WSSV Y CICLO DE MUDA EN EL CAMARÓN BLANCO *LITOPENAEUS VANNAMEI*

Fabrizio Echeverría, Victor Otero, Fitis Cornejo y Jenny Rodríguez
Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas - CENAIM

Introducción

El camarón como todos los crustáceos, necesita remover y reemplazar periódicamente su exoesqueleto rígido para seguir creciendo. Este proceso es una fuente intrínseca de variaciones etológicas, fisiológicas e inmunitarias. Dichas variaciones, sumadas a la pérdida de la cutícula, (primera barrera defensiva en los crustáceos), son algunos de los factores que probablemente influyen en la resistencia y/o susceptibilidad de los crustáceos a los patógenos. Así, Le Moullac *et al.* (1997), encontraron que *Penaeus stylirostris* es más sensible al vibrio patógeno AM23 durante la premuda que durante la intermuda. Adicionalmente, Hasson *et al.* (1999) reportaron que TSV ocasiona la mortalidad de *Litopenaeus vannamei* en D4 (tardía premuda) o en E (exuvia). Por otra parte información anecdótica señala que los animales que mueren por WSSV son blandos al tacto. El ciclo de muda fue dividido en cinco estadios por Drach (1939) y son: postmuda (A,B) Intermuda (C), Premuda (D0, D1, D2, D3) y exuvia (E).

Los cambios bioquímicos, biológicos así como las modificaciones morfológicas en la epidermis de los crustáceos influyen también en el sistema inmune. Algunos estudios señalan cambios del hemograma durante el ciclo de muda. Tsing *et al*. (1989), con *Penaeus japonicus* y Le Moullac *et al*. (1997), con *Penaeus stylirostris*, encontraron el mayor número de hemocitos durante la postmuda y el menor número durante la intermuda. Similares variaciones fueron observadas, en *Sicyonia ingentis* en el cual la mayor liberación de hemocitos del tejido hematopoyético ocurrió en postmuda (Hose *et al*. 1992). En cuanto a la fórmula hemocitaria, el mayor número de hemocitos granulares, ha sido observado en intermuda en *P. stylirostris* y *S. Ingentis* (Le Moullac *et al*. 1997; Hose *et al*. 1992). En tanto que se ha reportado que el pico de las células hialinas ocurre durante el período de exuvia en *S. ingentis* y *en P. japonicus* (Hose *et al*. 1992; Sequeira *et al.* 1995).

Considerando que la respuesta inmune del hospedero es vital para enfrentar la agresión viral y que está sujeta a modificaciones según el estadio de muda, desde que se iniciaron los trabajos para estudiar y/o manejar el Virus de la Mancha Blanca (WSSV), se ha seguido el estadio de muda de los animales, tanto en el campo como en el laboratorio. Información obtenida de los primeros monitoreos en camaroneras, reporta mortalidades masivas en periodos de cuadraturas, conocidos también como quiebras, generalmente los animales se sincronizan para mudar en esos periodos. Ensayos de desafío describen la presencia de exuvios, previo a las mortalidades, como un indicador de que la infección se desarrolló. Las observaciones descritas anteriormente nos plantean las siguientes interrogantes:

¿El WSSV modifica el ciclo de muda?,

¿Ciertos estadios de muda representarían puertas de infección y propagación del virus?,

