



UNIVERSIDAD ESTATAL
PENÍNSULA DE SANTA ELENA
FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR
ESCUELA DE BIOLOGÍA MARINA

Efecto del IGF (Factor de crecimiento tipo insulina) y IGFBP (Proteína de fijación al Factor de crecimiento tipo insulina) sobre la talla de camarones *Penaeus vannamei* y su resistencia al WSSV (Virus del síndrome de la Mancha blanca).

TESIS DE GRADO

Previa a la obtención del Título de:

BIÓLOGO MARINO

JUAN CARLOS RODRIGUEZ RODRIGUEZ

LA LIBERTAD – ECUADOR

2015

UNIVERSIDAD ESTATAL
PENINSULA DE SANTA ELENA
FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR
ESCUELA DE BIOLOGÍA MARINA

**Efecto del IGF (Factor de crecimiento tipo insulina) y IGFBP
(Proteína de fijación al Factor de crecimiento tipo insulina) sobre
la talla de camarones *Penaeus vannamei* y su resistencia al WSSV
(Virus del síndrome de la Mancha blanca).**

TESIS DE GRADO

Previa a la obtención del Título de:

BIÓLOGO MARINO

JUAN CARLOS RODRIGUEZ RODRIGUEZ

LA LIBERTAD – ECUADOR

2015

DECLARACIÓN EXPRESA

“La responsabilidad por los hechos, ideas y doctrinas expuestos en esta tesis, me corresponden exclusivamente; y el patrimonio intelectual de la misma, al Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas (CENAIME-ESPOL).”

Juan Rodríguez Rodríguez
C.I. 0927268375

DEDICATORIA.

Dedico esta tesis a Dios, por brindarme fortaleza y fuerzas para cada día sobreponerme a las adversidades.

A mi fiel compañera de lucha mi amada esposa Jenny Suarez, por brindarme su apoyo, comprensión y amor durante todo este tiempo.

A mi hermosa, bella y linda hija Karlita Rodríguez, mi inspiración para mi superación.

A mis padres, Lucrecia “mi estrella en el cielo”, Pascuala, Alfonso y Agustín, gracias por inculcarme buenos valores y apoyo incondicional para mi superación.

A mis tíos y tías.

A todos ustedes dedico este trabajo.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, especialmente a mi Madre (Pascuala) y a mis padres (Alfonso y Agustín) por la paciencia y el apoyo brindado, fundamental para la culminación de esta etapa de mi vida.

Al Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas (CENAIM) y a su Director, Ph.D. Stanislaus Sonnenholzner, por brindarme la oportunidad de desarrollar mi Tesis de grado. Al coordinador científico del CENAIM, Ph.D., Bonny Bayot por permitir que se desarrolle mi tesis de grado.

A mi tutora-CENAIM, Ph.D Jenny Rodríguez León, mentalizadora del área de biodiversidad, por su disponibilidad, asesoría y confianza para el desarrollo de mi tesis de grado. A mi tutora-UPSE, Ph.D. María Herminia Cornejo, por su enseñanza, y sugerencias oportunas en el desarrollo de esta investigación.

A la Universidad Estatal Península de Santa Elena, A los directivos: al Ing. Gonzalo Tamayo Castañeda, Decano de la Facultad Ciencias del Mar y al Blgo. Richard Duque Marín, Director de la carrera de Biología Marina, por el apoyo brindado en mi formación profesional.

A los jefes y colaboradores de las áreas del CENAIM, Tnlga. Fanny Panchana, Ing. Bolívar Chalen, Blga. Cecilia Tómala. También agradezco a Rosa Malavé “Rosita” y Ramiro Solórzano, por brindarme su apoyo en cada momento difícil, y de manera muy especial a Gabriela Agurto y a mi gran amigo Cristóbal Domínguez “Gracias por todo Padrino”

TRIBUNAL DE GRADUACIÓN

Ing. Gonzalo Tamayo C.

Decano Facultad Ciencias del Mar

Blgo. Richard Duque M. Mgt.

Director Escuela Biología M.

Ph.D. María Herminia C.

Profesora Asesor

Ing. Jimmy Villón M.

Profesor de área

Ph.D. Jenny Rodríguez León.

Directora de tesis

Ab. Joe Espinoza Ayala. Mgt.

Secretario General-Procurador

ÍNDICE GENERAL.

	Pag.
DECLARACIÓN EXPRESA.....	i
DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
TRIBUNAL DE GRADO.....	iv
ÍNDICE GENERAL.....	v,vi
ÍNDICE DE TABLAS.....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii,ix
GLOSARIO.....	x-xii
ABREVIATURAS.....	xiii, iv
1. RESUMEN.....	xv
2. INTRODUCCIÓN.....	1-3
3. JUSTIFICACIÓN.....	4,5
4. OBJETIVOS GENERAL.....	6
5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	6
6. HIPÓTESIS.....	7
7. MARCO TEÓRICO	
7.1. Producción camaronera ecuatoriana.....	8,9
7.2. Limitantes para la camaronicultura en el ecuador.....	9-12
7.3. Generalidades del virus del síndrome de la mancha blanca Virus (WSSV).....	13, 14
7.3.1. Propagación del WSSV.....	15
7.3.2. Distribución Geográfica de WSSV.....	15
7.3.3. Detección del virus WSSV.....	16
7.4. Técnicas para la detección de WSSV.....	16, 17
7.5. Respuesta inmune de los crustáceos.....	17, 18
7.6. Comportamiento celular de los crustáceos.....	18-20
7.7. Clasificación de los hemocitos.....	20,21
7.8. Apoptosis.....	21,22
7.9. Relación edad y WSSV.....	22
7.10. Factor de crecimiento tipo insulina (IGF).....	23
7.10.1. Péptidos tipo insulina en crustáceos.....	24
8. MARCO METODOLÓGICO	
8.1. Estrategia de estudio.....	25-27
8.2. Sistema de monitoreos.....	27
8.2.1. Obtención de muestras.....	28
8.3. Prueba de desafío con WSSV.....	28-30
8.3.1. Técnicas histológicas.....	30-32
8.3.2. Elisa: “Enzyme-Linked Immunosorbent Assay” (CENAIM - ESPOL).....	33,34
8.4. Parámetros inmunitarios.....	34

8.5. Interpretación y análisis de resultados.....	34
9. ANALISIS E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS	
9.1.- Separación de tallas grandes y pequeños.....	35
9.2.- Supervivencia y peso de camarones sembrados en el sector “A” CENAIM - PALMAR.....	36-39
9.2.1- Análisis de supervivencia y peso de camarones sembrados en el sector “A” CENAIM - PALMAR en cosecha.....	39-42
Análisis de supervivencia.....	39,40
Análisis de peso.....	39,40
Correlación entre peso y supervivencia en piscinas.....	40-42
9.3.- Supervivencia y peso de camarones en el desafío con WSSV.....	42-44
9.4. Inmuno dosificaciones mediante ELISA de los factores de crecimiento IGF e IGFBP en los camarones antes y después de la infección experimental.....	45
9.5. Parámetros inmunitarios en animales grandes y pequeños infectados y no infectados con WSSV.....	45-47
9.6. Hemogramas de hemocitos en camarones silvestres pequeños, grandes y domesticados en desafío.....	47,78
10. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	
10.1. Conclusiones.....	49,50
10.2. Recomendación.....	50
11. BIBLIOGRAFÍA.....	51-66
12. ANEXOS.....	67-83

ÍNDICE DE TABLAS.

	Pag.
Tabla 1.- Detalles de la siembra sector “A”; código P (pequeños), G (grandes).....	26
Tabla 2.- Distribución de camarones por acuario para la prueba de desafío...	28,29
Tabla 3.- Tallas promedios de los camarones silvestres separados.....	35
Tabla 4.- Análisis de t - student separación de tallas pequeños y grandes.....	68
Tabla 5.- Pesos promedios semanales obtenidos en las piscinas.....	37
Tabla 6.- Indicadores de producción de las piscinas sembradas con animales grandes y pequeños.....	38,39
Tabla 7.- Prueba de Kolmogorov-Smirnov para supervivencia en cosecha....	68
Tabla 8.- Prueba de homogeneidad de varianzas de supervivencia en cosecha.....	69
Tabla 9.- Análisis de Anova para supervivencia de camarones en cosecha...	69
Tabla 10.- Prueba T para supervivencia en piscinas de camarones Grandes y Pequeños.....	70
Tabla 11.- Prueba de Kolmogorov-Smirnov para pesos en cosecha.....	70
Tabla 12.- Prueba de homogeneidad de varianzas para pesos.....	71
Tabla 13.- Resultados de significación para pesos ANOVA.....	72
Tabla 14.- Prueba T para pesos en piscinas de camarones Grandes y Pequeños.....	72
Tabla 15.- Datos de correlación para pesos y supervivencias de camarones silvestres pequeños.....	73
Tabla 16.- Datos de correlación para pesos y supervivencias de camarones silvestres grandes.....	73
Tabla 17.- Valores atípicos encontrados en piscinas de animales pequeños y grandes.....	74
Tabla 18.- Prueba de Kolmogorov-Smirnov para supervivencia a WSSV.....	74
Tabla 19.- Prueba de homogeneidad de varianzas para supervivencia a WSSV.....	75
Tabla 20.- Resultados de significación para supervivencia a WSSV ANOVA.....	76
Tabla 21.- Pruebas post hoc para supervivencia a WSSV.....	76
Tabla 22.- ELISA contra IGBP.....	45
Tabla 23. ELISA contra IGF.....	45
Tabla 24.- Lecturas de placas microelisa para la detección y cuantificación de IGFBP.....	77
Tabla 25.- Lecturas de placas microelisa para la detección y cuantificación de IGF.....	77
Tabla 26. Promedios de hemocitos no infectados e infectados.....	78
Tabla 27.- Desviaciones estandar de no infectados e infectados.....	78

ÍNDICE DE FIGURAS.

