LA RESPUESTA INMUNITARIA CELULAR DEL CAMARÓN *LITOPENAEUS VANNAMEI* AL WSSV Y SU UTILIDAD EN EL CONTROL DE LA ENFERMEDAD EN LOS ESTANQUES

Mercedes Motesdeoca[1], Yasuji Amano[2], Fabrizio Echeverría[1], Irma Betancourt[1], Fanny Panchana[1], Mariuxi Sotomayor[1] y Jenny Rodríguez[1]
[1]Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas - CENAIM
[2]Instituto Nacional de Higiene

Introducción

Sin duda una de las características más importante del WSSV es su gran poder de propagación, las múltiples vías de infección y el amplio espectro de huéspedes, tanto silvestres como cultivados que pueden actuar como reservorios y/o vectores.

Comprender como reacciona el huésped ante el ataque viral, contribuiría a la planificación de medidas profilácticas y/o de manejo que favorezcan los mecanismos de defensa del camarón, ayudando de esta manera a disminuir los efectos devastadores del WSSV en los estanques. El período de mayor riesgo de infección transcurre entre la 3ª y la 6ª semana de cultivo. En análisis previos de muestras de camaronera se han podido observar algunas alteraciones hematológicas, tales como hemolinfas rosadas (provocadas por una inadecuada actividad fenolóxidasa (PO) plasmática), incremento de hemocitos hialinos y aparición en circulación de hemocitos de morfología alterada (atípicos). En este estudio, se analizó la relación entre éstas y otras alteraciones de los parámetros inmunitarios del camarón con el grado de infección con WSSV (detectado por PCR). Además, se analizó a nivel ultraestructural, hemocitos circulantes e infiltrantes de animales infectados por WSSV.

Materiales y Métodos

En una piscina ubicada en la localidad de Engunga (Guayas), a partir de la cuarta a la sexta semana de postsiembra (del 15 de enero al 1 de febrero del 2001) se realizaron muestreos sucesivos, 2 veces por semana, de 20 animales . Se analizó individualmente, talla, peso, color de la hemolinfa, estadío de muda de los animales, WSSV por PCR (IQ 2000) y hemograma.

Otros análisis inmunitarios fueron, actividad antibacteriana (A A), (Tapia 1997); actividad fenoloxidasa (PO), siguiendo el protocolo estandarizado por Echeverría (1997); detección del anión superóxido (O^-_2) (Muñoz *et al.* 2000); cuantificación de proteínas en el plasma (Lowry *et al*. 1951). Para estos análisis se utilizaron mezclas de hemolinfa. El criterio para hacer las mezclas fue color de la hemolinfa (azul, rosada), fecha de muestreo.

Para histopatología los tejidos fueron procesados de acuerdo al procedimiento descrito por Bell y Lightner (1988). Para las observaciones ultraestructurales de hemocitos y órgano linfoide, las muestras fueron fijadas en el campo con fijador glutaraldehido (glutaraldehido 3 %, ClNa 175 mM, cacodilato de sodio100 mM). Las observaciones se hicieron en un microscopio electrónico de transmisión (JEOL 1010) a 80kV.

Mediante análisis de correlación *r* (p=0.05), se analizó las variables continuas. En el análisis de correlación se separó las muestras en dos: animales de hemolinfa azul y animales de hemolinfa rosada. Las variables categóricas fueron sometidas de un test de x^2 (p=0.05), aplicado a tablas de contingencia. Para normalizar los datos porcentuales (fórmula hemocitaria), se transformó mediante arcoseno.

Resultados y Discusión

Análisis histológicos

La histopatología de animales con signos clínicos de la enfermedad mostró nódulos de forma circular a oval en el tejido conectivo esponjoso, bajo el epitelio cuticular del estómago. Estos nódulos estaban constituidos por un número de 3 hasta 19 hemocitos. Los hemocitos rodeaban materiales que parecían núcleos de células infectadas y/o núcleos picnóticos junto a restos celulares. En fases iniciales de esta nodulación se observó 1 ó 2 hemocitos rodeando el núcleo de una célula infectada (Figura 1). Nódulos similares se observaron en el corazón, en la glándula antenal y en los espacios intertubulares de la periferia del hepatopáncreas.

