahashi. 1998. Enhancement of disease resistance of kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, after oral administration of peptidoglycan derived from *Bifidobacterium thermophilum*. *Aquaculture* 164:272-288.
- Jiménez, R., R. Barniol, L. de Barniol, M. Machuca, y X. Romero. 2000. Viral-like particles associated with cuticular epithelium necrosis in cultured *Litopenaeus vannamei* (Decapoda: Crustacea) in Ecuador. *Aquaculture Research* 31:519-528.
- Jiravanichpaisal, P., E. Bangyeekhun, K. Söderhäll, y I. Söderhäll. 2001. Experimental infection of white spot syndrome virus in freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *Diseases of Aquatic Organisms* 47:151-157.
- Johansson, M.W., y K. Söderhäll. 1989. Cellular immunity in Crustaceans and the proPO system. *Parasitology Today* 5(6):171-176.
- Johansson, M.W., P. Keyser, K. Sritunyalucksana, y K. Söderhäll. 2000. Crustacean haemocytes and haematopoiesis. *Aquaculture* 191:45-52.
- Johnson, P.T. 1987. A review of fixed phagocytic and pinocytotic cells of decapod crustaceans, with remarks on hemocytes. *Developmental and Comparative Immunology* 11:679-704.
- Jory, D.E., y H.M. Dixon. 1999. Shrimp white spot virus in the hemisphere. *World Aquaculture* 25:83-91.
- Khanobdee, K., C. Soowannayan, T.W. Flegel, S. Ubol, y 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 Organisms* 48:79-90.
- Kim, Y.-J., W.-C. Choi, H.-R. Kim, S.-J. Jung, y M.-J. Oh. 1999. Changes in *Penaeus chinensis* haemocytes during white spot baculovirus (WSBV) infections. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 19(5):213-215.
- Le Moullac, G., L.P. de Laborie, D. Saulnier, C. Goarant, y M. Dehasque. 1998. Principles and problems involved in the evaluation of immunostimulants on juvenile shrimp. Páginas 1-12 in R.C. Cerecedo, B.M. Claudia J. Perez Estrada, L. E. Cruz Suarez and D. Ricque Marie (editores), *Avances de Nutrición Acuícola. Memorias del IV Simposium International de Nutrition Acuícola*, La Paz, B.S.C., México.
- Lightner, D.V. 1996. *Handbook of Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Penaeid Shrimp*. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, EE.UU.
- Lightner, D.V. 1999. The penaeid shrimp viruses TSV, IHHNV, WSSV, and YHV: current status in the Americas, available diagnostic methods, and management strategies. *Journal of Applied Aquaculture* 9:27-52.
- Lightner, D.V., K.W. Hasson, B.L. White, y R.M. Redman. 1998. Experimental infection of Western hemisphere penaeid shrimp with Asian white spot syndrome virus and Asian yellow head virus. *Aquatic Animal Health* 10:271-281.
- Lo, C.F., C.H. Ho, C.H. Chen, F.K. Liu, Y.L. Chiu, P.Y. Yen, S.E. Peng, H.C. Hsu, H.C. Liu, C.F. Chang, M.S. Su, C.H. Wang, y G.H. Kou. 1997. Detection and tissue distribution of white spot syndrome baculovirus (WSBV) in captured brooders of *Penaeus monodon* with a special emphasis on reproductive organs. *Diseases of Aquatic Organisms* 30:53-72.

- Lotz, J.M. 1997. Effect of host size on virulence of Taura virus to the marine shrimp *Penaeus vannamei* (Crustacea: Penaeidae). *Diseases of Aquatic Organisms* 30:45-51
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough., A.L. Farr, y R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biology and Chemistry* 193:265-275.
- Martin, G., y B. Graves. 1985. Fine structure and classification of shrimp hemocytes. *Journal of Morphology* 185:339-348.
- Martin, G., J.E. Hose, S. Omori, C. Chong, T. Hoodbhoy, y N. Mckrell. 1991. Localization and roles of coagulogen and transglutaminase in hemolymph coagulation in decapod crustaceans. *Comparative Biochemistry and Physiology* 100B(3):517-522.
- Martin, G., J.E. Hose, G. Minka, y S. Rosenberg. 1996. Clearance of bacteria injected into the hemolymph of the ridgeback prawn, *Sicyonia ingentis* (Crustacea: Decapoda): role of the hematopoietic tissue. *Journal of Morphology* 227:227-233.
- Martin, G., J. Kay, D. Poole, y C. Poole. 1998. In vitro nodule formation in the ridgeback prawn, *Syciona ingentis*, and the American lobster, *Homarus americanus*. *Invertebrate Zoology* 117:155-168.
- Molina, C. 2002. Efecto de la suplementación de glucanos y vitaminas C y E en la producción de camarón *Litopenaeus vannamei*. Boletín Informativo No.61, Fundación CENAIM-ESPOL, Guayaquil, Ecuador.
- Momoyama, K., M. Hiraoka., H. Nakano, H. Koube, K Inouye, y N. Oseko. 1994. Mass mortalities of cultured kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, in Japan in 1993: histopathological study. *Fish Pathology* 29:141-148.
- Montesdeoca, M. 2001. Parámetros inmunitarios en camarones juveniles *Litopenaeus vannamei*, en piscinas camaroneras infectadas con White Spot Syndrome Virus