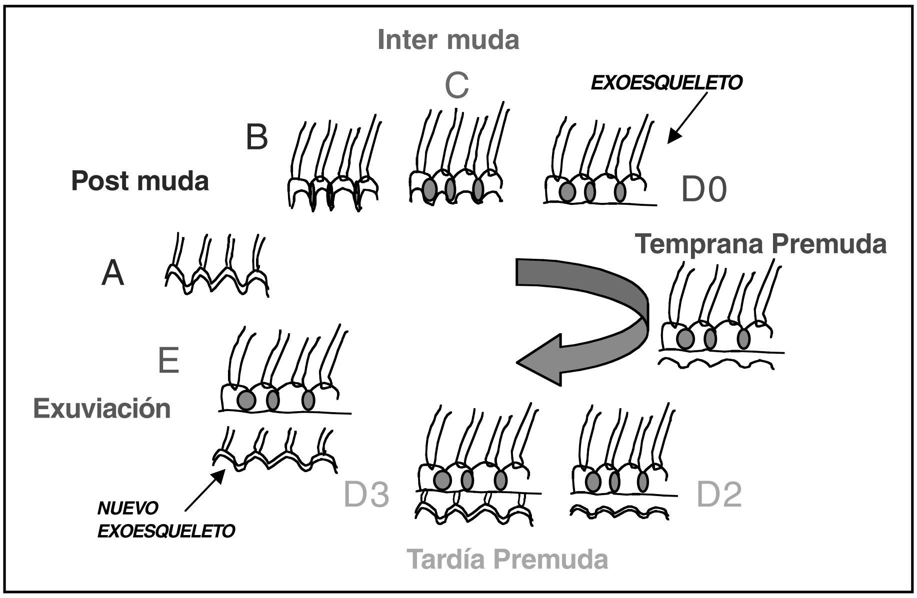
¿Debe considerarse al ciclo de muda en el diseño de estrategias de manejo?

En este trabajo analizamos datos obtenidos de muestreos en camaronera durante los picos de infección y de ensayos de desafío con WSSV. Con los datos de camaronera se comparó la prevalencia del WSSV con los estadios de muda, la respuesta inmune y la susceptibilidad al WSSV. En laboratorio, se analizó la mortalidad en función del estadio de muda y la influencia del virus sobre el ciclo de muda.

Materiales y Métodos

Control de muda

El estadio de muda se determinó observando los urópodos al microscopio siguiendo el protocolo descrito por Robertson *et al*. (1987). Gráfico:



Muestreo en camaronera

En una piscina de camaronera localizada en Engunga-Guayas. Se realizaron muestreos sistemáticos a partir de la tercera semana hasta la sexta semana posterior a la siembra (2 muestreos por semana), Se colectaron 20 camarones por muestreo cuyo peso osciló entre 0,9 y 3,0 g. Los animales fueron analizados individualmente para WSSV por PCR (IQ 2000), hemograma (conteos totales y diferenciales de hemocitos), color de la hemolinfa y estadio de muda de los animales. Un estudio paralelo en inmunología de *L. vannamei*, señaló el color de hemolinfa (rosado/azul), como un indicador de enfermedad de WSS, por lo que para efecto de análisis de datos, los animales fueron divididos en dos poblaciones de acuerdo al color de la hemolinfa

Otros análisis inmunitarios fueron, actividad antibacteriana (AA), según el protocolo de Tapia (1997); actividad fenoloxidasa (PO), siguiendo el protocolo estandarizado por Echeverría (1997); detección del anión superóxido (O^-_2) mediante la técnica de Muñoz *et al*. (2000) y cuantificación de proteínas en el plasma (Lowry *et al*. 1951). Para estos análisis se utilizaron mezclas de hemolinfa provenientes de los veinte animales de cada muestreo. Las mezclas se prepararon separando las muestras azules de las rosadas. Mediante análisis de correlación Pearson *r* a un nivel de significancia p£0.05, se analizaron las variables continuas. Los datos porcentuales fueron normalizados mediante transformación con arcoseno.

Ensayos de desafío en laboratorio

Con el objetivo de verificar los estadio de muda de animales infectados, se realizaron pruebas de desafío con WSSV.

Preparación del inóculo viral

El inóculo viral se preparó siguiendo el protocolo de Chou *et al.* (1998). Para esto, se tomó branquias de animales infectados, las cuales fueron homogenizadas con tampón TN (0.4M de ClNa, 20 mM de Tris HCl pH 7.2). La mezcla fue centrifugada a 1000g y filtrada con filtro de 0.45 mm. Luego fue almacenada a –80˚C.

