SUPERVIVENCIA Y RESPUESTA INMUNE DE CAMARONES JUVENILES *L. VANNAMEI* DESAFIADOS POR VÍA ORAL A WSSV A DIFERENTES TEMPERATURAS

S. Sonnenholzner, J. Rodríguez, F. Pérez, I. Betancourt, F. Echeverría y J. Calderón
Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas - CENAIM

INTRODUCCIÓN

La producción de camarón en el Ecuador ha decrecido significativamente en los dos últimos años debido a mortalidades causadas por el Virus de la "Mancha Blanca" mejor conocido en el ámbito internacional como "white spot syndrome virus" (WSSV). La producción del año 2000 disminuyó en un 68% con respecto a la producción alcanzada en 1998. Supervivencias menores al 15% en promedio se siguen aún registrando en los estanques de cultivo. A pesar de todo, tanto supervivencias como producciones finales fueron mayores durante el verano del hemisferio sur entre los meses de enero y abril de los años 2000 y 2001. Esta estación está caracterizada por lluvias y temperatura ambiental más elevada. Sin embargo, históricamente las producciones han sido superiores en esta época. Por un lado, el incremento de la luminosidad estimula la productividad natural del estanque mejorando las condiciones nutricionales del camarón, y por otro lado el incremento de temperatura aceleraría el metabolismo del camarón traduciéndose ésto en crecimientos más rápidos. Se estima que la temperatura óptima para el desarrollo de camarón *L. vannamei* es de 25º a 30ºC (Wyban *et al.* 1995; Ponce-Pelafox *et al.* 1997). La temperatura del agua en el estanque de cultivo puede alcanzar valores entre 28º a 31ºC durante el invierno de diciembre a abril. Teichert-Coddington y otros (1994) reportaron diferencias de producción de camarón asociado a la época y temperatura ambiental en Honduras. La dinámica de ocurrencia de patógenos en sistemas acuáticos esta probablemente modulada por parámetros ambientales tales como la salinidad y temperatura (De la Peña *et al.* 1993; Bray *et al.* 1994; Jiménez *et al.* 2000). Jiménez y otros (2000) encontraron una correlación negativa entre la prevalencia del virus infeccioso cuticular epitelial (ICENV), lo que otros denominan "Sindrome de Taura" (TSV), y temperatura en granjas de cultivo de camarón en el Ecuador para el período 1994-1998, sugiriendo que el clima frío podría ser un factor de riesgo que precipite la ocurrencia de ICENV. Por otra parte, la literatura reporta modificaciones en la respuesta inmune de crustáceos provocadas por fluctuaciones de temperatura (Chisholm and Smith 1994; Vargas-Albores *et al.* 1998; Cheng y Chen 2000). Estas modificaciones en los parámetros inmunitarios podrían ser los responsables de las diferencias en la susceptibilidad a las enfermedades de acuerdo a las estaciones o a la temperatura (Jiménez *et al.* 2000; Durand 1997).

El principal objetivo de este estudio fue el de investigar el efecto de la temperatura sobre la supervivencia, prevalencia del virus y respuesta inmune de camarones juveniles de *P. vannamei* infectados por vía oral con WSSV. La respuesta inmune fue evaluada mediante hemograma (conteos totales y diferenciales de hemocitos) e histología, presencia de procesos de infiltración y/o encapsulación en los tejidos blanco del virus, epitelio del estómago, epitelio cuticular, y branquias. Se utilizó un PCR anidado en un sólo tubo para evaluar la presencia de WSSV en animales infectados.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sistema experimental

Los experimentos fueron conducidos en un laboratorio del CENAIM acondicionado para ensayos de desafío. Doce tanques cilíndricos de 200 l de capacidad. fueron llenados con agua de mar fresca tratada previamente con filtros de carbón activado. La salinidad del agua de mar fue de 34.5 ppt. Todos los tanques fueron aireados continuamente con piedras difusoras. La temperatura del agua fue controlada con calentadores de barra.

Animales y diseño experimental

El estudio fue desarrollado en dos experimentos similares, denominados Experimento I y II. En ambos experimentos se alimentó a los camarones por un día, con tejido contaminado de virus. Los tratamientos de temperatura se detallan a continuación (tabla 1): (A) camarones infectados a 33ºC, mantenidos a esta temperatura por 36 horas (experimento I) o 48 horas (experimento II), y luego sometidos a 27ºC; (B) camarones infectados a 33ºC y mantenidos a esta temperatura por 8 días (experimento I) o 9 días (experimento II), y luego a 27ºC hasta el final de los experimentos; (C) camarones infectados a 27°C, mantenidos a esta temperatura por 36 horas (experimento I) o 48 horas (experimento II), y sometidos a un incremento de 33ºC en los siguientes 6 1/2 días, y finalmente cultivados nuevamente a 27ºC hasta el final de los experimentos; y (D) camarones infectados a 27ºC y mantenidos a esta temperatura por 8 días. Los camarones del tratamiento B (experimento I) fueron reinfectados con WSSV, luego de la reducción de temperatura al día 8. Cada experimento duró 16 días.