- (WSSV). Tesis de grado, Universidad Técnica de Manabí, Escuela de Acuicultura, Portoviejo, Ecuador.
- Moss, S.M., B.J. Argue, F.L. Castille, S.M. Arce, y J.M. Lotz. 2001. Family survival of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* to Taura syndrome virus in field and laboratories challenges. Proceedings of the World Aquaculture 2001 Conference, Orlando, World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, EE.UU.
- Muñoz, M. 1996. Desarrollo y optimización de ensayos para evaluar el estado inmunitario del camarón *Penaeus vannamei*. Tesis de Grado, Escuela Superior Politécnica del Litoral, Guayaquil, Ecuador.
- Muñoz, M., R. Cedeño, J. Rodríguez, W.P.W. van der Knaap, E. Mialhe, y E. Bachère. 2000. Measurement of reactive oxygen intermediate production in haemocytes of the penaeid shrimp, *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* 191:89-107.
- Muñoz, M., F. Vandebulcke, D. Saulnier, y E. Bachère. 2002. Expression and distribution of penaeidin antimicrobial peptides are regulated by haemocyte reactions in microbial challenge shrimp. *European Journal of Biochemistry* 269:2678-2689.
- Napi, J. 1977. Comparative ultrastructural studies of cellular immune reactions and tumorigenesis in *Drosophila*. Páginas 155-188 in L.A. Bulla, Jr., y T.C. Cheng (editores), *Comparative Pathology*, Volume 3, Plenum Press, New York, New York, EE.UU.
- Otero, V. 2001. Evaluación de los β -Glucanos como inmunoestimulantes del sistema de defensa del camarón blanco *Penaeus vannamei* (Boone,1931). Tesis de grado, Universidad Laica "Eloy Alfaro", Portoviejo, Manabí, Ecuador.
- Pan, J., A. Kurosky, B. Xu, A.K.Chopra, D.H. Coppenhaver, I.P. Singh, y S. Baron. 2000. Broad antiviral activity in tissues of crustaceans. *Antiviral Research* 48:39-47.

- Pantoja, C.R., y 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.
- Pérez, F., L. Gómez, V. Otero, F. Volckaert, y J. Calderón. 2002. Supervivencia diferenciada de familias de *Litopenaeus vannamei* desafiadas con el virus de la mancha blanca. *El Mundo Acuícola* 8(1):25-29.
- Poinar, G.O., R.T. Hess, y J.J. Petersen. 1979. Immune responses of mosquitoes against *R. culiensifax* (Nematoda). *Journal of Nematology* 11:110-116.
- Pramod, R.B., K.V. Rajendran, S.J. Jung, y M.J. Oh. 2002. Experimental susceptibility of different life-stages of the giant freshwater prawn, *Machrobanchium rosenbergii* (de Man), to white spot syndrome virus (WSSV). *Journal of Fish Diseases* 25:201-207.
- Roch, P. 1999. Defense mechanisms and disease prevention in farmed marine invertebrates. *Aquaculture* 172:125-145.
- Rodríguez, J., y G. Le Moullac. 2000. State of the art of immunological tools and health control of penaeid shrimp. *Aquaculture* 191:109-119.
- Rodríguez, J., V. Boulo, E. Mialhe, y E. Bachère. 1995. Characterisation of shrimp haemocytes and plasma components by monoclonal antibodies. *Journal of Cell Science* 108:1048-1050.
- Rodríguez, J., B. Bayot., Y. Amano., F. Panchana., I. de Blas., V. Alday, y J. Calderón. 2003. White spot syndrome virus (WSSV) infection in cultured *Penaeus vannamei* (Boone) in Ecuador with emphasis on histopathology and ultraestructura. *Journal of Fish Diseases* (in press).