Primer ensayo de desafío

En este ensayo se realizó una prueba de infección con el WSSV en camarones. En 5 acuarios se inoculó el virus activo y en otros 5 acuarios se inoculó virus inactivo (sometido a autoclave por 15 minutos a 121ºC y a15 libras de presión). Los acuarios que recibieron el inóculo activo fueron mantenidos en una sala de infección experimental. Mientras que, los que recibieron el inóculo inactivado estuvieron en una sala diferente, a fin de evitar la contaminación. La inoculación del virus se realizó durante dos días a una concentración de 37500 viriones/µl de solución viral (1.5 ml de solución viral/8 litros de agua). Antes de cada inoculación se descendió el volumen de agua a 8 litros, manteniéndose este nivel durante 8 horas. Se determinó el estadio de muda de los camarones muertos.

Segundo ensayo de desafío

En este ensayo, 128 animales fueron distribuidos en 32 frascos de vidrio a razón de 4 animales por frasco; 16 frascos recibieron un inóculo de WSSV a razón de 750 ul de solución viral/1.5 litros de agua de mar, en tanto que los 16 frascos restantes sirvieron de control. Se retiraron periódicamente los exuvios, varias veces al día, durante 13 días.

RESULTADOS

WSSV y estadíos de muda

Los animales de hemolinfa azul, presentaron los picos de infección en los muestreos del 15 y 22 de enero (Figura 1), encontrándose que en el primer muestreo alrededor del 45% de los animales en intermuda y el 55% en temprana premuda (Figura 2). Se observó que en los momentos de baja prevalencia, a partir del 29 de enero, los animales se encontraron en temprana y tardía premuda.

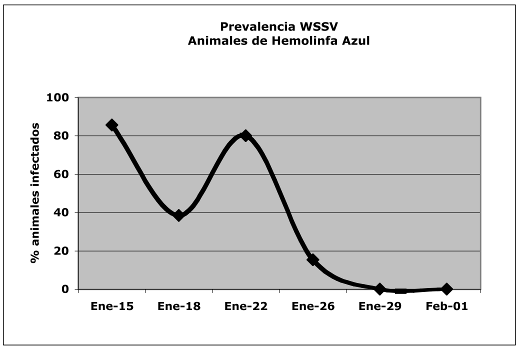


Figura 1. Prevalencia WSSV, animales de Hemolinfa Azul

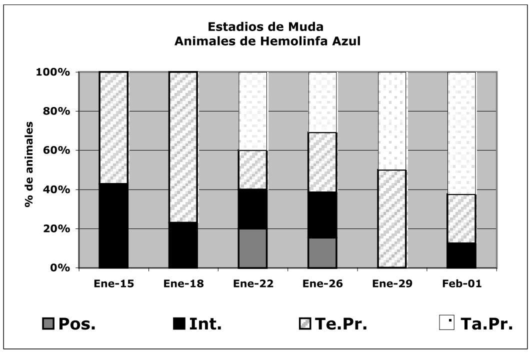


Figura 2. Distribución de Estadíos de muda, Animales de Hemolinfa Azul

En los animales de hemolinfa rosada, el mayor pico de infección ocurrió el 22 de enero (Figura 3). El 20% de los animales se encontraron en intermuda, el 40% en temprana premuda y el 40% en tardia premuda (Figura 4). El segundo pico de infección fue el 26 de enero donde los animales en intermuda alcanzaron el 45%, mientras que el resto de la población se encontró en temprana y tardía premuda. Estos fueron muy similares al los que se presentaron el 15 de enero los animales de Hemolinfa azul. A partir del 29 de enero, cuando la infección comienza a decaer, el 70% de los animales de hemolinfa rosada parecen entrar en temprana premuda, el 20% en tardía premuda y un 10% aparecieron en postmuda, los mismos que el 1de febrero estuvieron en intermuda 10%.