	Pag.
Fig 1.- Curva de recuperación anual de exportaciones de camarón 2002.....	8
Fig 2.- Curva mensual de recuperación de exportaciones de camarón 2011-2014.....	9
Fig 3.- Juveniles moribundos de <i>P. vannamei</i> con TSV.....	10
Fig 4.- Micrografías electrónicas IHHNV.....	11
Fig 5.- Micrografías electrónicas YHV.....	12
Fig 6.- Detección de WSSV mediante hibridación in situ.....	12
Fig 7.- Manchas blancas en caparazón características de camarones.....	13
Fig 8.- Microfotografía electrónica del virus del WSSV.....	14
Fig 9.- Clasificación de hemocitos de crustáceos.....	21
Fig 10. Estructura biológica del IGF.....	23
Fig 11.- Medición de camarones separados.....	25
Fig 12.- Plano estación experimental CENAİM-PALMAR.....	26
Fig 13.- Sector “A” de la Estación Experimental CENAİM – PALMAR.....	27
Fig 14.- Set # 1 CENAİM.....	29
Fig 15.- Preparación de la papilla infectada.....	30
Fig 16.- Obtención de muestras en las piscinas.....	31
Fig 17.- Direccionamiento de la muestra.....	31
Fig 18.- Bloques realizados en inclusión de parafina.....	32
Fig 19.- Microplaca de 96 pocillos utilizada para la técnica ELISA.....	33
Fig 20.- Lesiones de mancha blanca en epitelio del estómago de animales moribundos debido a un brote en piscina (magnificación 70 x).....	36
Fig 21.- Biomásas obtenidas en piscinas sembradas con animales pequeños y grandes.....	38
Fig 22.- Pesos semanales obtenidos en piscinas sembradas con animales pequeños y grandes.....	37
Fig 23.- Curva de normalidad de varianzas, de las medias poblacionales de las supervivencias de camarones silvestres grandes y pequeños.....	69
Fig 24.- Curva de normalidad de varianzas, de las medias poblacionales de los pesos de camarones silvestres grandes y pequeños.....	70
Fig 25.- Diagrama de dispersión entre peso y supervivencia de camarones silvestres pequeños.....	41
Fig 26.- Diagrama de dispersión entre peso y supervivencia de camarones silvestres grandes.....	41
Fig 27.- Pesos de camarones pequeños, grandes y domesticados antes de la infección, no infectados (controles negativos) e infectados.....	42
Fig 28.- Lesiones de mancha blanca en epitelio de estómago (magnificación 70 x).....	43
Fig. 29.- Supervivencia de camarones silvestres pequeños, grandes y camarones domesticad.....	44
Fig 30.- Curva de normalidad, supervivencia a WSSV.....	75

Fig 31.- Actividad Fenoloxidasa (PO) de los animales desafiados, grandes, pequeños y domesticados.....	46
Fig 32.- Actividad antibacteriana del plasma de animales silvestres pequeños, grandes y domesticados infectados y no infectados con WSSV.....	47
Fig 33.- Hemograma de animales silvestres pequeños, grandes y domesticados infectados y no infectados con WSSV.....	48

GLOSARIO.

Basófilo: Conforman el tipo de leucocito menos abundante en la sangre.

Bismarck Brown: Es un tinte diazo, se utiliza en la histología para la tinción de tejidos.

Citoquímicos: Son diferentes tipos de estudios que evalúan la actividad, la morfología y la conformación y tipo de células en un determinado lugar.

Cowdry: Son inclusiones nucleares eosinófilas compuestas de ácidos nucleicos y proteínas.

Davidson: fijador que se utiliza en camarones para preservar tejidos, compuesto por alcohol etílico y formaldehído.

Dietanolamina: Es un compuesto químico orgánico que se utiliza en disolventes, emulsionantes y aplicaciones detergentes.

Elisa: Es una técnica de inmunoensayo en la cual un antígeno inmovilizado se detecta mediante un anticuerpo enlazado a una enzima capaz de generar un producto detectable

Endocitosis: Es un proceso por el cual la célula introduce moléculas grandes o partículas, y lo hace englobándolas en una invaginación de la membrana citoplasmática, formando una vesícula que termina por desprenderse de la membrana para incorporarse al citoplasma.

Eosina: Es un colorante ácido, por lo cual tiñe sustancias básicas, a estas sustancias básicas se las denomina eosinófilas (ya que tienen afinidad por los sustancias ácidas).

Eosinófilos: Estas células fueron descritas inicialmente por Paul Ehrlich en 1879, y les dio el nombre de eosinófilos al observar que se teñían intensamente con ciertos colorantes ácidos como la eosina.

Exocitosis: Es el proceso de transporte activo por el cual las células expulsan las macromoléculas de su citoplasma, transportándolas mediante vesículas hacia el medio externo y liberándolas mediante la deformación temporal de la membrana plasmática.

Hematoxilina: Se utiliza en histología para teñir los componentes aniónicos (ácidos) de los tejidos, a los que da una coloración violeta. Tiñe intensamente los núcleos de las células, dado que estos contienen ácidos nucleicos ricos en radicales ácidos.

Hipertrofia: Es el nombre con que se designa un aumento del tamaño de un tejido cuando se debe al aumento correlativo en el tamaño de las células que lo forman; de esta manera, el órgano hipertrofiado tiene células mayores, y no nuevas. Se distingue de la hiperplasia, en que en esta crece el número de células, no su tamaño.

Infecciones latentes: Algunos virus son capaces de persistir dentro de los tejidos del hospedador durante largo tiempo sin producir una enfermedad patente. Tales infecciones latentes pueden convertirse, en un momento dado, en enfermedades agudas debido a factores externos que alteran el equilibrio entre el hospedador y el parásito.

Inmunofluorescencia: Es una técnica de inmunomarcación que hace uso de anticuerpos unidos químicamente a una sustancia fluorescente para demostrar la presencia de una determinada molécula.

Inmunohistoquímica: Es un procedimiento histopatológico que se basa en la utilización de anticuerpos que se unen específicamente a una sustancia que se quiere identificar (anticuerpo primario).

Kariorexis nuclear: En esta etapa el núcleo aumenta su tamaño, la cromatina comienza a dispersarse, agrupándose alrededor de la membrana nuclear, sólo se observa en la necrosis, considerándose como patognomónico de esta.

Membrana peritrófica: Fina membrana no celular (quitinosa) que secreta el intestino medio, con la cual envuelve la masa alimenticia y protege la delicada capa epitelial del intestino medio.

Permout: Un medio de montaje de resina sintética a base de tolueno.

Picnosis: Denota una disminución de tamaño nuclear con aumento de la basofilia nuclear.

Sistema profenoloxidasa: Juega un importante rol en la inmunidad innata de los crustáceos, particularmente en la cicatrización de las heridas y la defensa contra los patógenos.

Xileno: El xileno, xilol o dimetilbenceno, $C_6H_4(CH_3)_2$ es un derivado dimetilado del Benceno. Según la posición relativa de los grupos metilo en el anillo bencénico, se diferencia entre orto-, meta-, o para- xileno (o con sus nombres sistemáticos 1,2-; 1,3-; y 1,4-dimetilbenceno).

ABREVIATURAS.

AND:	Ácido desoxirribonucleico
ARNi:	ARN interferente
CHF:	Factor Hematopoyético de Crustáceo
g:	Gramo
h:	Hora
IGF:	Factor de crecimiento tipo insulina
IGFBP:	Proteína de fijación al Factor de crecimiento tipo insulina.
IHHNV:	Infectious Hypodermal and Haematopoietic Necrosis Virus
Kpb:	Mil pb
OL:	Órgano linfoide
PCR:	Polymerase chain reaction
pH:	Potencial de hidrógeno
P-K:	Picknosis – Kariorraxis
PL:	Post larva

proPO:	Sistema profenoloxidasa
TBS:	Tris-buffered saline
TH:	Tejido hematopoiético
TSV:	Taura Syndrome Virus
TWEEN 20:	Polyoxyethylene-sorbitan monolaurate
WSSV:	White Spot Syndrome Virus
YHV:	Yellow Head Virus

1. RESUMEN

La supervivencia del camarón blanco ante la presencia del virus de la mancha blanca en piscinas, es sin duda uno de los grandes retos en las camaroneras. Los factores de crecimiento IGF e IGFBP, son determinante para la supervivencia del camarón. El presente estudio se enmarca en la determinación del efecto de la IGF y de la IGFBP sobre la talla de camarones Peneidos y su resistencia al WSSV.

Se separaron los camarones por su talla, pequeños y grandes. Una parte de estos lotes se sembró en piscinas de la estación CENAIM – PALMAR. Otra parte se conservó en CENAIM. Al cumplir un promedio de 3 g estos últimos se sometieron a un desafío frente al virus de la mancha blanca, utilizando como control animales domesticados. La mayor supervivencia se detectó en los camarones domesticados con diferencias significativas con respecto a los grandes $p = 0,009 < 0.05$, más no con respecto a los pequeños. Se tomaron muestras de hemocitos antes y después del desafío. Solo en los hemocitos de animales pequeños se detectó IGF antes del desafío 261 ± 40 y en los sobrevivientes 238 ± 42 y únicamente en los sobrevivientes grandes se detectó IGF 256 ± 42 . Se obtuvieron resultados negativos en la detección de la proteína transportadora IGFBP. Se encontró mejor calidad de hemocitos en los parámetros inmunitarios en camarones silvestres pequeños, indicando un posible efecto benéfico de la IGF.