Tabla 1. Tratamientos de temperatura empleados en el estudio.

Tratamiento	Experimento I	Experimento II
A	Infectados a 33˚C/mantenidos así 36 h Descenso a 27˚C/ mantenidos así hasta el final del experimento	Infectados a 33˚C/mantenidos así 48 h Descenso a 27˚C/ mantenidos así hasta el final del experimento
B	Infectados a 33˚C/mantenidos así 8 días Descenso a 27˚C/ Reinfección	Infectados a 33˚C/mantenidos así 8 días Descenso a 27˚C hasta el final del experimento
C	Infectados a 27˚C/mantenidos así 36 h Incremento a 33˚C/mantenidos así 6 días Descenso a 27˚C hasta el final del experimento	Infectados a 27˚C/mantenidos así 48 h Incremento a 33˚C/mantenidos así 6 días Descenso a 27˚C hasta el finaldel experimento
D	Infectados a 27˚C/mantenidos así hasta el final del experimento	Infectados a 27˚C/mantenidos así hasta el final del experimento

Cien camarones fueron dispuestos aleatoriamente en cada uno de los tanques de 200 l. El peso de los animales experimentales osciló entre 0.8 a 1.5g, y provinieron de cultivos larvarios realizados en el CENAIM. Los camarones fueron aclimatados a las condiciones de los tanques experimentales por tres días antes de iniciar los ensayos. Los camarones fueron alimentados con balanceado de 35% de proteína.

Cada tratamiento tuvo tres réplicas. El día anterior a la infección los animales no fueron alimentados. Se registró diariamente la mortalidad en intervalos de 4-horas, removiéndose los muertos. En el experimento II se colectó aleatoriamente 5 camarones de cada tanque para realizar análisis de PCR, histología y hemograma, los días 0, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 10 y 16.

Preparación de solución viral y tejido contaminado

Branquias y tejido de camarones *L. vannamei* severamente infectados con WSSV fueron macerados y homogenizados en tampones TBE 1X o TE 1X en un radio de 1:10, centrifugados luego a 11,000 g por 20 min a 4˚C. El sobrenadante fue filtrado por un filtro de 0.45 µm y almacenado a –80˚C hasta su uso. El tejido contaminado fue obtenido mediante la infección de camarones con el extracto viral a través de una inyección intra-muscular de 50 ml en el segundo segmento abdominal. Camarones moribundos fueron retirados y almacenados a –80˚C. La infección de los tejidos con WSSV fue verificada mediante PCR.

Hemograma e Histología

La hemolinfa fue extraída con jeringuillas de 1 ml (Insulin Syringe 26 G 1/2) cargadas con anticoagulante citrato de sodio al 10%. La hemolinfa igualada (V/V) con citrato de sodio fue utilizada en los hemogramas, (Número total de hemocitos circulantes: NTH; fórmula hemocitaria: Hemocitos hialinos (H), hemocitos semigranulares (SG) y hemocitos granulares (GR)) el cual se determinó de acuerdo al protocolo descrito por Muñoz *et al.* (2000).

Las observaciones histológicas se realizaron sólo en los animales de los tratamientos B y D. Los mismos camarones a los cuales se les extrajo hemolinfa fueron preservados posteriormente en solución Davidson para el análisis de histopatología, acorde al procedimiento descrito por Bell y Lightner (1988). Con las observaciones histológicas se elaboró dos índices. El primer índice se construyó a partir del número de tejidos y grado de lesiones atribuidos a WSSV de cada uno de los cinco camarones muestreados en cada réplica. A determinados órganos se les asignó un peso basados en el criterio del grado de importancia del tejido en el proceso de la infección del virus. Así, glándula antenal y epitelio cuticular tuvieron un peso de 1, estómago y tejido conectivo de 2, y 3 para órgano linfoide, branquias, tejido hematopoyético y corazón. Bajo este criterio, una lesión en el órgano linfoide o tejido hematopoyético implica un proceso infeccioso más avanzado que si esta lesión estuviera en la glándula antenal. Las lesiones en cada órgano fueron a su vez catalogadas en una escala de 0 a 4, representando 4 una lesión avanzada. Esta escala fue a su vez normalizada a un valor de 1 al dividir el grado de lesión para cuatro. El índice histológico arriba explicado va en una escala de 0 a 6. Un valor de 6 implica lo siguiente: i) órganos de glándula antenal y epitelio cuticular en grado cuatro (4), esto es equivalente a 1 (4/4) que al multiplicar por el peso asignado a los órganos se obtiene como resultado 1, ii) estómago y tejido conectivo en grado 4 ambos y por ende el valor de la normalización es 1, el cual es multiplicado por 2, lo que resulta en un valor final de 2, y iii) órganos restantes de nivel 3 también todos infectados en grado 4, lo cual resulta en un valor final de 3, bajo un análisis análogo a los cálculos precedentes. Finalmente, se suma los valores de las tres clasificaciones, es decir, 1, 2 y 3 lo que da el valor de 6. El segundo índice fue construido para comparar cuantitativamente la respuesta inmune a nivel histológico mediante la medición de presencia de encapsulación e infiltración hemocitaria. Para este caso no se asignó peso a los distintos órganos por lo cual la escala del índice va de 0 a 1. Este índice ha sido denominado índice histológico de respuesta inmune. Se midió además la presencia de piknosis, la cual a pesar de presentarse en el mismo gráfico no se considera una respuesta inmunitaria.