- Rojtinnakorn, J., I. Hirono, T. Itami, Y. Takahashi, y T. Aoki. 2002. Gene expression in haemocytes of Kuruma prawn, *Penaeus japonicus*, in response to infection with WSSV by EST approach. *Fish and Shellfish Immunology* 13(1):69-83.
- Sahul, H.A.S., M.X. Charles, y M. Anilkmar. 2000. Tolerance of *Macrobrachium rosenbergii* to white spot syndrome virus. *Aquaculture* 183:207-213.
- Sahul H.A.S., K. Yoganandhan, S. Sathish, M. Rasheed, V. Murugan, y K. Jayaraman. 2001. White spot syndrome virus (WSSV) in two species of freshwater crabs (*Paratelphusa hydrodomous* and *P. pulvinata*). *Aquaculture* 201:179-186.
- Salt, G. 1963. The defense reactions of insects of metazoan parasites. *Parasitology* 53:527-642.
- Smith, V.J., y K. Söderhäll. 1983. Induction of degranulation and lysis of haemocytes in the freshwater crayfish, *Astacus astacus*, by components of the prophenoloxidase activating system *in vitro*. *Cell Tissue Research* 233:295-303.
- Söderhäll, K., y V. Smith. 1983. Separation of the haemocyte populations of *Carcinus maenas* and other marine decapods, and prophenoloxidase distribution. *Developmental and Comparative Immunology* 7:229-239.
- Söderhäll, K., y L. Cerenius. 1992. Crustacean immunity. *Annual Review of Fish Diseases* 1:3-23
- Song, Y.L., y Y.T. Hsieh. 1994. Immunostimulation of tiger shrimp (*Penaeus monodon*) hemocytes for generation of microbicidal substances: analysis of reactive oxygen species. *Developmental Comparative Immunology* 18:201-209.
- Sonnenholzner, S., J. Rodríguez, F. Pérez, I. Betancourt, F. Echeverría, y J. Calderón. 2002. 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.
- Soon, L.T., K.L. Lee, M. Shariff, M.D. Hassan, y A.R. Omar. 2001. Quantitative analysis of an experimental white spot syndrome virus (WSSV) infection in *Penaeus monodon* Fabricius using competitive polymerase chain reaction. Journal of Fish Diseases 24:315-323.
- Sugumaran, M. 1996. Roles of insect cuticle in host defense reactions. Páginas 355-374 in K. Söderhäll, I. Sadaaki, y G. Vasta (editores), New Directions in Invertebrate Immunology, SOS Publications, Fair Haven, New York, EE.UU.
- Sung, H.H., G.H. Kou, y Y.L. Song. 1994. Vibriosis resistance induced by glucan treatment in tiger shrimp (*Penaeus monodon*). Fish Pathology 29:11-17.
- Takahashi, Y., T. Itami, M. Kondo, M. Maeda, R. Fujii, S. Tomonaga, K. Supamattaya, y S. Boonyaratpalin. 1994. Electron microscopic evidence of bacilliform virus infection in kuruma shrimp (*Penaeus japonicus*). Fish Pathology 29(2):121-125.
- Tang, K., y D.V. Lightner. 2000. Quantification of white spot syndrome virus DNA through a competitive polymerase chain reaction. Aquaculture 189:11-21.
- Tang, K., S. Durand, B. White, R. Redman, R. Pantoja, y D.V. Lightner. 2000. Postlarvae and juveniles of a selected line of *Penaeus stylirostris* are resistant to infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus infection. Aquaculture 190:203-210.
- Terwilloger, N.B., y K. Dumler. 2001. Ontogeny of decapod crustacea hemocyanin: effects of temperature and nutrition. The Journal of Experimental Biology 204:1013-1020.