En piscina luego del brote de la mancha blanca ya no se detectaron diferencias significativas en el peso entre los animales pequeños y grandes. Además en las piscinas sembradas con estos últimos hubo mayor pérdida de biomasa. Estos resultados indican mayor mortalidad en los animales más grandes del grupo de los grandes.

Palabras claves: IGF, IGFBP, Detección, Inmunolocalizar.

ABSTRACT

The survival of white shrimp in the presence of white spot virus in pools is undoubtedly one of the greatest challenges in shrimp. The growth factors IGF and IGFBP are crucial for the survival of shrimp. This study is part of determining the effect of IGF and IGFBP about the size of shrimp *Penaeids* and resistance to WSSV.

Shrimp were separated by their small and large size. Some of these lots was sown in pools station CENAIM - Palmar. Another part was preserved in CENAIM. When completing an average of 3 g latter were subjected to a challenge against white spot virus, using as domesticated animals control. The higher survival was detected in domesticated shrimp with significant differences compared to large $p = 0.009 < 0.05$, but not with respect to small. Hemocyte samples were taken before and after challenge. Only in hemocytes of small animals IGF was detected before challenge 261 ± 40 and 238 ± 42 survivors and only in the great survivors IGF 256 ± 42 was detected. Negative results in the detection of the carrier protein IGFBP. Better quality of hemocytes in immune parameters in small wild shrimp was found, indicating a possible beneficial effect of IGF.

In pool after the outbreak of white spot and no significant differences were detected in weight between small and large animals. Also in pools planted with the latter there was a greater loss of biomass. These results indicate increased mortality in larger animals large group.

Keywords: IGF, IGFBP, Detection, immunolocalize.

2. INTRODUCCIÓN

El sector camaronero en Ecuador pasa por tiempos de producción y exportación fundamentales, en los últimos siete años el sector ha registrado un aumento sostenido en sus ventas externas. El mayor mercado del camarón nacional es la Unión Europea, con el 40% de las exportaciones, seguido de Estados Unidos y Asia, con un 30%, cada uno, CNA (2014).

El sistema inmune de crustáceos ha atraído considerable atención en los últimos años. Según (Berger 2000; van de Braak *et al.*, 1996), el camarón no posee un sistema inmune adaptativo basado en especificidad y memoria (e.g., anticuerpos), sino más bien un sistema inmune innato que logra mediar defensas de corto plazo ante infecciones bacterianas o virales. Los mecanismos de defensa innata del camarón incluyen el sistema profenoloxidasa (ProPO), la expresión de péptidos antimicrobianos (Destoumieux *et al.*, 1997; Söderhäll *et al.*, 1994) y reacciones celulares (fagocitosis, formación de nódulos y encapsulación). Actualmente se realizan investigaciones para evaluar y mejorar el estado inmune de los camarones, así como para establecer estrategias que permitan el control de los virus en la acuicultura (Bachère, 2000).

Las barreras físicas en los camarones están representadas por el rígido exoesqueleto y la membrana peritrófica, mientras que la respuesta inmune activa implica un rápido cambio en el número de células circulatorias (hemocitos) y la síntesis de nuevas proteínas dentro de la hemolinfa (Pascual C, 2007).

Los hemocitos son las células que intervienen principalmente en la respuesta del sistema inmune del camarón. Según Le Moullac *et al.* (1998), en las reacciones de resistencia a patógenos del camarón, es muy importante el número de hemocitos circulantes en la hemolinfa. Los camarones que poseen un alto número de

hemocitos resisten mayor a la infección que camarones con un bajo número de hemocitos (Le Moullac *op cit*).

En respuesta a una variedad de estímulos, ante la presencia de virus en el medio, la aparición de la apoptosis en el camarón también es determinante para la protección del organismo, al eliminar células potencialmente dañinas o infectadas (O`brien, 1998; Häcker, 2000).

En vertebrados, existen evidencias de que la apoptosis puede activarse cuando la muerte de la célula es deseada para mantener el buen estado del organismo (Cohen, 1993). Según Granja *et al.* 2003; Rojtinnakorn *et al.*, 2002; Lin *et al.*, 2011) la apoptosis parece manifestarse en diferentes tejidos, incluidos los hemocitos de animales infectados por WSSV, la expresión de los mecanismos de apoptosis sería más importante en camarones resistentes al virus. Sin embargo, los factores de crecimiento tendrían un efecto protector anti apoptosis sobre los tejidos inmunes.

La CHF (Factor Hematopoyético de Crustáceo) expresado en el tejido hematopoyético de cangrejo de río, bajo activación de la astakina (promotor de la fagocitosis), tiene un dominio IGFBP y su silenciamiento mediante ARNi provoca la apoptosis de cultivos primarios de tejido hematopoyético, indicando que la IGFBP actuaría en los crustáceos como un factor de supervivencia de los hemocitos (Lin *et al.*, 2011). La IGFBP es una proteína que fija la IGF, la transporta y regula su biodisponibilidad.

Cultivos primarios de OL (órgano linfoide) de camarón responden a la IGF como factor de crecimiento proliferando tejido linfoide (José *et al.*, 2012). En otras especies, la IGF también es un factor de crecimiento y proliferación celular, y actúa como un factor de supervivencia impidiendo la apoptosis de células normales (O`Connor *et al.*, 1997), pero también de células enfermas. Por lo tanto altas tasas de

IGF incrementan los riesgos de cáncer, al impedir que células tumorales se suiciden, activando o desactivando la apoptosis (Pollak *et al.*, 2004).

Los factores de crecimiento IGF y su proteína transportadora podrían tener el rol dual de inducir el crecimiento de los animales si ejercen su efecto sobre músculo o tegumento, o asegurar la supervivencia y proliferación de los tejidos inmunes si ejercen su efecto sobre estos. En esta tesis se estudió si la IGF y la IGFBP están implicadas en la relación inversa talla en peso y supervivencia observada en camarón.

3. JUSTIFICACIÓN

Durante la última década la acuicultura ha sido considerablemente reconocida por su desarrollo y sus progresivos beneficios socioeconómicos; esta actividad constituye uno de los sectores de producción de alimento de más rápido crecimiento, mediante el aumento continuo de los volúmenes de producción así como también de su valor anual global (Montoya-Rodríguez; López -Félix, 2000). En ese contexto, la camaronicultura ha alcanzado niveles de gran importancia como actividad económica de rápido desarrollo, al contribuir a nivel mundial con el 30% de la producción (Martínez; Córdova, 2002).

En los medios de cultivos de invertebrados, las infecciones virales son comunes, pero se conoce poco acerca de la habilidad de estos organismos para controlarlas, lo cual tiene su mayor dificultad en el hecho de que carecen de defensas antivirales basadas en una inmunidad específica (Kurosky *et al.*, 2000). Los camarones peneidos son afectados por aproximadamente veinte virus conocidos, la mayor parte de los cuales han sido descubiertos a raíz de sus efectos negativos sobre los cultivos (Aguirre y Ascencio, 2000), los que mayormente afectan al cultivo del camarón son: El Virus del Síndrome de Taura (TSV = Taura Syndrome Virus); El Virus de la Necrosis Hipodérmica Hematopoyética Infecciosa (IHHNV = Infectious Hypodermal and Haematopietic Necrosis Virus); El virus de la cabeza amarilla (YHV = Yellow Head Virus); y el virus del síndrome de la Mancha Blanca (WSSV = White Spot SyndromeVirus).

La Mancha Blanca causada por el WSSV, ha sido una de las patología de mayor impacto para el cultivo de camarón en el país (Calderón *et al.*, 1999; Alday de Graindorge & Griffith, 2000). La enfermedad puede ocasionar mortalidades de hasta el 100% en los sistemas de producción (Sahul *et al.*, 2001). Actualmente, existen pocas estrategias eficaces para amenorar su impacto en los sistemas de

producción, estas se basan principalmente en el manejo y en las bajas densidades de siembra. Ecuador ha optado por esta última estrategia con resultados que han permitido recuperar a la industria (Rodríguez *et al.*, 2011).

Estudios para encontrar camarones resistentes al virus de la mancha blanca indican que camarones resistentes al WSSV son pequeños y sus hemocitos tienen alta expresión de IGFBP Insulin Growth Factor Binding Protein (Gutiérrez, 2008; Pérez *et al.*, 2002). Las IGFBP transportan el factor de crecimiento de tipo insulina (IGF) y regulan su biodisponibilidad. Se ha demostrado que el IGF desempeña un papel importante en la proliferación celular (Jose *et al.*, 2012), el desarrollo, el crecimiento y la supervivencia (Gutiérrez, 2008). La función principal del sistema inmune es proteger la individualidad biológica; así que, su principal actividad es diferenciar y eliminar todo material extraño de sus tejidos (Vargas y cols., 1996).

Los mayores efectores de la respuesta inmune son las células de la sangre o hemocitos (Gross *et al.*, 2001); Por otra parte, en el cangrejo de río, el factor hematopoiético (CHF) tiene un dominio IGFBP e induce la supervivencia del tejido hematopoiético (tejido responsable de la proliferación de hemocitos; esos resultados sugieren que la biodisponibilidad de la IGF incidiría no solo en el crecimiento del camarón sino también en la resistencia (Lin *et al.*, 2001). Es importante para la sostenibilidad de la industria tener animales grandes y resistentes, lo que se podrá obtener a través de estudios relacionados a factores de crecimiento, sus proteínas transportadoras y su rol tanto en resistencia como en crecimiento.

4. OBJETIVO GENERAL:

Determinar el efecto de la IGF y de la IGFBP sobre la talla de camarones *Peneidos* y su resistencia al WSSV, mediante la aplicación de inmunoensayos, para obtener mejores resultados de producción.