PCR

Para detectar el virus por PCR se utilizó un protocolo desarrollado en el CENAIM. Los iniciadores comerciales amplifican un fragmento de 982 y otro de 570 pares de bases del genomio viral, y una secuencia ribosomal del camarón de 441 pares de bases. Las reacciones de carácter anidado fueron realizadas en un sólo tubo. Mediante este protocolo se visualiza una banda que corresponde al control de calidad de DNA y entre 1 a 3 bandas del virus. El grado de infección se mide en una escala de 0 a 3.

Con los datos de PCR se calculó la prevalencia (% de animales positivos) y un índice de PCR. El índice de PCR es un parámetro ponderado construído a partir de la prevalencia de la muestra y el grado de infección del animal. Por ejemplo, un índice de 1 significa que la muestra de animales tiene una prevalencia de 100% y que todos los animales analizados tienen el mayor grado de infección.

Resultados

Los resultados de supervivencia de camarones infectados con WSSV para los experimentos I y II se presentan en las Figuras 1 y 2, respectivamente. Los camarones tratados a 33˚C por 6 a 8 días (tratamientos B y C) tuvieron las mejores supervivencias hasta el octavo día post-infección (90%). El cambio de temperatura y reinfección del tratamiento B al noveno día (experimento 1) causó una mortalidad del 98%. La supervivencia del mismo tratamiento en el experimento II, fue del 99%. Los animales del tratamiento C comenzaron a morir en los primeras días en ambos experimentos. Sin embargo, la mortalidad se detuvo después de incrementar la temperatura a 33˚C. Los animales del tratamiento A registraron una supervivencia final de 16.5% y 37.9% respectivamente para los experimentos I y II, en tanto que los animales del tratamiento D presentaron un decrecimiento agudo de la población en los primeros 6 días de postinfección, teniendo las más altas mortalidades en ambos experimentos. Las supervivencias finales para este grupo fueron del orden de 3.9 y 7.7%, para los experimentos I y II, respectivamente.

Las muestras de camarón al inicio del experimento fueron WSSV-PCR negativas. Sin embargo, la prevalencia aparente se incrementó al 100% en todos los tratamientos después de las 24 h de infección (Figura 3), y permaneció así en todos los grupos hasta el final del experimento.

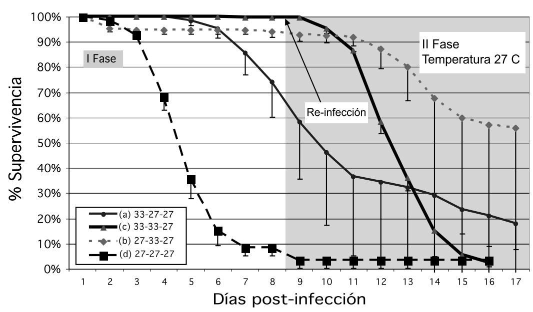

Figura 1. Experimento I. Supervivencia de camarones juveniles *L. vannamei* sometidos a infección con virus "Mancha Blanca" y dos temperaturas de agua. Tratamientos FASE I: (A) 33-27-27 = camarones infectados a 33°C, mantenidos a esta temperatura por 36 horas, y luego sometidos a 27°C por 6 1/2 días; (B) 33-33-27 = camarones infectados a 33°C y mantenidos a esta temperatura por 8 días; (C) 27-33-27 = camarones infectados a 27°C, mantenidos a esta temperatura por 36 horas, y luego sometidos a un incremento de 33°C por 6 1/2 días; y (D) 27-27-27 = camarones infectados a 27°C y mantenidos a esta misma temperatura por 8 días. En la FASE II se redujo la temperatura de los tratamientos B y C, que estaban a 33°C, a 27˚C. Además se reinfectó el tratamiento (B) al inicio de la FASE II. Las barras representan un error estándar.

