CENAIM INFORMA

Boletín Informativo No 147 Noviembre 15 del 2008

Por Jenny Rodriguez, Ph. D.
Investigador Inmunología

Rol de los canales secretores de las glándulas tegumentales del Camarón en la epidemiología de WSSV

Antecedentes

La literatura señala que los primeros tejidos en infectarse con el virus de la mancha blanca (WSSV) son los epitelios, la glándula antenal y las branquias. Utilizando un anticuerpo específico hemos detectado señal positiva de WSSV en glándulas tegumentales (GT) en animales con o sin lesiones de mancha blanca (Rodríguez., 2007; Maldonado et al., 2003). Las GT son abunadantes en el tejido conectivo subepitelial. Las GT, tienen carácter secretor, están comunicadas con el medio externo, y están implicadas en múltiples funciones; tales como esclerotización de la cutícula, actividad fenoloxidasa, formación de la epicutícula. y osmorregulación (Horst and Freeman, 1993). En la región oral son muy abundantes en el labrum y el paragnatha (apéndice bucal), donde secretan el mucus necesario para aglutinar y lubricar el alimento (Horst and Freeman, 1993). Si las GT constituyen portales para el ingreso del WSSV y/u otros virus a los tejidos internos del animal, es fácil imaginar el alto riesgo de infección por esta vía considerando su abundancia. Un simple paragnatha puede contener hasta 1000 GT individuales (Horst and Freeman, 1993). Para determinar si las GT se infectan, replican virus y/o lo acumulan en el mucus, se utilizó hibridación *in situ* (H*IS*) para WSSV. La HIS es una técnica confirmatoria, específica y muy sensible que detecta los ácidos nucleicos del patógeno. La presencia de ARN viral se consideró en este estudio como indicador de un activo proceso de infección celular y replicación viral.

Materiales y métodos

Para la hibridación in situ, los cortes histológicos fueron desparafinados, tratados con proteinasa K, y fijados con parformadehido. Antes de aplicar la sonda los cortes fueron tratados con DNAsa, a fin de degradar el ADN viral y detectar únicamente el ARN. Las sondas fueron sintetizadas mediante PCR para WSSV utilizando los iniciadores de Kimura et al. (1996) en presencia de digoxigenina DIG-UTP (Roche). Luego de incubar toda la noche con la sonda a 39°C, los cortes fueron tratados con concentraciones decrecientes de SSC (tampon a base de ClNa y Citrato de Na) antes de proceder a la detección utilizando un anticuerpo antidigoxigenina. El revelado se realizó con substrato NBT-BCIP. Antes del montaje se tiñó los cortes con Bismark-Brown Y, cuyo color marrón contrasta con el violeta obscuro de la señal positiva para el WSSV. Solo las células que tienen ARN viral darán señal positiva con este protocolo.

Resultados

Los resultados de H*IS* de cortes tratados con DNAsa mostraron ausencia de señal para WSSV en las GT. La señal se mantuvo en epitelio y en células del tejido conectivo, estrechamente asociadas a las GT y en otros tejidos internos. La pérdida de señal en las GT indica que el virus no las infecta (no hay ARN). Desafortunadamente estos resultados señalan en cambio que el virus se acumula en este tejido. La presencia de señal en las GT más externas de los apéndices bucales (Figura 1) sugiere además que los camarones colectan el virus durante la búsqueda de alimento. Los canales

CENAIM INFORMA

Boletín Informativo No 147 Noviembre 15 del 2008

Por Jenny Rodriguez, Ph. D.
Investigador Inmunología

secretores de las GT están recubiertos de una fina epicutícula, la cual es liberada con los exuvios. Los camarones que ingieren los exuvios contaminados tendrán fuertes probabilides de ser infectados por el WSSV. En conclusión la epicutícula de los canales secretores de la GT constituyen una fuente de infección al capturar y concentrar WSSV desde el medio, en exuvios que serán luego ingeridos por otros animales atraídos por la muda.

Estos resultados no descartan además, que el WSSV u otros patógenos puedan utilizar las GT como portales de ingreso a los tejidos internos. Al menos dos observaciones sustentarían esta hipótesis.

1.- Sistema inmune en alerta: A) Existen varios reportes sobre esferoides asociados a las GT. B) Ausencia de señal para WSSV en GT de animales que manifiestan alguna forma de resistencia al WSSV, natural o inducida por inmuno-estimulantes, lo cual sugiere que moléculas antivirales podrían estar presentes entre las sustancias secretadas (esto debe investigarse en el futuro).

2.- Re-infección. Animales con lesiones severas de WSSV presentan desorganización de los tejidos conectivo y glandular de la región oral, esto podría facilitar el ingreso del virus acumulado agudizando el riesgo de re-infección

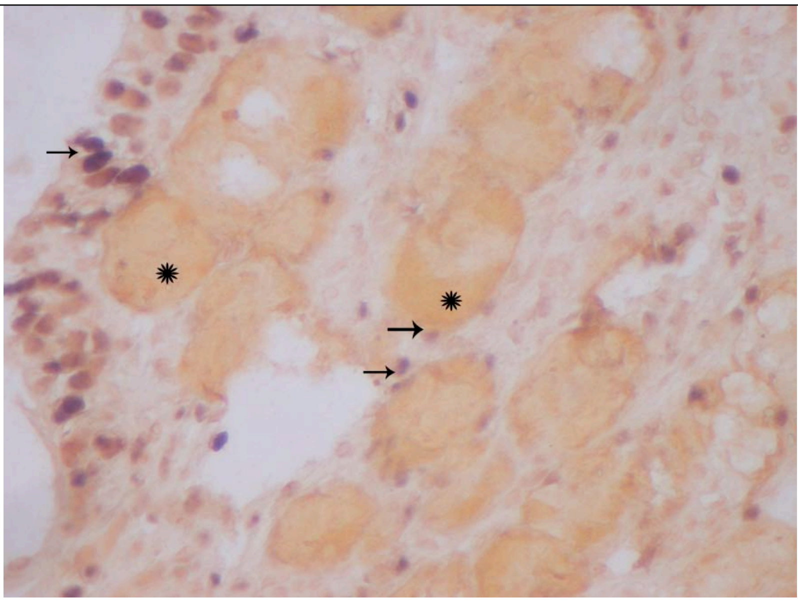

Figura 1. Corte histológico de la región oral. Reacción positiva para WSSV por hibridación *in situ* en células epiteliales y del tejido conectivo (flechas). Ausencia de señal en glándulas tegumentales (asteriscos).

Referencias

Horst M. and Freeman J. (1993) Crustacean Integument. Morphology and Biochemestry, capítulo 5: 151:186.

Kimura, T., K. Yamano, H., Nakano, K., Momoyama, Hiraoka, M. and Inouye, K., 1996. Detection of penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV) by PCR. Fish Pathology. 31(2), 93-98.

Maldonado M. (2003). Respuesta inmunitaria en familias de *Litopenaeus vannamei*, bajo condiciones de infección con WSSV y el efecto de la adición de β-1,3 glucanos. Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar. Escuela Superior Politécnica del Litoral. Guayaquil - Ecuador. Tesis de maestría.

Valladares A. (2006). Tratamientos basados en alta temperatura y β-1,3-glucanos para disminuir la prevalencia de la enfermedad de la mancha blanca (WSD) en post-larvas de *Penaeus vannamei*. Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar. Escuela Superior Politécnica del Litoral. Guayaquil - Ecuador. Tesis de maestría.