- Tsing, A. 1987. Recherches sur les hémocytes et l'immunité chez le crustacé *Penaeus japonicus* (Bate 1991). Thèse de Doctorat, Université des Sciences et Techniques du Languedoc, Montpellier, Francia.
- Van de Braak, K., M.H.A. Botterblom, W. Liu, N. Taverne, W.P.W. Van der Knaap, y J.H.W.M. Rombout. 2002a. The role of the haematopoietic tissue in haemocyte production and maturation in the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Fish and Shellfish Immunology* 12:253-272.
- Van de Braak, K., M.H.A. Botterblom, E.A. Huisman, J.H.W.M. Rombout, y W.P.W. Van der Knaap. 2002b. Preliminary study on haemocyte response to white spot syndrome virus infection in black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Diseases of Aquatic Organisms* 51:149-155.
- Vargas-Albores, F. 1995. Sistema de defensa del camarón café (*Penaeus californiensis*). *Ciencia* 46:33-45.
- Vargas-Albores, F., y G. Yepiz-Plascencia. 2000. Beta glucan binding protein and its role in shrimp immune response. *Aquaculture* 191:13-21.
- Vidal, O., C. Granja, y F. Aranguren. 2001. A profound effect of hyperthermia on survival of *Litopenaeus vannamei* juveniles infected with White Spot Syndrome Virus. *Journal of the World Aquaculture Society* 32(4):364-372.
- Wang, C.-H., H.-N. Yang, C.-Y. Tang, C.-H. Lu, G.-H. Kou, y C.-F. Lo. 2000. Ultrastructure of white spot syndrome virus development in primary lymphoid organ cell cultures. *Diseases of Aquatic Organisms* 41:91-104.
- Wang C.S., K.F.J. Tang., G.H. Kou., y S.N. Chen. 1997. Light and electron microscopic evidence of white spot disease in the giant tiger shrimp, *Penaeus monodon*

- (Fabricius), and the kuruma shrimp, *Penaeus japonicus* (Bate), cultured in Taiwan. *Journal of Fish Diseases* 20: 323-331.
- Wang, R., M. Liang, M. Hall, y K. Söderhäll. 2001. A transglutaminase involved in the coagulation system of the freshwater crayfish, *Pacifastacus leniusculus*. Tissue localization and cDNA cloning. *Fish and Shellfish Immunology* 11:623-637.
- Wang, Y.T., W. Liu, J.N. Seah, C.S. Lam, J.H. Xiang, V. Korzh, V., y J. Kwang. 2002. White Spot Syndrome Virus (WSSV) infects specific hemocytes of the shrimp *Penaeus merguensis*. *Diseases of Aquatic Organisms* 52:249-259.
- White, B.L., P.J. Schofield, B.T. Poulus, y D.V. Lightner. 2002. A laboratory challenge method for estimating Taura Syndrome Virus resistance in selected lines of pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Journal of the World Aquaculture Society* 33(3):341-348.
- Wu, J.L., A. Namikoshi., T. Nishizawa., K. Mushiake., K. Teruya., y K. Muroga. 2001. Effects of shrimp density on transmission of penaeid acute viremia in *Penaeus japonicus* by cannibalism and the waterborne route. *Diseases of Aquatic Organisms* 47:129-135.

ANEXO I

Protocolo de manejo de larvicultura de la Fundación CENAIM-ESPOL

Día	Estadio	Vol. (L)	Recam. %	Malla (µm)	Algas (10 ³) ml ⁻¹ Thalassiosira/chaetoceros Chaetoceros/tetraselmis*	Probioticos 10 ¹⁰ mL/tq	EDTA 20 ppm g/tq	Treflan ***** mL/tq	Espirulina g/millón/ larva	LHF 1 mL/millón/ larva	Seco g/millón/ larva	Artemia naup.art/ larva (enr) 100%*	Rotíferos rot/mL 50%
	N5	15			80/20	1,5	0,3	0,0015					
1	Z1	25			120	2,5	0,5	0,0025	12	10			10
2	Z2	35			160	3,5	0,7	0,0035	12	17	10		10
3	Z3	40			200	4,0	0,8	0,004	14	20	11	10	15
4	Z3-M1	45			80/80*	4,5	0,9	0,0045	14	23	13	12	20
5	M1	50			60	5,0	1,0	0,005	16	28	14	14	25
6	M2	50	30%	300	60 "	5,0	1,0	0,005	16	35	20	19	27
7	M3	50	30%	300	60 "	5,0	1,0	0,005	18	45	23	24	30
8	M3-PL1	50	30%	400	60 "	5,0	1,0	0,005	18		29	17*	33
9	PL1	50	30%	400	60 "	5,0	1,0	0,005	20		34	20	33
10	PL2	50	30%	400	Navicula/Amphora "	5,0	1,0	0,005	20		44	25	35
11	PL3	50	40%	500	60 "	5,0	1,0	0,005			64	30	
12	PL4	50	40%	500	60 "	5,0	1,0	0,005			76	35	
13	PL5	50	40%	500	60 "	5,0	1,0	0,005			88	40	
14	PL6	50	40%	500	.60 "	5,0	1,0	0,005			100	45	
15	PL7	50	40%	500	60 "	5,0	1,0	0,005			112	50	
16	PL8	50	40%	500	60 "	5,0	1,0	0,005			124	55	
17	PL9	50	40%	500	60 "	5,0	1,0	0,005			136	60	
18	PL10	50	40%	500	60 "	5,0	1,0	0,005			150	65	