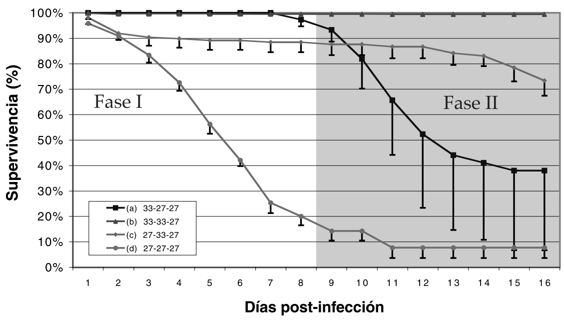

Figura 2. Experimento II. Supervivencia de camarones juveniles sometidos a infección con virus "Mancha Blanca" y dos temperaturas de agua. Tratamientos FASE I: (A) 33-27-27 = camarones infectados a 33°C, mantenidos a esta temperatura por 48 horas, y luego sometidos a 27°C por 6 días; (B) 33-33-27 = camarones infectados a 33°C y mantenidos a esta temperatura por 8 días; (C) 27-33-27 = camarones infectados a 27°C, mantenidos a esta temperatura por 48 horas, y luego sometidos a un incremento de 33°C por 6 días; y (D) 27-27-27 = camarones infectados a 27°C y mantenidos a esta misma temperatura por 8 días. En la FASE II se redujo la temperatura de los tratamientos B y C, que estaban a 33°C, a 27˚C. Además se reinfectó el tratamiento (B) al inicio de la FASE II. Las barras representan un error estándar.

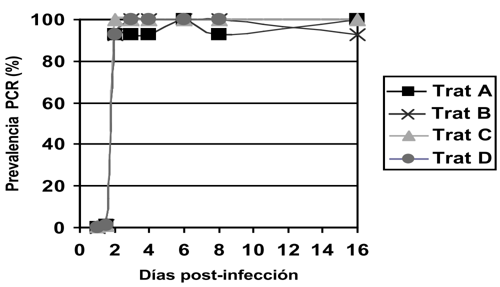

Figura 3. Prevalencia aparente de WSSV medido mediante técnica de PCR en camarones durante experimento II.

El tratamiento B presentó el menor índice de PCR, mientras que el tratamiento D registró el mayor (Fgura 4). A las 36 horas, en los animales de los tratamientos B y A, la intensidad del índice de PCR fue igual a 0.3, en tanto que en los animales de los tratamientos D y C estuvo alrededor de 0.6. La equivalencia en índice histológico fue de 0.5, para los primeros y de 1 para los segundos (Figura 5). Entre las 36 horas y los 2 días de postinfección, se observó una inflexión en la curva del índice de PCR de todos los tratamientos. A partir de los dos días de postinfección el índice histológico y de PCR volvió a incrementarse pero a menor ritmo. El índice histológico de los animales del tratamiento D se mantuvo en 2 durante los dos y tres días de postinfección, durante ese tiempo el índice de PCR se incrementó de 0.6 a 0.8. Los animales infectados a 27˚C (tratamientos A y D) presentaron el mismo grado de infección hasta las 48 horas, sin embargo el índice de PCR de los animales del grupo A disminuyó luego del incremento de la temperatura a 33˚C, mientras que la del grupo D continuó incrementándose hasta alcanzar el índice 1.

En los tratamientos B y D se observó un ligero incremento de hemocitos circulantes en las primeras 24 horas de 6.1 y 7.2 millones de células por ml a 8.7 y 8.8 millones de células por ml, respectivamente (Figura 6). Sin embargo, a partir de las 48 horas de postinfección se inició una reducción del número total de hemocitos. Esta reducción llegó a su punto

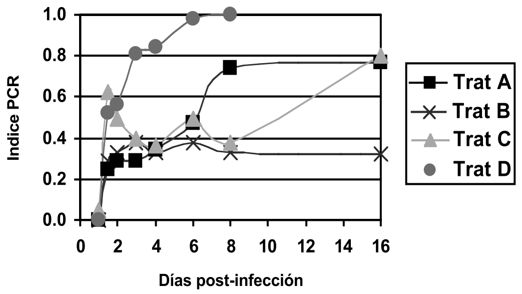

Figura 4. Indice PCR de WSSV en camarones durante experimento II. El índice PCR es un parámetro ponderado construido a partir de la prevalencia de la muestra y el grado de infección del animal. Por ejemplo, un índice de 1 significa que la muestra de animales tiene una prevalencia de 100% y que todos los animales analizados tienen el mayor grado de infección en una escala de 0 a 3.