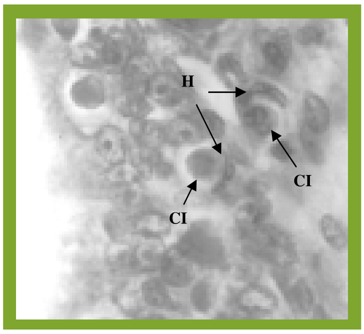


Figura 1. Corte del tejido del estómago. Observese los hemocitos (H) infiltrándose (“colocándose”) entre las células epiteliales para fagocitar (eliminar) células infectadas (CI).

Ultraestructura de los hemocitos en animales infectados

Frotis de hemocitos de animales infectados por WSSV revelaron hemocitos de morfología alterada, grandes hemocitos sin refringencia, de morfología irregular e incluso hemocitos picnóticos. Sin descartar que los hemocitos puedan ser infectados por el WSSV como lo señalan varios autores (Durand *et al*. 1996), las observaciones ultraestructurales no revelaron replicación viral en los hemocitos atípicos. Algunos hemocitos aparentaron estar en proceso de muerte celular (cromatina periférica, núcleos picnóticos, citoplasmas muy vacuolisados). En muchos hemocitos circulantes se observó prolongaciones citoplasmáticas y vacuolas. Estas modificaciones podrían deberse a una activación celular inducida por la presencia de material viral en los animales. Kobayashi y Söderhäl (1990), encontraron evidencia de que la presencia de "material reconocido como no propio", puede activar los hemocitos del cangrejo *Pacifastacus leniusculus*. Algunas vacuolas encerraron membranas y material no identificado, aparentando ser fagosomas. Las imágenes de fagocitosis fueron más claras en los hemocitos infiltrantes del órgano linfoide (Figura 2), en acuerdo con lo señalado por Jonhson (1987), quien indicó que la fagocitosis es más probable en espacios hemales estrechos con reducida presión hidrostática y flujo lento, debido a mayores probabilidades de contacto del hemocito con las partículas a ser fagocitadas, estas condiciones podrían darse en el órgano linfoide. Por otra parte, Durand *et al.* (1997) ha observado también hemocitos fagocitando WSSV.

Figura 2. Corte del tejido del órgano linfoide. Se observa un hemocito que ha infiltrado este organo fagocitando virus. Nótese la vacuola dentro del hemocito con viriones (Vr). (F: fagosoma)

Parámetros inmunitarios versus infección por WSSV

El período de muestreo coincidió con dos momentos de mayor incidencia de WSSV. La mortalidad no fue excesiva en ese momento (5% de la población inicial, 12 % desde el inicio del muestreo). Hay que considerar que los muestreos se realizaron durante la estación lluviosa (enero), situación que probablemente contribuyó a incrementar la supervivencia (Bayot *et al.* en esta revista).

Uno de los objetivos de este trabajo fue analizar la relación entre la infección por WSSV y la actividad PO en el plasma (responsable de la coloración rosada de la hemolinfa; boletín informativo quincenal, julio 15 del 2000). El análisis estadístico mostró que los animales de hemolinfa rosada tuvieron un número significativamente mayor de casos positivos, en tanto que el mayor número de casos negativos se encontró en los animales de hemolinfa azul (Tabla 1).

Tabla 1. Casos positivos y negativos para WSSV en animales de hemolinfa azul y en animales de hemolinfa rosada.

Animales		WSSV (-)	WSSV (+)	# Total
Hemolinfa azul	#	49	21	70
	%	70	42	
Hemolinfa rosada	#	21	29	50
	%	30	58	
# Total		70	50	120

La relación entre hemocitos atípicos (At) y nivel de infección fue directa y altamente significativa ($p<0.05$) (Figura 3). Este resultado sugiere que las modificaciones en la morfología hemocitaria son proporcionales al grado de infección.