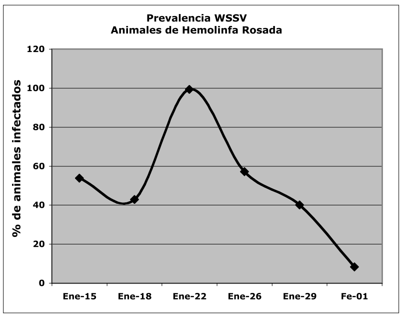


Figura 3. Prevalencia WSSV, animales de Hemolinfa Rosada

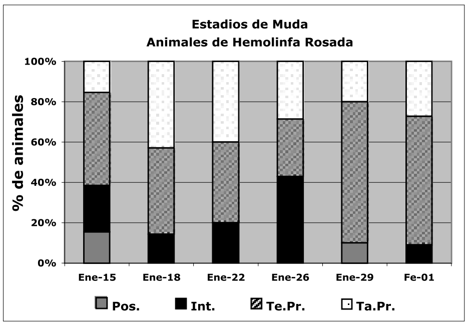


Figura 4. Porcentaje de Estadíos de muda, Animales de Hemolinfa Rosada

Tanto en los animales de hemolinfa azul como en los de hemolinfa rosada se observó una relación directa entre positivos paraWSSV e intermuda. Paralelamente, en los animales de hemolinfa azul, la correlación entre WSSV y premuda (temprana y tardía) fue inversa, en tanto que en los animales de hemolinfa rosada la correlación entre WSSV y tardía premuda fue directa.

Los animales infectados en el estadio C y en D-0, estuvieron en su mayoría en nivel muy leve de infección. Aunque el número y porcentaje de animales infectados se mantuvo bajo en D-1, se incrementó el nivel de infección en los animales. (Tabla 1).

En cuanto a los parámetros inmunitarios, se encontraron diferencias significativas (p= 0.05) en los hemogramas,

Tabla 1.Tabla de contingencia que permite relacionar estadísticamente el nivel de infección y el número de animales en cada estadio de muda. Nótese que la mayoría de los animales PCR- están en temprana premuda (D-0, D-1) y los PCR+ están en intermuda (C) y tardía premuda (D-2) aunque con un nivel leve.

	ESTADIO DE MUDA							
WSSV	**B**	**C**	**D-0**	**D-1**	**D-2**	**D-3**	**E**	**Total**
PCR –	4	9	13	24	13	6	1	70
PCR +	3	19	8	11	14	1	0	50
Total	7	22	21	35	27	7	1	**120**
Nivel de infección								
muy leve	3	12	7	5	11	1	0	39
leve	0	0	0	1	3	0	0	4
medio	0	0	0	1	0	0	0	1
severo	0	1	1	4	0	0	0	6

específicamente en cuanto a la concentración de hemocitos hialinos en los estadios de muda, donde se apreció que estas poblaciones hemocitarias se incrementan en temprana premuda (Tabla 2).

Tabla 2. Tabla de contingencia que permite relacionar estadísticamente rangos de concentración (de baja o muy alta) de hemocitos con el número de animales en cada estadío de muda. Nótese que, alta concentraciones de hemocitos se encuentran en animales en temprana premuda (D-0)

	ESTADIO DE MUDA							
Rango de concentración	**B**	**C**	**D-0**	**D-1**	**D-2**	**D-3**	**E**	**Total**
Baja HH	5	15	7	12	10	2	0	51
Media HH	4	7	10	14	7	2	0	44
Alta HH	0	4	9	5	8	2	1	29
Muy Alta HH	0	0	1	9	5	1	0	16
Total	9	26	27	40	30	7	1	140

Mayores concentraciones en temprana premuda (D-0, D-1)

Mortalidad en postmuda

Al verificar el estadio de muda de los animales muertos por WSSV en el primer ensayo de desafío, se observó que éstos se encontraron en mayor porcentaje en postmuda (estadio A y B), (Figura 5), lo que explicaría la textura blanda de los animales que mueren por WSSV.

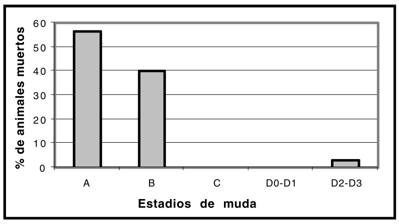


Figura 5. Estadíos de muda de los animales muertos por WSSV. La mayoría se encuentran en postmuda.