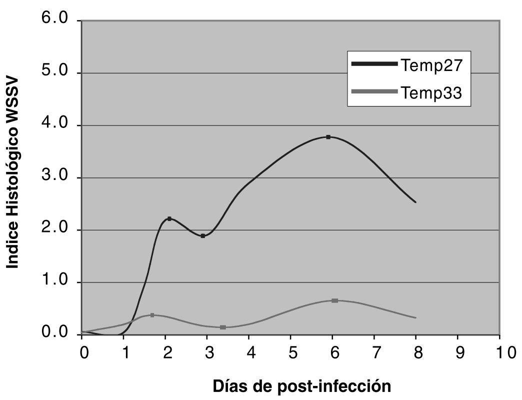

Figura 5. Indice histológico para WSSV de los animales infectados a 27 y 33˚C. (Ver explicación página 51)

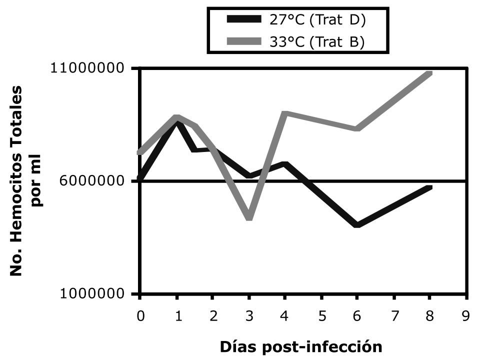

Figura 6. Número de hemocitos totales por ml de hemolinfa de camarones juveniles de *L. vannamei* infectados por vía oral con WSSV en el experimento II. Tratamiento B-camarones infectados y cultivados por 8 días en agua a 33ºC; Tratamiento D-camarones infectados y cultivados por 8 días en agua a 27ºC.

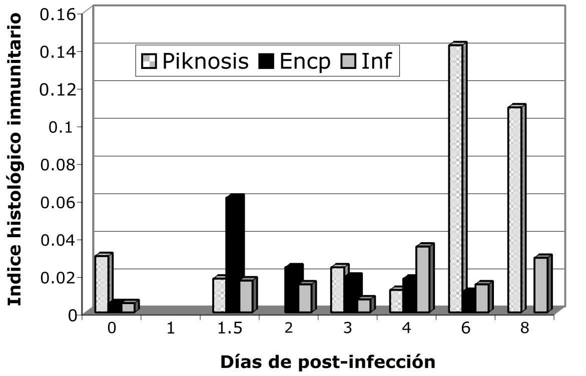

Figura 7. Indice histológico de respuesta inmunitaria (encapsulación, infiltración de hemocitos) y de piknosis en los animales infectados a 27˚C.

más bajo a los 3 días de cultivo. El NTH se incrementó nuevamente en los animales del tratamiento B, alcanzando su valor inicial a los 4 días de cultivo, en tanto que el NTH en los animales del tratamiento D continuó descendiendo hasta el final de los muestreos. El conteo diferencial de hemocitos permitió determinar que las subpoblaciones hemocitarias que se perdieron en los animales del tratamiento B fueron las células GR y SG, estas últimas tuvieron un ligero incremento antes de caer. La población de hemocitos hialinos se incrementó en circulación. En los animales del tratamiento D, el número de células GR se mantuvo estable, las células SG tuvieron una reducción paulatina, en tanto que las células hialinas se incrementaron en los primeros 2 días antes de caer.

A las 36 horas de postinfección se observó un acelerado proceso de encapsulación en el estómago, branquias, epitelio cuticular y glándula antenal. La encapsulación fue más fuerte en los animales con mayor infección (tratamiento D, índice de encapsulación: 0.06) (Figura 7), que en los animales del tratamiento B (con un índice de encapsulación de 0.04) (Figura 8). En los dos grupos de animales la encapsulación disminuyó en los siguientes días, en particular en los animales del tratamiento B. Sin embargo, en estos últimos esta primera respuesta celular fue seguida por un fuerte proceso de infiltración de hemocitos que arrancó a los dos días de postinfección (Figura 8). La infiltración fue muy evidente en tejidos expuestos como, epitelio del estómago (Figura 9), branquias, epitelio cuticular, hepatopáncreas, pero también fue observada en músculo y alcanzó su máximo nivel a los 4 días (índice de infiltración de: 0.16), decayendo paulatinamente en los muestreos de los días 6 y 8. La infiltración fue comparativamente menor en los animales del tratamiento D (índice de: 0.04), como máximo valor a los 4 días de postinfección (Figura 7). En estos animales se detectó picnosis y kariorrexis en el órgano linfoide, corazón y glándula antenal a los 6 y 8 días de postinfección, alcanzando un valor máximo de 0.14 en el índice histológico al sexto día (Figura 7). Esos animales son los que alcanzaron el valor máximo en el índice de PCR (1) y en el índice histológico para WSSV, curiosamente en ellos la curva de mortalidad comenzó a estabilizarse, en ese momento.