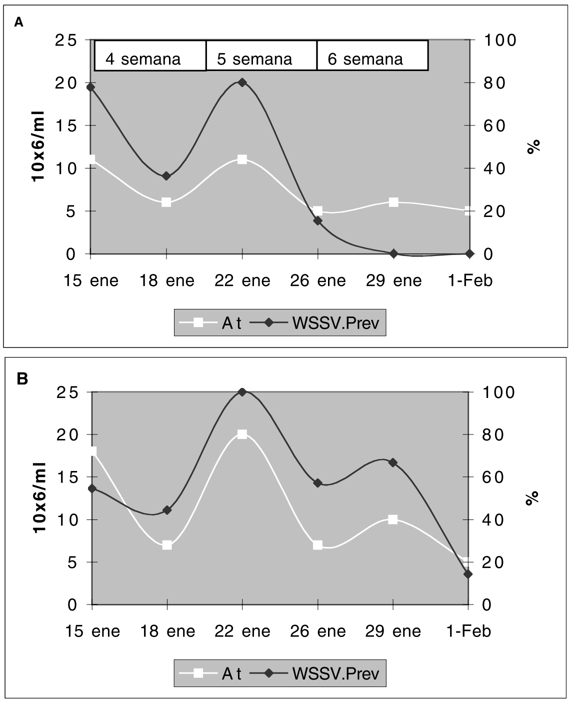


Figura 3. Relación entre el número de hemocitos atípicos (At) en circulación con la prevalencia del WSSV en animales de hemolinfa azul (A) y hemolinfa rosada (B). Nótese la relación directa, a mayor prevalencia mayor número de hemocitos atípicos. (Prev: Prevalencia)

El análisis estadístico mostró además una relación directa y significativa entre hemocitos atípicos y melanización del plasma ($p<0.05$), es decir que cuando el porcentaje de hemocitos atípicos se incrementó, la hemolinfa se tornó rosada. Altos porcentajes de hemocitos atípicos implicarían por una parte baja capacidad de reemplazo con hemocitos nuevos y por otra, libre circulación de células imunitarias desgastadas, las cuales podrían liberar su peligroso contenido en la circulación (el sistema proPO por ejemplo), como ocurre con las células inmunitarias desgastadas de los vertebrados, cuando no son removidas (Savill *et al*. 1993). El mecanismo para evitar esto en los camarones sería la proliferación de nuevos hemocitos, quienes se encargarían de eliminar los hemocitos desgastados.

Ante la infección los animales respondieron generando hemocitos. Mientras más aguda fue la infección, mayor fue el número de hemocitos generados (Figura 4). Esta respuesta sugiere la capacidad en el camarón de reconocer al WSSV como no propio y de reaccionar de manera análoga a la observada en otros artrópodos desafiados con otros microbios. En *P. japonicus* la infección con *Fusarium solani* provocó el incremento de hasta 6 veces de los hemocitos circulantes (Sequeira *et al*. 1996). En la cucaracha *Periplaneta americana* el descenso provocado por la inyección de *Enterobacter cloacae,* es seguido de la proliferación de hemocitos (Ryan y Karp 1993).

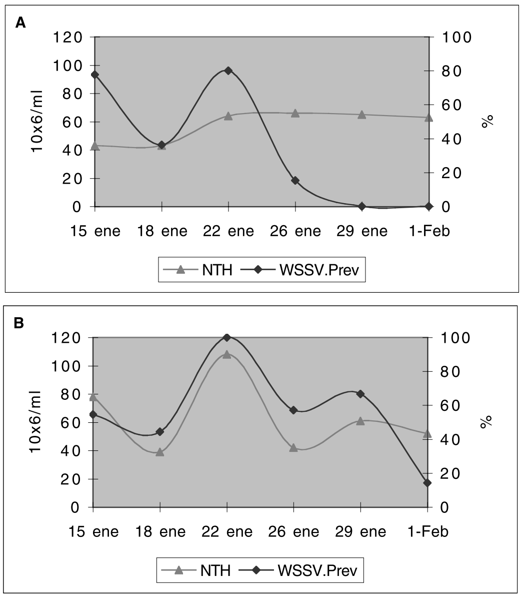


Figura 4. Número total de hemocitos (NTH) y prevalencia (Prev) del WSSV en animales de hemolinfa azul (A) y en animales de hemolinfa rosada (B). A mayor prevalencia del WSSV, mayor número de hemocitos en circulación.