5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Medir la IGF en líneas de camarón de distinta supervivencia en desafíos frente al virus de la mancha blanca.
2. Evaluar la expresión de la IGF en cultivos de camarones *Peneidos* a distintas tallas.
3. Inmunolocalizar IGF, IGFBP en cortes histológicos de *Penaeus vannamei* de distintas tallas: grandes y pequeños.

6. HIPÓTESIS

Hipótesis nula: La IGFBP retiene la IGF en OL (órganos linfoide), hemocitos y TH (tejido hematopoiético), lo que refuerza la inmunidad de los camarones, pero disminuye su biodisponibilidad para el crecimiento.

Hipótesis alterna: La IGFBP no retiene la IGF en OL (órganos linfoide), hemocitos y TH (tejido hematopoiético), por lo que no refuerza la inmunidad de los camarones, y no disminuye su biodisponibilidad para el crecimiento

7. MARCO TEORICO

7.1. Producción camaronera ecuatoriana.

En tan solo seis meses luego de la aparición del virus de la mancha blanca en el año 1999, se obtuvieron pérdidas de hasta 63000 toneladas de camarón cultivado, por un valor de 280 millones de dólares Americanos (Alday de Graindorge & Griffith 2000).

La cámara nacional de acuicultura confirma que las exportaciones de camarón redujeron drásticamente de 94 millones de TM en 1999 a 37 millones de TM en el 2000, que se mantuvieron en niveles relativamente bajos en el 2001. A partir del 2002 el sector camaronero vió una recuperación gradual de los niveles de producción, habiéndose alcanzado en el 2010 una producción de 133 millones de TM aproximadamente (CNA 2010) (figura 1), alcanzando a finales del 2014 52.893, 515 libras y aproximadamente 2000 millones de dólares (CNA 2014) (figura 2).



Fig 1.- Curva de recuperación anual de exportaciones de camarón desde el año de 2002. Fuente: Datos tomados del CNA (Cámara Nacional de Acuicultura, 2010).

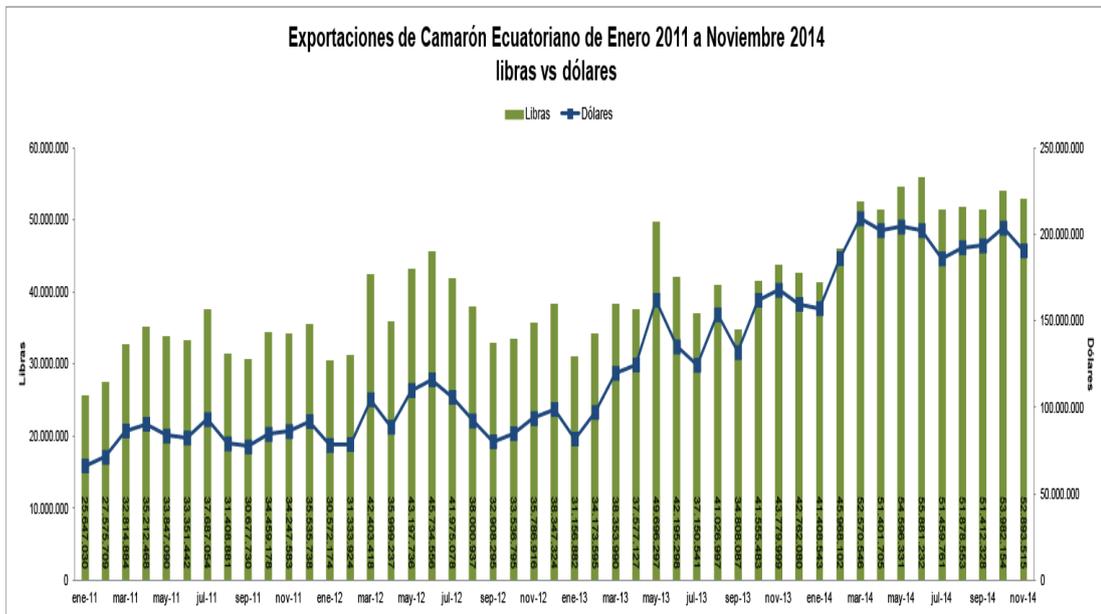


Fig 2.- Curva mensual de recuperación de exportaciones de camarón desde el año de 2011 - 2014. Fuente: Datos tomados del CNA (Cámara Nacional de Acuicultura, 2014).

7.2. Limitantes para la camaronicultura en el Ecuador

La Acuicultura representa un importante sector de la producción alimenticia mundial creando una valiosa fuente de proteínas, empleo, ingresos y oportunidad de seguridad alimenticia para los países en desarrollo dedicados al cultivo de camarón; *Penaeus vannamei*, es una de las especies predominantes para el cultivo en granja a nivel mundial (FAO, 2006).

Sin embargo este cultivo se ha visto afectado por enfermedades, dentro de las enfermedades están las infecciosas y las no-infecciosas (Lightner y Redman, 1998). Las primeras son causadas por bacterias y virus, (Bonami, 1997; Lightner y Redman, 1998). Hasta la actualidad el más devastador el virus ha sido el WSSV como mencionan Natividad *et al.* (2008). Las enfermedades no-infecciosas están

ligadas a factores no bióticos, tales como tóxicos químicos, ambientes desfavorables, desbalances nutricionales y factores genéticos

Los cultivos de camarón son afectados por cerca de veinte virus conocidos, la mayor parte de los cuales han sido descubiertos a raíz de los efectos negativos en la acuicultura (Aguirre y Ascencio, 2000), entre ellos los que mayormente afectan al cultivo son:

Virus del síndrome de Taura (TSV = Taura Syndrome Virus), apareció en Ecuador en 1992 (Jiménez, 1992) y se expandió rápidamente por América Central y Texas donde causó masivas pérdidas de producción. Este virus ataca a juveniles de entre (0.1 a 0.5 g) quienes mueren durante la muda; (Hasson *et al.*, 1995; Lightner *et al.*, 1995) *P. vannamei*, *P. stylirostris* y *P. setiferus* son las principales especies afectadas (Fig 3).



Fig 3.- Juveniles moribundos de *P. vannamei* con TSV en fase aguda, telson y urópodos de color rojo intenso. Fuente redalyc.org.

Virus de la Necrosis Hipodérmica Hematopoyética Infecciosa (IHHNV = Infectious Hypodermal and Haematopoietic Necrosis Virus). Se encuentra ampliamente distribuído en ambos hemisferios; afecta a camarones juveniles y adultos de *P. stylirostris*, *P. monodon* y *P. vannamei* tanto silvestres como de cultivo (Aguirre y Ascencio, 2000). El virus se caracteriza por causar infecciones persistentes y latentes, ocasionando grandes pérdidas. Según (Lightner *et al.*, 1996) *P. vannamei* es relativamente resistente al virus pero su presencia está relacionada con enanismo o deformaciones, obteniéndose afectando la calidad final del producto y obteniéndose pobres resultados de producción (Fig 4).

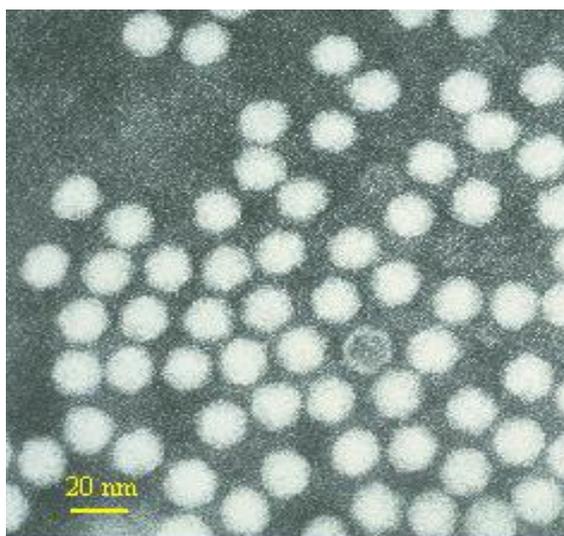


Fig 4.- Micrografías electrónicas de transmisión de preparaciones purificadas (por ultra centrifugación en sacarosa o cloruro de cesio gradientes) de los virus de camarones peneidos teñidas con un 2% de la PTA IHHNV. Department of Veterinary Science and Microbiology University of Arizona, Tucson, AZ 85721 USA.

Virus de la Cabeza Amarilla (YHV = Yellow Head Virus). Apareció Tailandia en 1990 (Cowley *et al.*, 1999), causa infecciones latentes e infecciones abiertas, afecta a peneidos en general, siendo *P. monodon* la especie más susceptible (Shankar y Mohan, 1998) (Fig 5).



Fig 5.- Micrografías electrónicas. Virus del síndrome de la cabeza amarilla (YHV) 30,000 X. De la Rosa-Vélez, J. y J. R. Bonami. 2006.

El virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV = White Spot Syndrome Virus). Se detectó en Asia en 1992 y se propagó por diferentes países del Asia y América. Hasta el momento es el virus más letal para camarón y ha causado grandes pérdidas a la industria con mortalidades de hasta un 100% (Van Hulten, 2001) (Fig 6).