Aceleración de la muda

Información no publicada señalan que en ensayos de desafío con WSSV se presenta una gran cantidad de exuvios justo antes de iniciarse las mortalidades. Por otra parte, en las piscinas se han observado mortalidades precedidas de una muda generalizada. Con la finalidad de determinar si el virus tiene alguna influencia sobre el ciclo de muda, se realizó un ensayo de desafío, en el que se cuantificaron los exuvios de los animales infectados y no infectados. Como se puede observar en la Figura 6 el porcentaje de exuvios fue significativamente mayor en los animales infectados, el segundo día de postinfección, justo antes del inicio de las mortalidades (Figura 7).

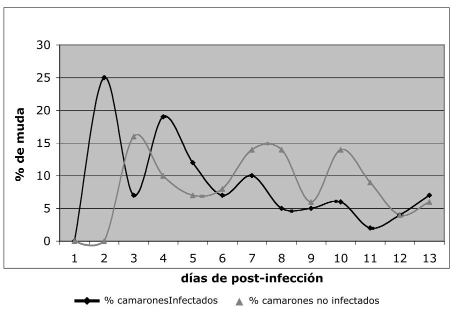


Figura 6. Relación entre muda y mortalidad. Porcentaje de muda en animales infectados y no infectados con WSSV.

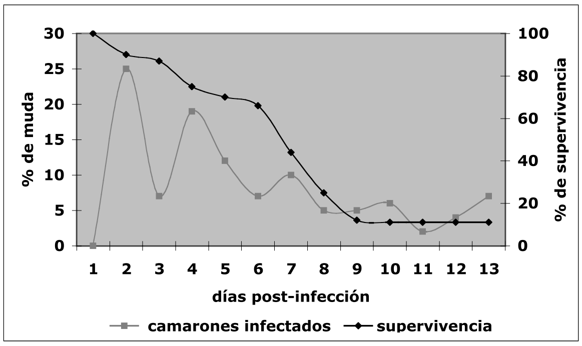


Figura 7. Relación entre muda y mortalidad. Porcentaje de muda y mortalidad en los animales infectados.

Discusión

Los resultados de hemograma en los animales de hemolinfa azul concuerdan con los reportados por la literatura, en cuanto a conteos diferenciales, los resultados sugieren que los hemocitos hialinos serían más abundantes en premuda, coincidiendo con lo reportado por Sequeira *et al.* (1995) para *P. japonicus,* quienes señalaron la presencia de un elevado número de células hialinas en el período ecdycial (cuando la cutícula está débil). El incremento de hemocitos hialinos en este período estaría relacionado a la coagulación y a la formación de la cutícula (Hose *et al*. 1992). Por otra parte los hemocitos hialinos serían responsables de la producción de los difenoles necesarios para el teñido de la cutícula (Vacca y Fingerman 1983).

El hemograma de los animales rosados mostró modificaciones. Sin embargo, es necesario considerar que estos animales fueron los más infectados por WSSV, factor que probablemente provocó las modificaciones.

El alto porcentaje de animales infectados en el estadio C, podría estar relacionado con el apetito de los animales y sus hábitos caníbales. En intermuda los animales ingieren mucho alimento (Molina y Cadena 2001). Los resultados sugieren que en temprana premuda, particularmente en D0, los animales son más resistentes al WSSV. Los parámetros inmunitarios correlacionados con la temprana premuda fueron hemocitos hialinos y generación del O_2^-. Estos dos parámetros mostraron también correlación inversa significativa con prevalencia del WSSV (Montesdeoca *et al*. 2001) sugiriendo que serían elementos claves en la estrategia antiviral del camarón.

Los resultados encontrados en este estudio en las camaronera y en infecciones experimentales, indican que los camarones que no logran controlar la infección viral en temprana premuda, pasarían con una fuerte infección a tardía premuda, la cual posiblemente se beneficia de las modificaciones fisiológicas asociadas a la muda, como son disminución de la tasa de ingestión del alimento (el animal comienza a utilizar sus reservas energéticas) (Molina y Cadena 2001) y el incremento de la actividad de las células epiteliales (uno de los tejidos preferidos del WSSV), actividad que favorece la replicación del virus, provocando mortalidades en postmuda.