El incremento del NTH y de células normales, estuvo directamente relacionado al incremento de hemocitos semigranulosos (SG). Podría decirse que ellos mantuvieron el balance celular en la hemolinfa. Las caída de SG, observadas en los animales con fuerte carga viral, representaría incapacidad en estos animales de eliminar de circulación, células infectadas, o hemocitos desgastados mediante encapsulación. En ese sentido, nuestros resultados concuerdan con los de Momoyama *et al.* (1994), quien describió células infectadas por WSSV encapsuladas por hemocitos. La bibliografía reporta además que son los hemocitos semigranulosos junto a los granulosos (GR) los que están implicados en los procesos de encapsulación y nodulación (Tsing 1987; Martin *et al.* 1998).

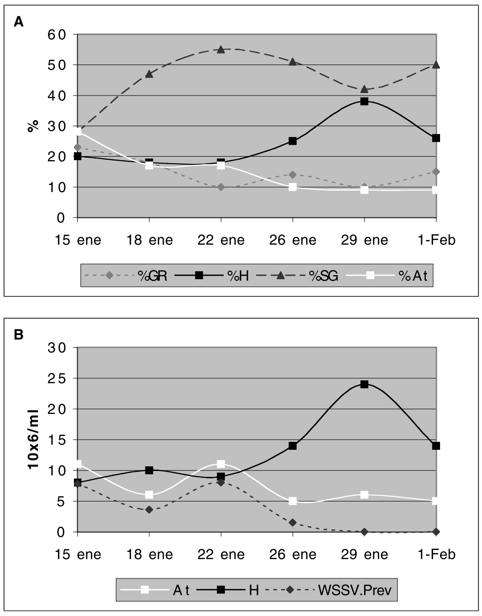


Figura 5. Poblaciones de hemocitos en animales de hemolinfa azul. En A: Fórmula hemocitaria expresada en porcentajes. En B: Nótese la relación inversa entre número de hemocitos hialinos (H) versus la prevalencia (Prev) del WSSV y el número de hemocitos atípicos (At).
GR: Hemocitos granulosos
SG: Hemocitos semigranulosos

Por otra parte, los hemocitos SG están involucrados en las actividades antibacterianas, ellos producen y liberan peneidinas (Destoumieux *et al.* 2000). La caída de hemocitos SG, haría caer también la actividad antibacteriana, lo cual favorecería la aparición de infecciones secundarias. En los animales de hemolinfa azul, nunca se observó declinación en la concentración de hemocitos SG durante el pico de infección.

Los datos de correlación sugieren que los hemocitos hialinos (H) serían una pieza clave de los mecanismos antivirales. Tanto en los animales de hemolinfa azul, como en los de hemolinfa rosada, los hemocitos H se incrementaron cuando la infección viral fue controlada (Figura 5.A, Figura 5.B). Por otra parte los hemocitos atípicos (At) serían generados principalmente a partir de los hemocitos hialinos . La correlación entre ambos grupos celulares fue inversa y significativa tanto en los animales de hemolinfa azul (R= – 0.63) (Figura 5.A), como en los de hemolinfa rosada (R= – 0.86). Otros peneidos responderían de manera similar, así en *Penaeus chinensis* infectado por WSSV Kim *et al.* (1999) observaron incremento en el porcentaje de hemocitos hialinos. Además los hemocitos fagocitadores infiltrantes del órgano linfoide no presentaron gránulos que los acrediten como hemocitos SG o GR, indicando que se trataría de hemocitos hialinos. Estos datos sugieren que la fagocitosis es fundamental dentro de la estrategia celular antiviral del camarón.