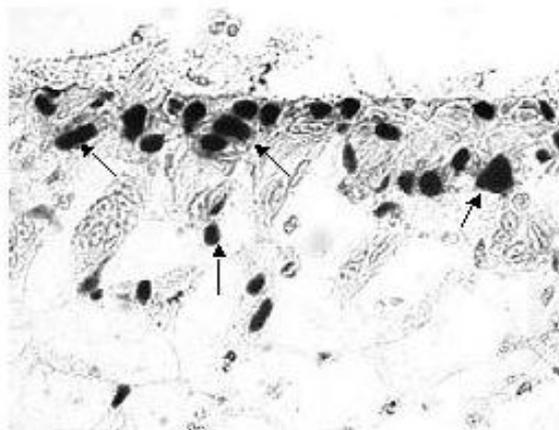


Fig 6.- Detección de WSSV mediante hibridación in situ en corte histológico de tejido epitelial de camarón *P. chinensis*. (Shi, 2000).

7.3. Generalidades del virus del síndrome de la mancha blanca Virus (WSSV)

El virus WSSV pertenece al género Whispovirus y familia Nimaviridae (ICTVdB, 2009) es un virus envuelto (envoltura trilaminar), no-ocluido, de forma baciliforme dotado de un apéndice filamentoso (Chou *et al.*, 1995; Wongteerasupaya *et al.*, 1995; Durand *et al.*, 1996; Escobedo-Bonilla *et al.*, 2008). Los viriones pueden medir entre 210 y 380 nm de largo y, entre 70 y 167 nm de ancho (Flegel y Alday-Sanz, 1998; Park *et al.*, 1998; Rajendran *et al.*, 1999; Escobedo-Bonilla *et al.*, 2008). Durand *et al.*, 1996; Nadala y Loh, 2000, la nucleocapside tiene 14 anillos el genoma es de DNA de doble cadena circular de aproximadamente 300 kpb

Los signos clínicos de los animales enfermos incluyen: nado lento o errático, pérdida del apetito, manchas blancas en la cutícula que oscilan entre 0.5 y 2.0 mm de diámetro (Fig. 7 a y b) (Wang *et al.*, 1995; Kasornchandra *et al.*, 1998). Los animales moribundos presentan una coloración rosada del cuerpo que va de rojiza a rosada debido en parte a la presencia de cromatóforos expandidos (Chang *et al.*, 1996; Lightner, 1996; Kasornchandra *et al.*, 1998; Lo *et al.*, 1998) y porque la hemolinfa se torna color rosada (Montesdeoca *et al.*, 2002)

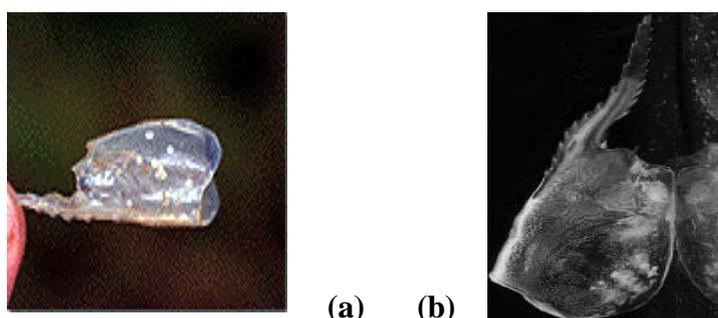


Fig 7.- Manchas blancas en caparazón características de camarones severamente infectados con WSSV. a. *P. vannamei* b. *Macrobrachium rosenbergii* (Pramod *et al.*, 2002).

Mohan *et al.* (1998), menciona que las infecciones tempranas de los tejidos afectados se caracterizan por hipertrofia nuclear y marginación de la cromatina. En núcleos altamente infectados, los viriones en formación son localizados centralmente (Fig 8 c y d), mientras que los viriones maduros tienden a concentrarse a lo largo de los márgenes nucleares (Durand *et al.*, 1997).

Wongteerasupaya *et al.*, (1995); Durand *et al.*, 1997; Chang *et al.*, (1998), mencionan que el tejido infectado es totalmente de origen meso y ectodermal incluyendo tejido conectivo y epitelial, nódulos hematopoyéticos, hemocitos, epitelio subcuticular de la epidermis y del estómago, branquias, intestino, músculo estriado, hepatopáncreas, corazón, tejidos reproductivo y nervios.

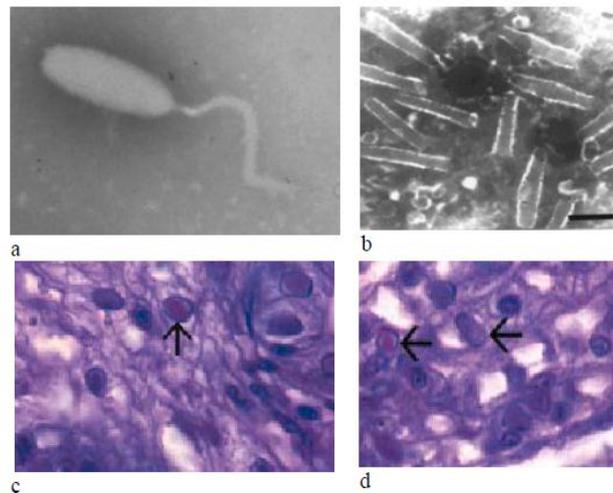


Fig 8.- (a). Microfotografía electrónica del virus del WSSV (Wageningen University, Laboratory of Virology, 2001). (b) nucleocápsides de WSSV (escala barra, 185nm) (Zhang *et al.*, 2001). (c) Sección histológica de células estomacales de un juvenil de *P. chinensis* infectado con WSSV, cuerpo de inclusión intranuclear prominente (Lightner, 1996). (d) sección de branquias de juvenil de *P. chinensis* infectado con WSSV, células infectadas muestran cuerpos de inclusión intranuclear (Lightner, 1996).

7.3.1. Propagación del WSSV

La infección por WSSV se caracteriza por un brote rápido de la enfermedad y altas mortalidades en corto tiempo (Chou *et al.*, 1998). Tiene un amplio rango de huéspedes que incluye más de 40 especies de cangrejos, copépodos y otros artrópodos, el virus ha sido reportada en varias especies de decápodos aunque es más frecuente en camarones *peneidos* (Flegel, 1998; Wang *et al.*, 1998; Chang *et al.*, 1998; Rajendran *et al.*, 1999).

Varios factores benefician la propagación y a la aparición del WSSV, mala calidad del agua o inadecuada remoción de los desperdicios. Fluctuaciones en los factores abióticos tales como oxígeno, pH y salinidad, aumentan el estrés y la susceptibilidad de los animales a la enfermedad (Kautsky *et al.*, 2000).

El riesgo a la enfermedad aumenta en los cultivos intensivos en los cuales la densidad en la población de camarones es mucho mayor (Chou *et al.*, 1998; Kautsky *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 2001); el virus puede ingresar a los cultivos con camarones portadores sin signos clínicos; por lo tanto camaronerías que comparten la misma agua están en riesgo de contraer la infección (Chou *et al.*, 1998). En sistemas de cultivo el agua y el canibalismo favorecen la transmisión horizontal del virus. (Wu *et al.*, 2001).

7.3.2. Distribución Geográfica de WSSV

El WSSV se ha reportado en todas las regiones del mundo donde se cultiva camarón. Después de su aparición en 1992-1993, en el noroeste de Asia, el virus se dispersó rápidamente a través de la mayoría de las regiones cultivadoras de camarón en Asia e Indo Pacífico (Lightner 1996).

7.3.3. Detección del virus WSSV.

En determinadas circunstancias los camarones con leve infección muestran una marcada necrosis en el OL (órgano linfoide) muy similar a la observada en infecciones por YHV (Pantoja y Lightner, 2003), y se considera que es muy posible la coinfección con ambos virus (Durand *et al.*, 2000). Hemocitos con núcleos picnóticos y kariorrexis han sido relacionados con ambos virus. La similitud de lesiones ha causado errores de diagnóstico; (Pantoja y Lightner, 2003).

En la etapa temprana de la infección, las lesiones de mancha blanca se caracterizan por la hipertrofia de los núcleos en células infectadas, muy similar a los cuerpos de inclusión denominados Cowdry A de las infecciones con IHHNV (Momoyama *et al.*, 1994; Lightner y Chen, 2000). Estas lesiones son muy frecuentes en el tejido conectivo del estómago (Pantoja y Lightner, 2003). Cuando la infección es avanzada estos cuerpos de inclusión son basófilos (Lightner y Chen, 2000 *op cit*).

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

7.4. Técnicas para la detección de WSSV.

La histopatología es una técnica de diagnóstico confirmativa durante los brotes de enfermedad (Lightner, 1996). Otras técnicas para detectar la enfermedad de la Mancha Blanca, incluyen herramientas moleculares, como amplificación de fragmentos genómicos mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), PCR en tiempo real, hibridación con sondas moleculares específicas sobre soporte sólido (Dot-Blot) o In situ (Durand *et al.*, 1996; Wongteerasupaya *et al.*, 1996; Lo

et al., 1996; Kim *et al.*, 1999; Nadala y Loh, 2000; De la Rosa-Vélez y Bonami, 2006) y métodos inmunológicos, como la inmunofluorescencia e inmunohistoquímica (Poulos *et al.*, 2001). Sin embargo desde el punto de vista práctico, dentro de las diversas técnicas de diagnóstico, el PCR simple y anidado provee un alto grado de sensibilidad y especificidad (Lo *et al.*, 1996; Lightner, 1996; Powell *et al.*, 2006).

7.5. Respuesta inmune de los crustáceos.

La primera línea de defensa en los crustáceos es la cutícula, la cual constituye una barrera física y biológicamente activa, a ella estarían asociados actividad microbicida (Destoumieux *et al.*, 2000) y actividad fenoloxidasas según (Sugumaran, 1996).

Söderhäll y Cerenius, 1992; Vargas-Albores y Yepiz-Plascencia, 2000, mencionan que los mecanismos de defensa innata están basados en componentes celulares y humorales del sistema circulatorio, especializados en la detección y eliminación de patógenos extraños, microorganismos y parásitos que impliquen un peligro potencial para el huésped.