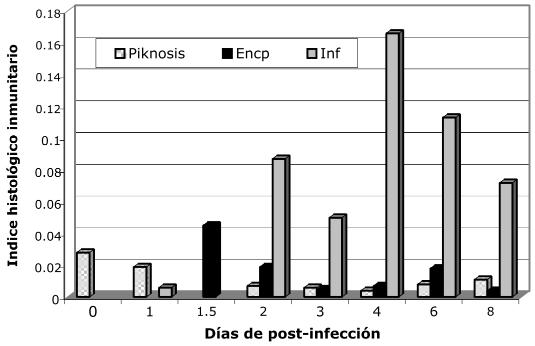

Figura 8. Indice histológico de respuesta inmunitaria (encapsulación, infiltración de hemocitos) y de piknosis en los animales infectados a 33˚C.

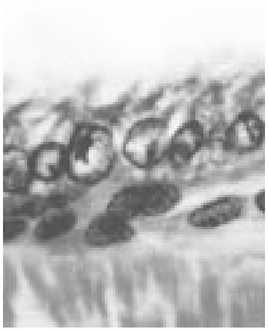

Figura 9. Alta respuesta celular observada en animales infectados a una temperatura del agua de 33˚C. Nótese la capa de hemocitos bajo el epitelio “cerrando” las puertas de entrada de patógenos. Esta respuesta no se observó a 27˚C.

En los animales del tratamiento A, el descenso de la temperatura no afectó aparentemente el número de hemocitos circulantes, por el contrario al tercer día de infección se registró un mayor NTH que los del tratamiento B. El conteo diferencial permitió observar que estos camarones no perdieron hemocitos SG y GR de circulación. El incremento de la temperatura en los animales del tratamiento C coincidió con un fuerte incremento de hemocitos circulantes de todas las poblaciones hemocitarias.

Discusión

La supervivencia guardó relación con el grado de infección pero no con la prevalencia, como se recordará a las 24 h de postinfección, la prevalencia aparente fue del 100% en todos los tratamientos. Sin embargo, en los animales del tratamiento B (infectados a 33˚C), la infección fue muy leve en la mayoría de animales (grado 1), ellos tuvieron por ende el menor índice PCR y la mayor supervivencia. Estos resultados sugieren además que el virus fue capaz de infectar a los camarones a cualquier temperatura y que las supervivencias a 33˚C no fueron causadas por inactivación viral, sino por la respuesta del camarón al virus. Esta respuesta no tuvo un efecto residual, bajar la temperatura y reinfectar (tratamiento B, experimento 1) provocó una enorme mortalidad. Consideramos además que la reinfección causó la mortalidad y no el simple cambio de temperatura, ya que la supervivencia final del mismo tratamiento en el experimento II con cambio de temperatura pero sin reinfección fue muy alta.

El tiempo transcurrido entre las 24 y 36 horas de postinfección son esenciales para el incremento de la infección y el inicio clínico de la enfermedad. Nuestras observaciones coinciden con las de Tang y Lightner (2000), quienes señalaron un incremento del virus de 140 veces en los tejidos blanco entre las 24 y 35 horas de postinfección. Sin embargo, la mortalidad pudo detenerse en los acuarios si se incrementa la temperatura, a pesar de que en ese momento el virus esté plenamente establecido en los animales, sugiriendo que aún en esas condiciones los camarones son capaces de reaccionar contra el virus.

Por otra parte, los resultados de histología muestran que los animales que mueren entre el cuarto y sexto día de postinfección presentan mayores lesiones que los que mueren los tres primeros días, estos resultados son alentadores ya que indicarían la existencia de animales relativamente resistentes a la viremia.

La relación observada entre el índice de PCR y el índice histológico tendría aplicaciones epidemiológicas muy interesantes. En la práctica camarones WSSV PCR-positivos no necesariamente desarrollan la enfermedad. Sin embargo, nuestros resultados indican que un índice de PCR superior a 0.5 puede ser tomado como una señal de peligro, ya que su equivalente histológico refleja la aparición de signos clínicos de la enfermedad, además del inicio de la mortalidad.