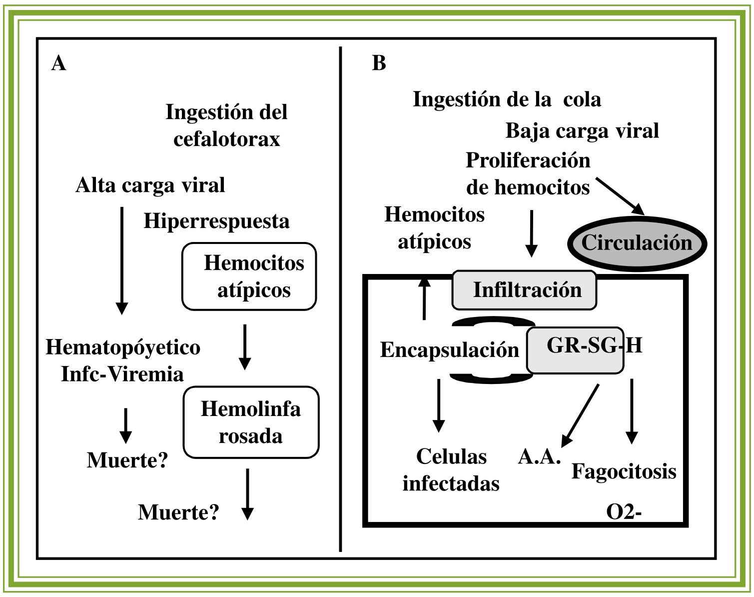


Figura 6. Modelo propuesto de la respuesta inmunitaria celular del camarón ante el WSSV. En A: Respuesta ante una infección con alta carga viral. En B: Respuesta ante una infección con baja carga viral.

Los hemocitos granulosos (GR), disminuyeron en porcentaje hasta prácticamente no detectar su presencia en la hemolinfa, en relación directa a los hemocitos At, tanto en los animales de hemolinfa azul (R=0.73) (Figura 5.A), como en los de hemolinfa rosada (R=0.56). Es difícil deducir si este grupo celular sería el menos generado en número o simplemente se trata del más utilizado en la formación de cápsulas alrededor de la células infectadas y/o hemocitos desgastados, en efecto en *P. japonicus* este sería el principal grupo hemocitario implicado en la encapsulación (Tsing 1987).

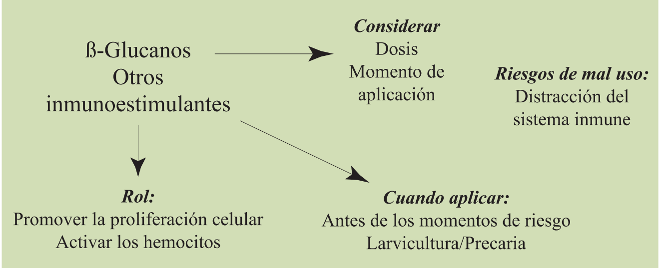
Como resultado de este trabajo, proponemos el siguiente modelo de respuesta inmunitaria en el camarón (Figura 6). Ante la agresión por WSSV el camarón respondería proliferando hemocitos e infiltrandolos en los tejidos infectados y/o tejidos donde se incrementen las posibilidades de encuentro con el patógeno. Los hemocitos hialinos combatirían la agresión viral mediante fagocitosis, en tanto que los SG. y GR. encapsularían células infectadas y hemocitos desgastados. Cuando la proliferación celular se detiene (por infección del tejido hematopoyético por ejemplo), el virus ganaria terreno, en tanto que se acumularían en circulación hemocitos desgastados, los mismos que al liberar su peligroso contenido en la hemolinfa, melanizarían el plasma tornándolo rosado. Sin embargo, no se puede descartar que en ocasiones las altas concentraciones de hemocitos atípicos en la hemolinfa de animales rosados se deba también a una hiperrespuesta inmunitaria dada por camarones que acaban de ingerir tejidos muy infectados de camarones moribundos por WSSV. En efecto, se encontró animales de hemolinfa rosada negativos al WSSV por PCR. Este hecho, evidencia que una hiperrespuesta podría ser eficaz para eliminar al virus. Además, los datos de mortalidad en ese período (12%) sugieren que no todos los animales de hemolinfa rosada mueren ya que ellos llegaron a constituir el 50% de los animales muestreados durante los picos de infección del 15 y el 22 de enero. Probablemente la mortalidad se da en aquellos animales que aún empleando la hiperrespuesta no logran controlar la carga viral y el virus infecta el tejido hematopoyético afectando la capacidad de respuesta del animal, aprovechándose de esto para invadir otros tejidos.