Según Bachère (2002), la respuesta inmune de los crustáceos está dividida en varias fases: 1) Etapa inmediata e inducible correspondiente al reconocimiento de lo no propio. Los crustáceos no poseen un sistema inmunitario adaptativo pero se ha confirmado que algunos factores presentes en la hemolinfa poseen una alta especificidad de reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (Destoumieux *et al.*, 1997; Vázquez *et al.*, 1998). 2) Etapa de defensa celular y síntesis de efectores: Söderhäll y Cerenius (1992) y Vázquez *et al.* (1998), mencionan que los hemocitos participan en procesos de fagocitosis y encapsulación y están involucrados en la coagulación de la hemolinfa, así como en sintetizar y almacenar moléculas con acción antimicrobiana (Destoumieux *et al.*, 1997).

Relación a las infecciones virales de peneidos se han reportado las siguientes respuestas celulares:

- a. Endocitosis de virus (Söderhall *et al.*, 1996), la cual es considerada la primera línea de defensa en invertebrados (Bayne, 1990). Ocurre frecuentemente en el OL en infecciones por WSSV (Montesdeoca, 2002).
- b. Encapsulación (Momoyama *et al.*, 1994).
- c. Melanización (Hasson *et al.*, 1999a; Wang *et al.*, 1999).
- d. Nodulación (Söderhall y Cerenius, 1992; Durand *et al.*, 1997).
- e. Formación de esferoides del órgano linfoide (LOS) (Anggraeni y Owens, 2000).

3) Etapa humoral y de recuperación celular. Se ha reportado que los hemocitos liberan su contenido por exocitosis incluyendo factores para la coagulación de la hemolinfa, sistema proPO (Söderhall y Cerenius, 1998) o péptidos antimicrobianos como las peneidinas (Destoumieux *et al.*, 1997), caracterizadas en *L. vannamei*, las cuales son activas contra hongos y bacterias Gram (+) (Wang *et al.*, 1999) y además actúan como opsoninas contra bacterias Gram (-) (Muñoz *et al.*, 2002).

7.6. Comportamiento celular de los crustáceos.

Hasson *et al.* (1999) destacan el rol importante que cumple el órgano linfoide en los mecanismos de defensa antiviral contra el virus del síndrome de Taura. El órgano linfoide forma parte del sistema circulatorio (Bell y Lightner, 1988) actuando como filtro de partículas virales (Hasson *et al.*, 1999). Durante las infecciones virales, en el órgano linfoide se forman estructuras esféricas multinucleadas llamadas esferoides (Bonami *et al.*, 1992). La formación de esferoides en el órgano linfoide se ha visto asociada por lo menos con seis diferentes infecciones virales en camarones peneidos (Hasson *et al.*, 1999, Anggraeni y Owens, 2000), incluido el WSSV (Vidal *et al.*, 2001).

Hay varios tipos de esferoides según el grado de vacuolización (Hasson *et al.*, 1999):

Tipo A, una masa de células homogéneas que contienen pocas o ninguna célula necrótica, ligeramente basófilo (Hasson *et al.*, 1999).

Tipo B, una evolución del tipo A pero difiere por el incremento de las células necróticas y moderado número de vacuolas citoplasmáticas (Hasson *et al.*, 1999).

Tipo C, presenta un incremento en la basofilia, conteniendo un alto porcentaje de núcleos basófilos (≈ 33 a 50%) más pequeños que los observados en el tipo A y B, y vacuolas citoplasmáticas en menor número (Hasson *et al.*, 1999).

Hemocitos infiltrantes en el órgano linfoide llevarían a la formación de esferoides (Angraeni y Owens, 2000). Al respecto Van de Braak *et al.* (2002) han determinado por medio de anticuerpos la migración de hemocitos desde los túbulos del órgano linfoide a la periferia de los mismos, en animales infectados con WSSV.

Según Hasson *et al.*, 1999; Montesdeoca *et al.*, 2002; Muñoz *et al.*, 2002, los hemocitos circulan en el hemocele y también son capaces de migrar a los tejidos. Ante el ataque por WSSV los camarones proliferarían hemocitos los cuales se infiltrarían en los tejidos infectados. Montesdeoca *et al.*, 2002 indica que si la proliferación celular se detiene, en la hemolinfa se acumularían hemocitos desgastados; las infecciones virales pueden ser controladas en tanto los camarones sean capaces de proliferar hemocitos en buen estado y movilizarlos a los tejidos infectados.

Los hemocitos en los crustáceos han sido clasificados en base a criterios estructurales, citoquímicos, antigénicos y funcionales. También son reconocidos

morfológicamente como hialinos, semi-granulosos y granulosos (Hose y Martin, 1989; Söderhäll y Cerenius, 1992; Rodríguez *et al.*, 1995).

7.7. Clasificación de los hemocitos.

- **Hemocitos hialinos**, son células de forma ovoide de 12,4 x 7,8 μm de diámetro, libres de gránulos o con pocos gránulos, que 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 (Martin y Graves, 1985), además presentan ribosomas libres, retículo endoplásmico liso y rugoso y no presenta aparato de Golgi. Según Bachère *et al.*, 1995, presentan gránulos estriados. 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) (Fig 9a).

- **Hemocitos semigranulosos**, tienen gránulos pequeños, de forma redondeada con núcleo redondo o en forma de herradura. Intervienen en la fagocitosis, encapsulación y en la liberación del sistema profenoloxidasa (proPO); sintetizan y liberan las peneidinas y peptidos antimicrobianos. (Pascual C *et al.*, 2007; Ruiz-Urbe *et al.* 2007 y Rodríguez *et al.*, 1995) (Fig 9b).

- **Hemocitos granulosos**, son células grandes, con núcleo excéntrico y tienen inclusiones citoplasmáticas. Almacenan las enzimas que conforman el sistema proPO a un nivel más alto que los semigranulosos. Al igual que los hemocitos semigranulosos sintetizan y almacenan las peneidinas, e intervienen en la encapsulación. Son muy refráctiles al microscopio de contraste de fases (Pascual C *et al.*, 2007; Ruiz-Urbe *et al.* 2007 y Rodríguez *et al.*, 1995) (Fig 9c).

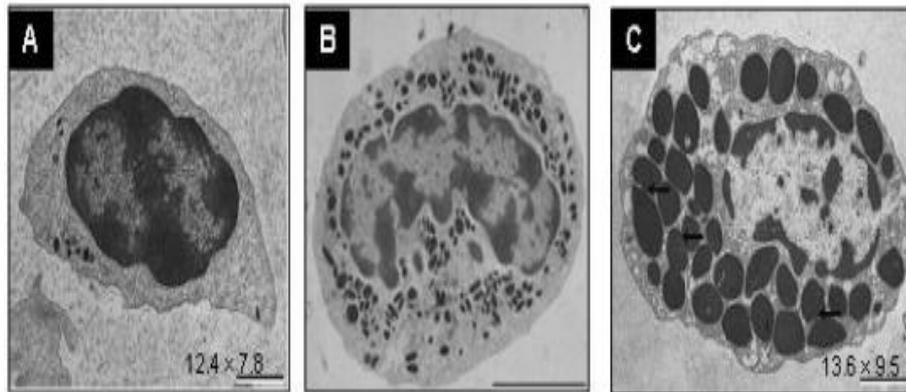


Fig 9.- Clasificación de hemocitos de crustáceos. (A) Hialinos, (B) Semi-granulares, (C) Granulares (Giulianini *et al.*, 2007).

7.8. Apoptosis

Es un mecanismo de respuesta a una variedad de estímulos, uno de ellos es la presencia de virus en el medio y también es determinante para la protección del organismo, al eliminar células potencialmente dañinas (O'Brien, 1998; Häcker, *op cit*). La apoptosis está asociada a procesos de regulación genética mejor descritos en vertebrados que invertebrados (Savill *et al.*, 1993; Cohen, 1993; Häcker, 2000), sin embargo en los últimos años se han realizado varios estudios sobre los mecanismos de apoptosis en camarones infectados con WSSV.

El término muerte programada es utilizado para indicar que la muerte de la célula sigue un programa intracelular, por lo consiguiente en vertebrados existen evidencias de que el programa suicida puede activarse cuando la muerte de la célula es deseada para mantener el buen estado del organismo, (Cohen, 1993). Independientemente de la situación que induce la apoptosis, la aparición de la muerte celular tiene características similares y requiere de la presencia de enzimas proteasas denominadas Caspasas que tienen como sustrato algunas proteínas del sistema reparador del DNA y el citoesqueleto (Häcker, 2000; Granja *et al.*, 2003).

De acuerdo a la teoría de acomodación Flegel y Pasharawipas, 1998, indican que, en los camarones ocurre la apoptosis cuando falla el mecanismo de acomodación al patógeno y es parte del proceso de resistencia de los crustáceos a los virus. Esta hipótesis muy controversial, sostiene que la causa fundamental de la muerte del camarón sería el desencadenamiento de la apoptosis al comprometer importantes funciones celulares (Sahtout *et al.*, 2001; Khanobdee *et al.*, 2002).

7.9. Relación edad y WSSV.

En Ecuador, las camaroneras mueren por WSSV entre la cuarta y sexta semanas luego de la siembra que correspondería a PL42 a PL52. Pérez *et al.* (2002), Sugiere que el periodo sin mortalidad inmediatamente después de la siembra podría expresarse como el tiempo necesario para que la enfermedad se amplifique, alrededor de PL30 aparecerían los primeros animales muertos a causa del virus, que serían canibalizados y una segunda ola de moribundos se produciría entre 7 y 10 días después, se necesitarían 2 ó 3 olas continuas de infección para que a la mayor parte de la población sea afectada y aparezcan mortalidades fuertes.