Nuestras observaciones sugieren además que el virus acelera la muda. No sólo una muda generalizada precedió el inicio de la mortalidad, sino que además en todo el bioensayo se recolectó mayor número de exuvios en los animales infectados que en los no infectados, a pesar de la caída de la población experimentada por los primeros. Por otra parte, los urópodos de animales con infección aguda mostraron, a más de graves daños cuticulares, varios estadios a la vez (D0, D1, D2, D3)(datos no mostrados). Desconocemos el mecanismo que utilizaría el WSSV para perturbar el ciclo de muda en el camarón, siendo necesario realizar más estudios sobre el tema. En insectos existe la hipótesis de que el baculovirus perturba los eventos hormonales que conducen a la muda, deteniendo el ciclo (Beckage 1996). Sin embargo provocar la mortalidad en postmuda favorecería la propagación del virus, muchas partículas virales serían liberadas con los exuvios, en tanto que los animales blandos y debilitados serían presa fácil de los animales sanos.

El control microscópico de la muda realizado a la par de otras técnicas de detección y diagnóstico del WSSV, tales como PCR y/o histología, ayudarían al productor camaronero a tomar medidas preventivas (suministro de buen alimento, utilización de atractantes o inmunopotenciadores) durante los periodos de mayor riesgo de infección (intermuda) y a evitar las situaciones de estrés, durante el periodo de exuvia, momento en que se incrementan los riesgos de mortalidades masivas.

Bibliografía

Beckage, N. E. 1996. Interactions of viruses with invertebrate cells. In: Söderhäll K., Sadaaki, I., Vasta, G. (Eds.), New Directions in Invertebrate Immunology. SOS Publications, Fair Haven. pp. 109-129.

Chou, H. Y., Huang, C., Lo, C. C., y Kou, G. H. 1998. Studies of transmission of white spot syndrome associated baculovirus (WSB) in *Penaeus monodon* and *Penaeus japonicus* via water-borne contact and oral ingestion. Aquaculture. 164: 263-276.

Drach, P. 1939. Mue et cycle d´intemue chez les crustacés décapodes. Ann Inst. Oceanogr. 19: 103-391.

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. 1-17.

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.*

Hose, J. E., Martin, G.G., Tiu, S., y McKrell, N., 1992. Patterns of hemocyte production and release throughout the molt cycle in the penaeid shrimp Sicyona ingentis. Bioll. Bull. 183: 185-199.

Le Moullac, G. M., Le Groumellec, M., Ansquer, D., Froissard, S., Levy, P., y Aquacop. 1997. Haematological and phenoloxidase activity changes in the shrimp *Pennaeus stylirostris* in relation with the moult cycle: protection against vibriosis. Fish and Shellfish Immunology, 7: 227-234.

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.

Molina, C., y Cadena, E. 2001. Alimentación de camarones en relación a la actividad enzimática como una respuesta natural al ciclo de muda. El mundo Acuicola. 7(1): 54-57.

Montesdeoca, M.; Amano, J.; Echeverria, F.; Romero, X.; Sotomayor, M.; Betancourt, I.; Panchana, F. y Rodríguez, J. 2001. Modificaciones en los parámetros inmunitarios de camarones *Penaeus vannamei* infectados con WSSV en piscinas. VI Congreso Ecuatoriano de Acuicultura, 24-27 Octubre, Guayaquil, Ecuador.

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.

Robertson, L., Bray, W., Leung-Trujillo, J. y Lawrence, A. 1987. Practical molt staging of Penaeus setiferus and Penaeus stylirostris. J. of World Aquaculture Society. 18 (3): 180-185.

Sequeira, T., Vilanova, M., Lobo-Da-Cunha, A., Baldaia, L. y Arala-Chavez, M. 1995. Flow cytometric analysis of molt-related changes in hemocyte type in male and female *Pennaeus japonicus*. Biol. Bull., 189: 376-380.

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., Arcier, J. M. y Brehelin, M. 1989. Hemocytes of penaeid and palaemonid shrimps: Morphology, Cytochemistry, and haemograms. J. Invert. Pathol., 53: 64-77.

Vacca, L. L., y Fingerman, M. 1983. The roles of hemocytes in tanning during the molting cycle: A histochemical study of fiddler crab, Uca pugilator. Bioll. Bull. 165: 758-777.