Sin embargo, a pesar de los mecanismos de defensa desplegados, en la mayoría de casos los camarones pierden la lucha contra el WSSV y las supervivencias en piscina son extremadamente bajas, en particular durante la estación seca. Para comprender esto hay que considerar dos factores. El primero, la velocidad de replicación viral; Tang y Lightner, (2000), utilizando una PCR competitiva para cuantificar el genoma de WSSV, luego de una infección por inyección, determinaron que entre las 24 a 35 horas de postinfección, la cantidad de WSSV se incrementó 140 veces en los tejidos. Probablemente animales inmunodeprimidos (debido a factores estresantes en el estanque o a bajas temperaturas) no estén en capacidad de frenar la invasión viral en sus tejidos, siendo ellos los primeros en morir. El segundo factor es el canibalismo del camarón unido a la alta densidad de la población en las piscinas. La ingestión de animales muertos por WSSV provocaría una agresiva propagación, viral incontrolable por los mecanismos de defensa de los animales, desencadenando la mortalidad en el estanque.

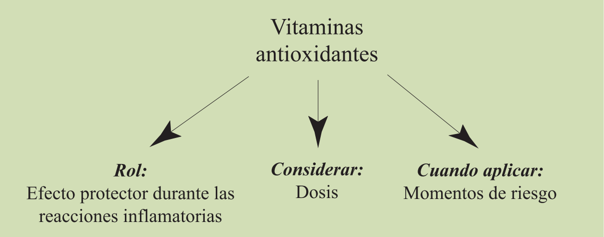
Perspectivas de aplicación para el manejo preventivo de la Mancha Blanca

Los resultados de este trabajo así como los de temperatura (Sonnenholzner *et al.* en esta revista) indican en el camarón una eficaz respuesta inmunitaria celular para acorralar al WSSV e incluso eliminarlo si el animal se encuentra en las condiciones fisiológicas adecuadas. A 33°C, incluso cargas virales muy altas son inofensivas para los animales y actúan como inmunoestimulante. El problema es como recrear esas condiciones fisiológicas a temperaturas más bajas. Afortunadamente, el sistema inmune del camarón es muy manejable y responde favorablemente (o desfavorablemente) a la inmunomodulación, la cual puede enfocarse desde dos aspectos, inmunoestimulación o control de la salud del animal, manejando requerimientos nutricionales necesarios para una eficaz respuesta inmune.

En cuanto a inmunoestimulación es vital considerar, los inmunoestimulantes como lo que son, una medicina preventiva, su función es recrear una situación de desafío microbiano inofensiva para el camarón, pero capaz de alertar el sistema inmune, induciendo la proliferación de hemocitos. En términos prácticos esto significa que la dosis es vital para no desgastar a los animales. Por otra parte, los inmunoestimulantes deben ser aplicados antes y no durante la infección ya que en ese caso actuarían como elementos de distracción del sistema inmune. En el caso de B-glucanos, nosotros recomendamos dosis de 75 mg de producto activo por Kg de alimento, a ser aplicado después de la muda hasta que el camarón alcanza su máxima rigidez. Por otra parte tenemos evidencia de que la aplicación de inmunoestimulantes en estadios larvales podría acelerar el desarrollo y maduración del sistema inmune de los animales preparándolos para responder mejor a desafíos microbianos, cuando son prejuveniles.



En cuanto a nutrientes capaces de mejorar la respuesta inmune de los animales, antes de su aplicación en el campo, es imperativo realizar estudios controlados en laboratorio a fin de establecer las dosis adecuadas. Considerando las vitaminas antioxidantes C y E, en los actuales momentos sabemos que existe un rango óptimo de aplicación (Molina *et al.* en esta revista) cantidades inferiores son ineficaces en tanto que dosis exageradas son contraproducentes y perjudican la respuesta inmune y la resistencia del camarón al WSSV.