ANEXO II

Prueba de Normalidad Kolmogorov Smirnov y Homogeneidad de varianzas de Levene
Bioensayo I

Datos de supervivencia de todas las familias

Prueba de Normalidad		
Variable	Kolmogorov Smirnov	p
dia 15 (DC)	0.64481	0.01
dia 15(DT)	0.665	0.01

Prueba de Levene para homogeneidad de varianza				
Variable	MS Efecto	MS error	F	p
Dia 15 DC	0.0162985	0.0011919	13.6743	0.000
Dia 15 DT	161.0672	15.20799	10.59096	0.000

DC: datos crudos; DT: datos transformados

Datos de las familias sobrevivientes

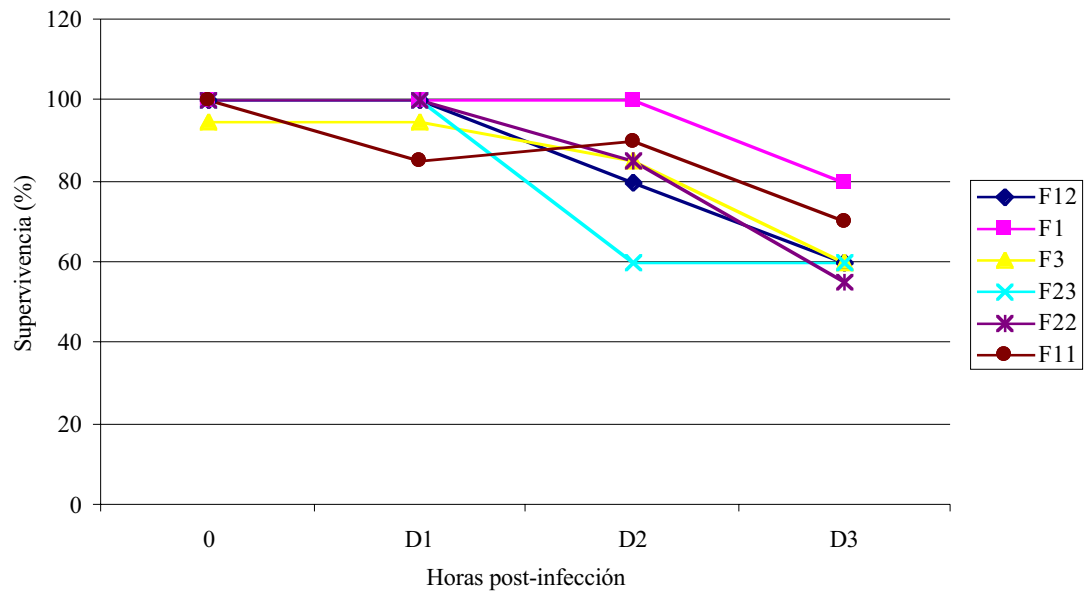
Prueba de Normalidad		
Variable	Kolmogorov Smirnov	p
dia 15 (DC)	0.5215	0.01
dia 15(DT)	0.5428	0.01

Prueba de Levene para homogeneidad de varianza				
Variable	MS Efecto	MS error	F	p
Dia 15 DC	2.921875	0.325	8.990385	0.0000
Dia 15 DT	178.5258	39.98461	4.464864	0.0001201