Las observaciones histológicas indicaron que todos los animales son capaces de responder rápidamente al ataque viral encapsulando células enfermas y que esta respuesta sería proporcional al grado de infección. Probablemente la encapsulación observada podría ser la responsable de la desaceleración en el proceso infeccioso a partir de los 2 días de postinfección. Sin embargo, los animales cultivados a 27˚C se mostraron incapaces de dos procesos inmunitarios que si se observaron en los animales cultivados a 33˚C, estos procesos fueron proliferación de hemocitos e infiltración de los mismos en los tejidos más expuestos del camarón. Es probable que la infiltración masiva sea la responsable de la caida de hemocitos circulantes de los animales del tratamiento B durante ese periodo. Los datos del conteo diferencial de hemocitos sugieren que son los SG y los GR, las subpoblaciones encapsuladoras e infiltrantes, coincidiendo en este sentido con lo que señala la literatura para otros peneidos (Tsing 1987). A los 4 días, en los animales del tratamiento B, el número total de hemocitos se recupera, al mismo tiempo que la histología muestra una masiva infiltración de hemocitos, indicando en estos animales una alta proliferación hemocitaria, combinada con un estado de máxima alerta inmunitaria. Desafortunadamente, este estado de alerta es de corta duración y disminuye paulatinamente, probablemente esta infiltración es la respuesta tardía al primer enfrentamiento del sistema inmune con el WSSV, pero luego de este, la carga viral ya no es lo suficientemente alta como para mantener activa la alerta durante un tiempo prolongado, esto explicaría por qué motivo en el primer bioensayo los animales que pasaron 8 días a 33˚C murieron al bajar la temperatura y realizar una segunda infección a 27˚C. Una proliferación tan masiva de hemocitos, acompañada de infiltración debe ser muy costosa en términos energéticos para el animal por lo que la respuesta se mantendría mientras exista la amenaza y si las condiciones metabólicas del animal son las óptimas. Al respecto, es necesario considerar que *L. vannamei* es un crustáceo de aguas calientes, las fluctuaciones de temperatura no sólo afectan el crecimiento, supervivencia y metabolismo de los crustáceos, también el sistema inmune se ve afectado. Así en *Carcinus maenas* un cangrejo de aguas frías, la temperatura donde se observa una menor actividad antibacteriana en el plasma y un bajo número de hemocitos circulantes se ubica en los meses muy fríos o muy cálidos del año (Chisholm y Smith 1994). En tanto que para *Penaneus californiensis* una temperatura superior a 28˚C hace caer la actividad PO (Vargas-Albores *et al.* 1998). Si se considera los trabajos relacionados a WSSV, Durand (1997) ha encontrado que *Penaeus japonicus* es más resistente a 14-16˚C que *L. vannamei* a 25˚C, el primero a diferencia del segundo, es un animal de aguas más templadas. En *L. vannamei*, temperaturas inferiores a 31˚C podrían no ser las óptimas para el buen desempeño del sistema inmune y los camarones no responderían con la rapidez y energía que la agresión de un virus de tan alta replicación como el WSSV demanda. Conforme a ésto podemos agregar que, ensayos previos de temperatura no sólo mostraron las fluctuaciones de hemocitos similares a las reportadas en este trabajo, sino que además un índice inmunitario construido a partir del NTH, concentración de proteínas plasmáticas y generación de O2- fue superior en animales cultivados a 33ºC que en los cultivados a 27ºC (datos no presentados).

En los animales del tratamiento A el NTH no cayó como en los del tratamiento B, en estos animales no se hizo histología que permita determinar si hubo o no infiltración de hemocitos en los tejidos, pero es probable que el cambio de temperatura haya afectado la infiltración, de hecho en estos animales no se observó el descenso de hemocitos SG y GR (datos no mostrados), sugiriendo que la temperatura alta no interviene solamente para favorecer la proliferación celular sino que además sería necesaria para incentivar la infiltración. Este proceso requiere la participación activa de proteinas del citoesqueleto como la actina, y de receptores celulares, este proceso podría ser afectado por condiciones metabólicas deprimidas. Presentar una respuesta inmune incompleta podría ser la causa de la mortalidad observada en los animales de este tratamiento.

En los animales del tratamiento C tampoco se realizaron observaciones histológicas, pero los datos obtenidos de los tratamientos B y D, permiten suponer que ellos reaccionaron también con encapsulación al primer enfrentamiento con WSSV. El hemograma permitió determinar que el incremento de la temperatura incentivó la proliferación de hemocitos favoreciendo posiblemente también la infiltración. En conclusión ellos habrían tenido una respuesta inmune completa. En estos animales la supervivencia fue alta y superior a la del tratamiento A.