Por otra parte una estrategia muy interesante es el manejo de la salud del animal mediante probióticos, los mismos que pueden actuar a la vez como inmunoestimulantes (Gulliam *et al*. 2001).

Agradecimientos

Expresamos nuestros agradecimientos a los camaroneros que facilitaron el muestreo en sus granjas para realizar este trabajo.

Bibliografia

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

Destoumieux, D., Muñoz, M., Cosseau, C., Rodríguez. J., Bilet, P., Comps, M. y Bachere, E. 2000. Penaeidins, antimicrobial peptides with chitin-binding activity, are produced and stored in shirmp granulocytes and released after microbial challenge. Journal of Cell Science. 113: 461-469.

Durand, S., Lightner, D. V., Nunan, L. M., Redman, R. M., Mari, J., y Bonami, R. 1996. Application of gene probe as diagnostic tools for White Spot Baculovirus (WSBV) of penaeid shrimp. Dis. Aquat. Org. 27: 59-66.

Durand, S., Lightner, D. V., Redman, R. M., y Bonami, R. 1997. Ultraestructure and morphogenesis of White Spot Syndrome Baculovirus (WSSV). Disease Aquatic Organisms. 29: 205-211.

Echeverria, L. F. 1997. Desarrollo de un ensayo de cuantificación de la actividad fenoloxidasa (PO) como una herramienta de inmunoevaluación del camarón *Penaeus vannamei*. Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas CENAIM. 1-17.

Johnson, P. T. 1987. A review of fixed phagocytic ands pinocytic cells of decapod crustacean, with remarks on hemocytes. Developmental and Comparative Immunology. 11: 679-704.

Kim, Y. J., Choi, W. Ch., Kim, H. R., Jung, S. J., y Oh, M. J. 1999. Changes in *Penaeus chinensis* haemocytes during white spot baculovirus (WSBV) infections. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 19(5): 213-215.

Kobayashi, M., y Söderhäll, K. 1990. Comparison of concanavalina a reactive determinants on isolated haemocites of parasite infected and non-infected fresh water crayfish. Disease Aquatic Organisms. 9: 141-147.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., y Randall, R.J. 1951. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.

Martin, G.G., Kay, J., Poole, D., y Poole, C. 1998. In vitro nodule formation in the ridgeback prawn, *Syciona ingentis*, and the american lobster, *Homarus americanus*. Invert. Zool. 117: 155-168.

Momoyama, K., Hiraoka, M., Nakano, H., Koube, H., Inouye, K. y Oseko, N. 1994. Mass Mortality of Cultured Kuruma Shrimp *Penaeus japonicus,* in Japan in 1993: Histopathological study. Electron microscope evidence of the causative virus. *Fish Pathol*., 29, 149-158. Acuacultura del Ecuador. 33: 26-29.

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

Ryan, N.A., y Karp, R.D. 1993. Stimulation of hemocyte proliferation in the american cockroach (*Periplaneta americana*) by injection of *Enterobacter cloacae*. Journal of Insect Physiology. 39(7): 601-608.

Savill, J., Fadok, V., Henson, P., y Haslett, C. 1993. Phagocyte recognition of cell undergoing apoptosis. Inmunology Today. 14 (3): 131-136.

Sequeira, T., Tavarest, D., y Arala-Chaves, M. 1996. Evidence for circulating hemocyte proliferation in the shrimp *Penaeus japonicus*. Develelopmental and Comparative Immunology. 20 (2): 97-104.

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

Tapia., L. 1997. Optimización de ensayos antibacterianos y estudios sobre la inducción de la actividad antibacteriana en el hemolinfa del camarón *Penaeus vannamei*. Tesis de Acuicultura. Facultad de Ingeniería Marina y Ciencias del Mar. Escuela Superior Politécnica del Litoral-Ecuador. Guayaquil, Ecuador.

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.