DC: datos crudos; DT: datos transformados

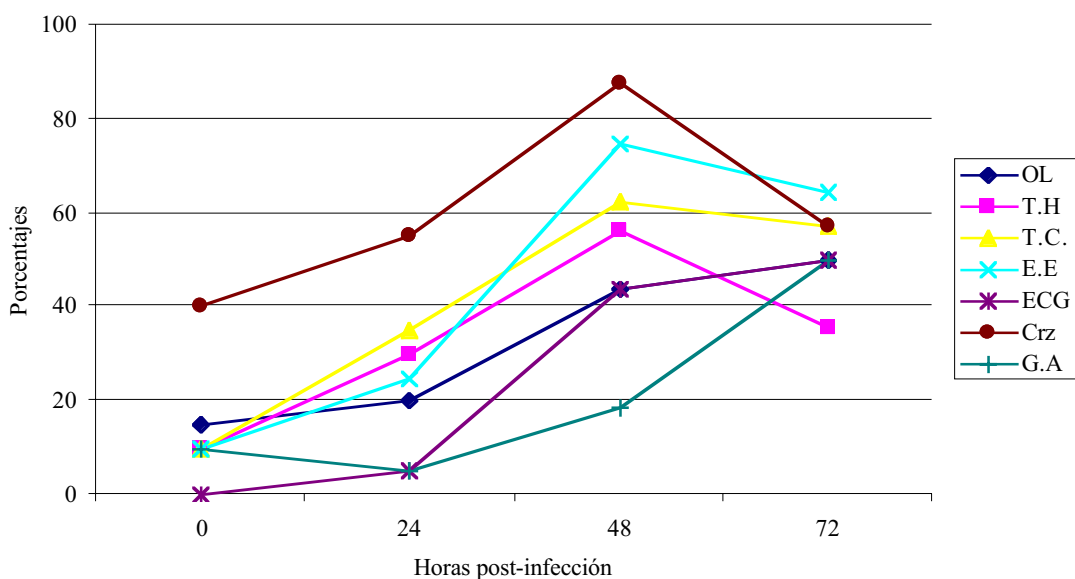
ANEXO III

Porcentaje de supervivencia en familias desafiadas con WSSV en el bioensayo III

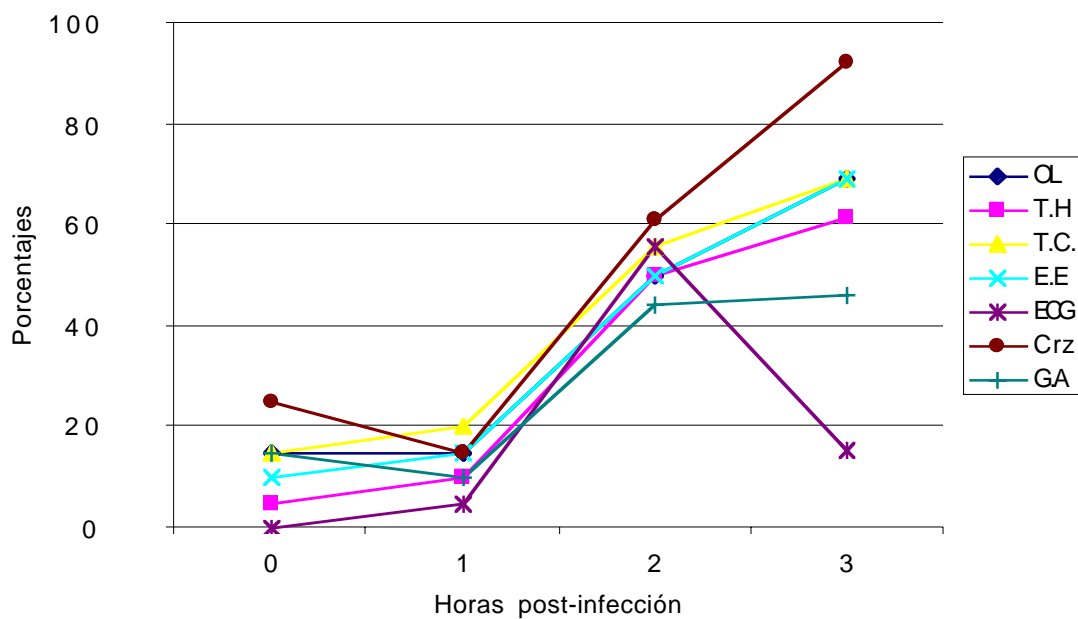


ANEXO IV

Presencia de células infectadas con WSSV en los tejidos del camaron blanco *L. vannamei* de la familia 12 (susceptible) durante el bioensayo III



Presencia de células infectadas con WSSV en los tejidos del camaron blanco *L. vannamei* de la familia 1(resistente) durante el bioensayo III.