Kasornchandra *et al.* (1998) aseguran que el WSSV se manifiesta en juveniles de camarón de todas las edades y tallas; pero las edades de mayor susceptibilidad se encuentran entre 1 ó 2 meses después de la siembra en estanques.

No obstante, Yoganandhan *et al.* (2003) mencionan que en infecciones experimentales por inmersión de larvas y estadios tempranos de post-larvas de *P. monodon*, la virulencia del WSSV se incrementa conforme avanzan los estadios de desarrollo y que el WSSV no se desarrolla como enfermedad en post-larvas menores a PL10. Sin embargo Venegas *et al.*, 1999, sugieren que la susceptibilidad al virus depende de la talla y del estado fisiológico de los animales incrementándose con la edad de PL.

7.10. Factor de crecimiento tipo insulina (IGF)

Posteriormente al descubrimiento de la insulina, se identificaron, los factores de crecimiento tipo insulina IGF-I y IGF-II, los cuales forman un grupo de polipéptidos, debido a un alto grado de homología en la secuencia de aminoácidos y en la estructura terciaria. Los IGFs son sintetizados por varios tipos de células y tienen efectos autocrinos (actúa sobre la misma célula que la produce para regular su secreción.) o paracrinos (regular la acción de una hormona aumentando o disminuyendo su acción) sobre células objetivo cercanas, y acción endocrina (actúa a distancia sobre una célula efectora) a través de la circulación, cuando van acompañados por una proteína enlazante (Sara *et al.*, 1990). Estudios prueban que los IGFs son un factor esencial de crecimiento, estimulando la mitogénesis y el crecimiento celular (Baker *et al.*, 1993) (ver figura 10).



Fig 10.- Estructura biológica del IGF, basada en difracción de cristal de rayos-X.
Fuente: Tomado CSIRO. 2004.

7.10.1. Péptidos tipo insulina en crustáceos.

La IGF ha sido reportada en crustáceos Sanders (1983). Péptidos que interactúan específicamente con anticuerpos contra la insulina bovina han sido detectados en hepatopáncreas, intestino y hemolinfa de la langosta *Homarus americanus*. Por otra parte Davidson *et al.*, 1971, Gallardo *et al.*, 2003, han reportado en el cangrejo *Carcinus moenas* y la langosta *Panulirus argus*, extractos etanólicos de hepatopáncreas que mostraron actividad tipo insulina al ser probados en tejido de ratón o en radioinmunoensayos para insulina humana, respectivamente. En el camarón *P. monodon* se reportó que receptores de insulina han sido diferenciados en hepatopáncreas y músculos (Chuang *et al.*, 1994).

8. METODOLIGÍA (MARCO METODOLÓGICO)

8.1. Estrategia de estudio.

Para el estudio se utilizaron camarones marinos silvestres y domesticados obtenidos de laboratorios de la península de Santa Elena. Los camarones silvestres se aclimataron en tanques intensivos durante (10 días), realizando luego un tamizaje se separaron en tallas grandes y pequeños. Para determinar la talla de los animales separados se tomaron muestras de 30 camarones pequeños y 30 camarones grandes. Se midieron con un perfilador (Fig. 11 a y b), realizando un *t-student* para determinar la diferencia poblacional. Los dos lotes de animales se utilizaron en un estudio de campo y de laboratorio.



a)



b)

Fig 11.- Medición de camarones separados entre grandes y pequeños en el perfilador.

Los camarones silvestres fueron sembrados aleatoriamente en piscinas de 400 m² del sector A de la estación experimental de CENAIM – Palmar (Provincia de Santa

Elena, 02°01'23.9''S – 80°44'02.28''O), a razón de 8 animales/m² (tabla 1). 120 días después se realizó la cosecha.

Tabla 1.- Detalles de la siembra sector “A”; código P (pequeños), G (grandes).

Código (G-P)	PISCINAS	Tamaño de piscinas (m2)	Numero de Ind sembrados/piscina	Densidad de siembra (m2)	Peso inicial (PL/g)	Biomasa (g)
P	A-1	400	3200	8	194	16,5
P	A-2	400	3200	8	194	16,5
G	A-3	400	3200	8	65	49,3
P	A-4	400	3200	8	194	16,5
G	A-5	400	3200	8	65	49,3
P	A-6	400	3200	8	194	16,5
G	A-7	400	3200	8	65	49,3
P	A-8	400	3200	8	194	16,5
P	A-9	400	3200	8	194	16,5
G	A-10	400	3200	8	65	49,3
G	A-11	400	3200	8	65	49,3
G	A-12	400	3200	8	65	49,3
G	A-13	400	3200	8	65	49,3
P	A-14	400	3200	8	194	16,5

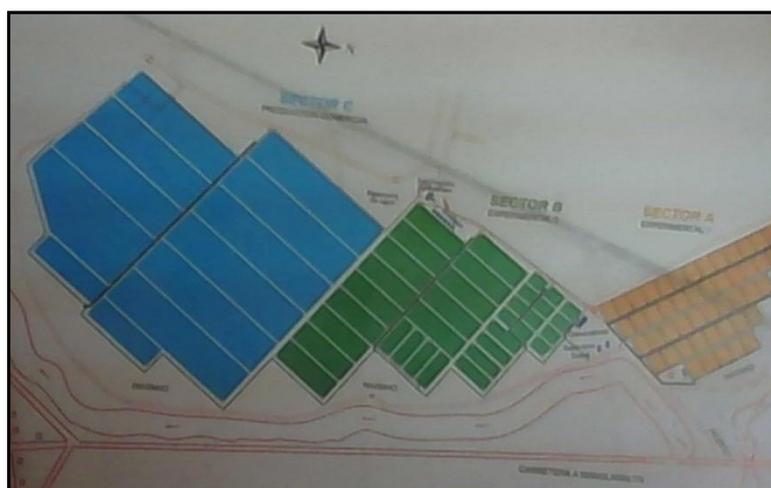


Fig 12.- Plano estación experimental CENAIM-PALMAR, lugar de siembra sector “A” (color naranja).

De los camarones tamizados se separó un lote (1200 camarones grandes), (1200 camarones pequeños), los cuales se colocaron en tanques de 500 litros en las instalaciones principales de CENAIM – ESPOL. Estos camarones se mantuvieron durante 175 días con un sistema de aireación “AIR LIFE”.

8.2. Sistema de monitoreos.

Los camarones sembrados, fueron monitoreados semanalmente a partir del día 30 posterior a la siembra (Fig 13). Para ello se tomaron 30 camarones por piscinas los que fueron pesados individualmente (ver anexo B).



Fig 13.- Sector “A” de la Estación Experimental CENAIM – PALMAR, lugar de siembra y monitoreos de los camarones.

8.2.1. Obtención de muestras.

En la estación se realizaron tres muestreos de animales (histología, dos animales/piscina) y de hemolinfa (hemocitos para los inmunoensayos, 10 animales por piscina), durante el brote de mancha blanca, después del brote y justo antes de la cosecha.

8.3. Prueba de desafío con WSSV.

Animales con pesos promedio de 4,1 para camarones silvestres grandes, 2,6 para silvestres pequeños y 6,5 para camarones domesticados, se trasladaron al set # 1 del CENAIM para realizar la infección a WSSV, se utilizaron 30 unidades experimentales (10 por grupo) (tabla 2).

Tabla 2.- Distribución de camarones por acuario para la prueba de desafío, 30 acuarios totales, tratamientos grandes, pequeños y domesticados.

GRANDES			PEQUEÑOS			DOMESTICADOS		
#AC	AC		#AC	AC		#AC	AC	
1	2	CONTROL	11	3	CONTROL	21	4	CONTROL
2	5		12	7		22	23	
3	12		13	11		23	24	
4	13		14	18		24	28	
5	15		15	19		25	29	
6	6		16	9		26	1	

7	8	WSSV	17	17	WSSV	27	10	WSSV
8	16		18	22		28	14	
9	21		19	25		29	20	
10	26		20	30		30	27	

En cada acuario asignado se colocaron 15 camarones, por lo tanto se utilizaron 450 camarones, 150 de grandes silvestres, 150 de pequeños silvestres y 150 de domesticados (Fig 14).

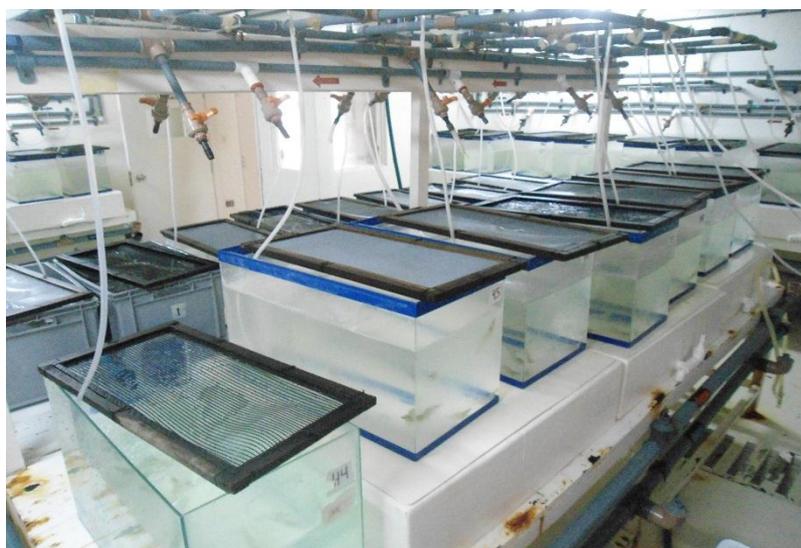


Fig 14.- Camarones ubicados en los acuarios con sus respectivos tratamientos, set # 1 CENAIM.