En este trabajo se observaron esferoides a las 24 y 36 horas de postinfección, principalmente en los animales del tratamiento B (datos no presentados), Estos animales presentaron esferoides desde el tiempo 0 (sin ninguna manifestación histológica de infección viral), al contrario de lo ocurrido en los animales del tratamiento D, en algunos de cuales se detectó, células infectadas por WSSV en la glándula antenal al tiempo 0. Esferoides en el órgano linfoide de camarones han sido asociados a infecciones virales (Bonami *et al.* 1992; Hasson *et al.* 1999). En TSV el desarrollo de esferoides ha sido asociado a la respuesta inmune celular del huésped (Hasson *et al.* 1999). En infecciones por WSSV se ha observado también esferoides en el órgano linfoide (Romero com. pers.). Si la aclimatación de los animales a 33ºC estuvo relacionada a la ausencia de células infectadas y a la presencia de esferoides en el órgano linfoide merece futuros trabajos de investigación.

Una conclusión práctica se puede mencionar, el camarón requiere de sólo 4 días de alta temperatura para eliminar el virus y alcanzar a la vez un estado de alerta inmunitaria. Si se trata a los animales por un tiempo mayor probablemente la limpieza sea más eficaz, pero la respuesta inmune decaería y sería recomendable el uso de inmunoestimulantes con el objeto de provocar la alerta inmunitaria antes de que los animales se enfrenten nuevamente al virus.

Bibliografía

Bell, T. A., y Lightner, D. V. 1988. A Hanbook of normal penaeid shrimp histology. The world Aquaculture Society, Baton Rouge, LA.

Bonami, J. R., Lightner, D. V., Redman, R. M. y Poulos, B. T. 1992. Partial characterization of a togavirus (LOVV) associated with histopathological changes of the lymphoid organ of penaeid shrimp. Dis. Aquat. Org. 14: 145-152.

Bray, W. A., Lawrence, A. L. y Leung-Trujillo, J. R.. 1994. The effect of salinity on growth and survival of *Penaeus vannamei*, with observation on interaction of IHHN virus and salinity. Aquaculture 122, pp. 133-146.

Cheng, W. y Chen, J. C. 2000. Effects of pH, temperature and salinity on immune parameters of the freshwater prawn *Macrobrachium rosembegii*. Fish and Shellfish immunology. 10: 387-391.

Chisholm, J. R. S. y Smith, V. 1994. Variation of antibacterial activity in the haemocytes of the shore crab, *Carcinus maenas*, with temperature. J. mar. biol. Ass. U.K., 74: 979-982.

De la Peña L. D., T. Tamaki, K. Momoyama, T. Nakai y K. Moruga. 1993. characteristics of the causative bacterium of vibriosis in the Kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. Aquaculture 115, pp.1-12.

Durand, S. 1997. Etude d'une baculovirose (WSS) des crevettes penaeides: Caracterization et construction d'outils de diagnostic. Thèse Doctorat, Université des Science et Techniques du Languedoc, Montpellier, pp 227.

Hasson, K. W., Lightner, D. V., Mohney, L., Redman, R. M. y White, B. M. 1999. Role of lymphoid organ spheroids in chronic Taura syndrome virus (TSV) infections in *Penaeus vannamei.*

Jimenez R., R. Barniol, L. de Barniol y M. Machuca. 2000. Periodic occurrence of epithelial viral necrosis outbreaks in *Penaeus vannamei* in Ecuador. Diseases of Aquatic Organisms 42 (2), pp. 91-99.

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

Ponce-Pelafox J., C. A. Martinez-Palacios y L. G. Gross. 1997. The effects of salinity and temperature on the growth and survival of juvenile white shrimp, *Penaeus vannamei*, Boone, 1931. Aquaculture 157 (1,2), pp 107-115.

Tang, K., y Lightner, D. 2000. Quantification of white spot syndrome virus DNA through a competitive polymerase chain reaction. Aquaculture. 189: 11-21.

Teichert-Coddington, D.R., R. Rodriguez y W. Toyofuku. 1994. Causes of cyclical variation in H-onduras Shrimp production. World Aquaculture, 25 (1): 57-61.

Tsing, A. 1987. Recherche sur les hémocytes et l'inmunité chez le crustacé *Penaeus japonicus* (Bate, 1881). Thèse Doctorat, Université des Science et Techniques du Languedoc, Montpellier, pp 250.

Vargas-Albores, F., Hinojosa-Baltazar, P., Portillo-Clark, G. y Magallón-Barajas, F. 1998. Influence of temperature and salinity on the yellowleg shrimp, *Penaeus californiensis* holmes, prophenoloxidase system. Aquaculture Research. 29: 549-553.

Wyban J., W. A. Walsh, y D. M. Godin. 1995. Temperature effects on growth, feeding rate and feed conversion of the Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*), Aquaculture 138 (1-4), pp. 267-279.