ANEXO V

Indice patológicos e inmunitarios obtenidos en el bioensayo III

Familia 1 (resistente)	0 hrs	24 hrs	48 hrs	72 hrs
WSSV	0,28	0,35	2,31	2,63
Piknosis	0,03	0,04	0,08	0,15
Encapsulación	0,02	0,03	0,02	0,12
Infiltración	0,08	0,12	0,08	0,09
Esferoides	0,16	0,74	0,85	1,19
Esferoides Tipo A	0,37	0,50	0,33	0,00
Esferoides Tipo B	0,00	0,50	0,56	0,77

Familia 12(susceptible)	0 hrs	24 hrs	48 hrs	72 hrs
WSSV	0,28	0,79	2,21	1,89
Piknosis	0,08	0,02	0,09	0,13
Encapsulación	0,02	0,04	0,05	0,07
Infiltración	0,06	0,02	0,03	0,05
Esferoides	0,38	0,61	0,69	0,61
Esferoides Tipo A	0,35	0,00	0,06	0,00
Esferoides Tipo B	0,15	0,53	0,50	0,71

ANEXO VI

Prueba de Normalidad Kolmogorov Smirnov y de homogeneidad de varianza de Bartlett para cada una de las variables evaluadas en el bioensayo III (tiempo 0).

Prueba de Normalidad		
Variables	Kolmogorov-Smirnov	p
GP	0.13855	1
SP	0.06935	0.149
HP	0.10992	1
AP	0.19586	0.0043
GN	0.07123	0.3
SN	0.13651	1
HN	0.05838	1
AN	0.08706	1
NTH	0.05181	0.4474
PP	0.06701	1

Datos crudos

Prueba de Homogeneidad de varianzas			
Variable	Bartlett	df	p
GP	4.15808	5	0.5268982
SP	4.72901	5	0.4498558
HP	9.10375	5	0.1050302
AP	5.39936	5	0.3691303
GN	19.2576	5	0.0017245
SN	23.91103	5	0.0002266
HN	20.9845	5	0.0008176
AN	11.6602	5	0.0397769
NTH	18.1909	5	0.0027214
PP	2.99757	5	0.7003607

Datos transformados

Prueba de Homogeneidad de varianzas			
Variable	Bartlett	df	p
GN	3.410487	5	0.6369765
SN	2.866585	5	0.7205445
HN	3.546077	5	0.616432
AN	7.989992	5	0.1568225
NTH	5.275818	5	0.383176

Sombreados los resultados no significativos $p > 0,05$, presentaron homogeneidad de varianzas

PG: porcentaje granuloso
 PS: porcentaje semigranuloso
 PH: porcentaje hialinos
 PA: porcentaje atípicos

NG: número granuloso
 NS: número semigranuloso
 NH: número hialinos
 NA: número atípicos
 NTH: número total de hemocitos
 PP: proteínas plasmáticas

ANEXO VII

Prueba de Normalidad y homogeneidad de varianzas para cada uno de las variables evaluados en el bioensayo III. (tiempo 24).

Prueba de Normalidad		
Variables	Kolmogorov-Smirnov	p
GP	0.068	0.3857
SP	0.10595	1
HP	0.258	0.005
AP	0.0735	0.0977
GN	0.0659	0.3562
SN	0.1087	0.0069
HN	0.1374	0.054
AN	0.06617	1
NTH	0.1376	0.0446
PP	0.1388	1

Datos crudos

Prueba de Homogeneidad de varianzas			
Variable	F	df	p
GP	1.250251	5	0.3273559
SP	1.251898	5	0.3266819
HP	4.097193	5	0.0116629
AP	1.112195	5	0.3886178
GN	1.623838	5	0.2043806
SN	3.387733	5	0.0248413
HN	1.953589	5	0.135013
AN	1.030981	5	0.4292588
NTH	2.159561	5	0.1045652
PP	0.922474	5	0.4890741

Datos transformados

Prueba de Homogeneidad de varianzas			
Variable	F	df	p
HP	2.386318	5	0.079
SN	1.260048	5	0.323

Homogeneidad de varianzas no diferentes (sombreados $p > 0,050$)

ANEXO VIII

Prueba de Normalidad y homogeneidad de varianzas para cada uno de las variables evaluados en el bioensayo III.

Prueba de Normalidad		
Variables	Kolmogorov-Smirnov	p
GP	0.10103	0.05
SP	0.0424	0.16
HP	0.03407	0.596
AP	0.06156	0.101
GN	0.0319	0.1179
SN	0.09016	0.0114
HN	0.07167	0.1591
AN	0.10444	0.0023
NTH	0.03262	0.7517
PP	0.04061	0.5021

Datos crudos

Prueba de Homogeneidad de Varianzas			
Variable	Bartlett	gl	p
GP	33.476	23	0.073
SP	27.316	23	0.243
HP	31.875	23	0.103
AP	44.659	23	0.004
GN	79.187	23	0.000
SN	52.134	23	0.000
HN	75.029	23	0.000
AN	60.653	23	0.000
NTH	53.975	23	0.000
PP	34.585	23	0.057

Datos transformados

Prueba de Homogeneidad de Varianzas			
Variable	Bartlett	gl	p
AP	34.87173	23	0.0537
GN	29.02523	23	0.1796
SN	23.24179	23	0.4468
HN	22.34315	23	0.4997
AN	30.07906	23	0.1473
NTH	29.30812	23	0.1704

Homogeneidad de varianzas no diferentes (sombreados $p > 0,050$)

ANEXO IX

Resultados del análisis de varianza de cada una de las variables evaluadas en el modelo estadístico utilizado en el bioensayo III.

Fuente	gl	Hemocitos granulados (%)				Hemocitos hialinos (%)			
		SC	CM	F	p	SC	CM	F	p
Replica	3	257,53	85,84	1,178	0,3268	142	47,2	1,17	0,3296
Familia	5	965,2	193,04	2,545	0,737	583	116,6	1,3	0,3265
Replica*Familia	15	1137,99	75,86	1,041	0,4305	1376	91,7	2,3	0,0144
Tiempo	3	1820,45	606,81	8,330	0,0001	1238	412,7	10,2	0,0001
Tiempo*Familia	15	2482,38	165,49	2,272	0,0146	1079,6	71,9	1,8	0,0621
Residual	53	38611	72,85			2137	40,32		

Fuente	gl	Hemocitos semigranulosos (%)				Hemocitos atípicos (%)			
		SC	CM	F	p	SC	CM	F	p
Replica	3	11,5	3,83	0,018	0,99	0,068	0,023	0,836	0,4801
Familia	5	77,04	1541	9,550	0,0003	1,44	0,298	8,1	0,0007
Replica*Familia	15	24	161	0,748	0,7260	,54	0,036	1,3	0,2308
Tiempo	3	34,18	1140	5,280	0,0029	,95	0,32	11,5	0,0001
Tiempo*Familia	15	93	620	2,873	0,0024	1,25	0,08	3	0,0014
Residual	53	11440	215			1,45	0,03		

Fuente	gl	Proteínas Plasmáticas				Número total de Hemocitos			
		SC	CM	F	p	SC	CM	F	p
Replica	3	196	65,6	0,33	0,8	0,37	0,125	1,148	0,2303
Familia	5	5333	1067	4,3	0,0122	1,375	0,275	3,66	0,0229
Replica*Familia	15	3693	246,2	1,25	0,2623	1,125	0,075	0,89	0,579
Tiempo	3	240,9	80,2	0,41	0,7466	1,637	0,545	6,47	0,0008
Tiempo*Familia	15	3673	244,8	1,25	0,2669	1,772	0,118	1,4	0,1813
Residual	53	10384	195,9			4,468	0,084		

Fuente	gl	Hemocitos granulados				Hemocitos semigranulosos			
		SC	CM	F	p	SC	CM	F	p
Replica	3	1,14	0,38	2,8	0,0466	0,35	0,116	0,88	0,4533
Familia	5	3,24	0,64	5,6	0,0041	3,84	0,76	7,32	0,0012
Replica*Familia	15	1,728	0,115	0,85	0,6126	1,57	0,104	0,79	0,6743
Tiempo	3	2,99	0,965	7,18	0,0004	4,91	1,64	12,46	0,0001
Tiempo*Familia	15	2,57	0,17	1,27	0,2486	4,46	0,29	2,26	0,0149
Residual	53	7,12	0,13			6,96	0,13		

Fuente	gl	Número Hemocitos hialinos				Número Hemocitos atípicos			
		SC	CM	F	p	SC	CM	F	p
Replica	3	0,017	0,0058	1,58	0,2035	0,0005	0,0001	0,032	0,9923
Familia	5	0,049	0,098	3,13	0,0392	0,21	0,0423	9,442	0,0003
Replica*Familia	15	0,041	0,003	0,853	0,6173	0,067	0,0044	0,817	0,6546
Tiempo	3	0,07	0,0234	6,35	0,0009	0,103	0,0343	6,269	0,001
Tiempo*Familia	15	0,11	0,0073	1,99	0,0338	0,237	0,0158	2,89	0,0022
Residual	53	0,195	0,0036			0,29	0,0054		