Los camarones fueron aclimatados durante 10 días, Las muestras se tomaron antes, durante y después de la infección para Histología, Inmunohistoquímica y ELISA,

Se utilizó papilla preparada con diluciones de tejidos de materiales infectado con WSSV y no infectados; los camarones fueron infectados al 2,5%.

La infección fue *per os*. La papilla fue mezclada y homogenizada antes de proporcionarla a los animales (Fig 15 a - b). Para incrementar las posibilidades de que los camarones desafiados consuman la papilla suministrada se sometió a los animales a un régimen sin alimentación por 48 h.

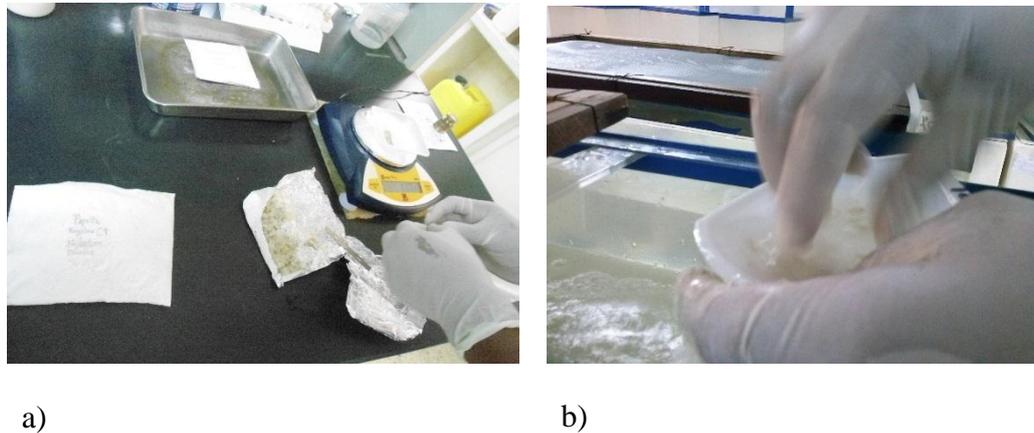


Fig 15.- a) Preparación de la papilla infectada, b) Colocación de la papilla en los acuarios de los camarones destinados al desafío.

Se monitoreó durante 15 días cada 2 horas, realizando recambios de agua al 100% al día. En cada monitoreo se extrajeron los camarones muertos y moribundos por WSSV. Al final del ensayo se pesó los camarones sobrevivientes.

8.3.1. Técnicas histológicas.

Se utilizó fijador Davidson que es el recomendable para camarones. Los animales se inyectaron en cabeza y abdomen; los camarones inyectados con Davidson fueron sometidos al proceso de fijación durante 24 h (Fig 16).



Fig 16.- Obtención de muestras para histología, fijación de camarones en las piscinas de CENAIM – Palmar.

Acto seguido, se procedió a la disección de las muestras, cabeza partida en la mitad, músculo y cola colocadas en cajas etiquetadas (Fig 17 a y b). Luego se realizó el proceso de deshidratación de la muestra, con alcoholes a diferentes porcentajes, 70, 80, 90, 95 100 % cada una durante 1 h.



a)



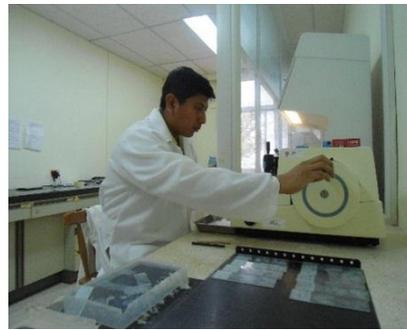
b)

Fig 17.- Disección de la muestra, cabeza, músculo y cola colocados en cajas específicas.

Se realizó bloques en inclusión de parafina. En el micrótomoto se realizaron cortes para luego ser colocados en portaobjetos (Fig 18 a - b). El proceso de desparafinado se realizó pasando los portaobjetos por, Xilol I, Xilol II, alcoholes al 100, 95, 90, 80 y 70 %. Los cortes pasaron el proceso de tinción con Hematoxilia-eosina, deshidratación con alcoholes al 70, 80. 90, 95 y 100 %, y Xilol I, Xilol II, para finalmente realizar el montaje con permount en el cubre objetos (Fig 18 c - d).



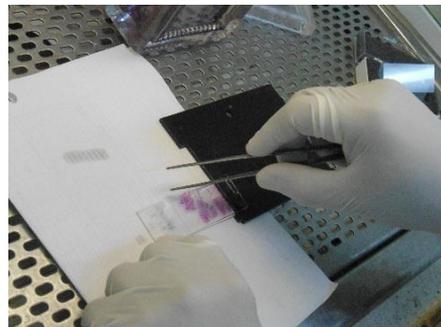
a)



b)



c)



d)

Fig 18.- a) Bloques realizados en inclusión de parafina, b) Cortes de tejidos de camarón, c) Proceso de tinción de las placas, b) Montaje de placas.

8.3.2. Elisa: “Enzyme-Linked Immunosorbent Assay” (CENAIM - ESPOL)

Los hemocitos (10 μ , 50.000 células, fijados al 3.7 % de formol y resuspendidos en agua destilada) previamente extraídos de los muestreos antes y después de la infección, se inmovilizaron por triplicado en discos de Nylon a la medida de 3mm (correspondiente al diámetro de los pocillos de la microplaca ELISA (Figura 19)). Se puso 100 μ L de agua destilada en cada pocillo para hidratar las células, para permeabilizar las células se añadió 100 μ L de metanol. Luego se colocó 200 μ L de la solución bloqueante (Roche) en cada pocillo durante 1 hora, para luego realizar 3 lavados con TBS + tween 20 al 0.1 %.

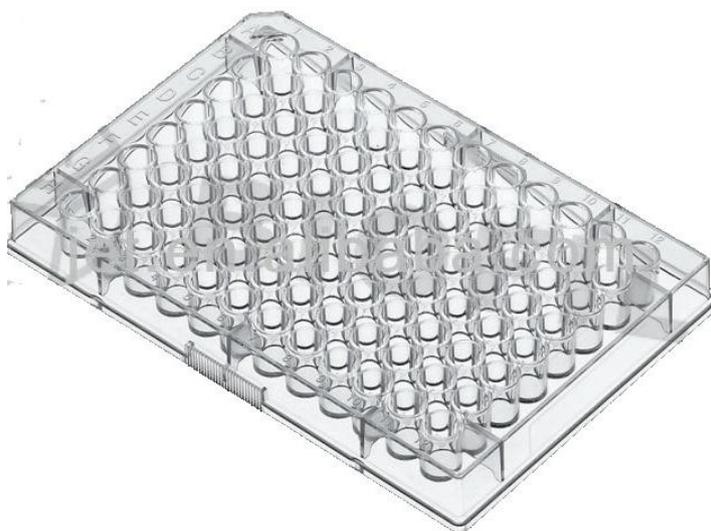


Fig 19.- Microplaca de 96 pocillos utilizada para la técnica ELISA – CENAIM.

Se procedió a colocar el primer anticuerpo en (Tbs+Tween) 100 μ L cada pocillo, las diluciones de los primeros anticuerpos fueron IGF 1/1000 y IFGBP 1/5000. Luego de 1 hora, se realizaron 3 lavados con TBS + tween 20. En seguida se procedió a añadir el segundo anticuerpo conjugado a la fosfatasa alcalina (1/1000). Para el control negativo no se colocó el segundo anticuerpo. Posteriormente se realizaron 3 lavados con TBS + tween 20. Consecutivamente se procedió a colocar

el sustrato (Pnpp en tampón diethanol–amine) para el revelado. Finalmente se realizaron lecturas de la microplaca cada 30 minutos durante 2 horas.

8.4. Parámetros inmunitarios

Se midió actividad PO, actividad antibacteriana y hemograma de los animales silvestres grandes y pequeños, así como de los domesticados siguiendo el protocolo descrito por Guillan *et al.* (2003).

8.5. Interpretación y análisis de resultados.

Los datos de supervivencias en la cosecha, al final del desafío y los datos obtenidos de pesos de los camarones se analizaron con un ANOVA de una vía con un nivel de confianza de 95% para determinar diferencias entre tratamientos. Previamente, se verificaron las asunciones de normalidad (Prueba de Kolmogorov-Smirnov) y homogeneidad de varianzas (Levene).

Se utilizaron los métodos de comparaciones múltiples *t - student* para determinar diferencias estadísticas entre las medias de los distintos tratamientos cuando el análisis de ANOVA no fuere significativo. Los resultados de las pruebas estadísticas fueron considerados significativos con $p < 0.05$.

La detección de IGF e IGFBP, se basó en la cuantificación de la reacción enzimática asociada a la formación de complejos inmunes, mediante el uso de anticuerpos unidos a una enzima fácilmente detectable, siendo estas medidas en el lector de microplacas.

9. RESULTADOS

La estrategia del estudio se basó en separar un lote de camarones silvestres (no han sometidos a ningún proceso de selección) en dos tallas; pequeños y grandes a fin de determinar si la talla está relacionada a susceptibilidad al WSSV y a expresión de factores de crecimiento.

El estudio comprendió varias etapas 1) Siembra y cosecha de camarones en el sector “A” de la estación CENAIM – PALMAR, en el que se evaluó el crecimiento en gramos y supervivencia en los camarones silvestres en condiciones naturales de desafío, no se aplicó ningún tipo de aditivo para controlar la salud (antibióticos, probióticos o β -glucanos). 2) Desafío con WSSV, donde se evaluó la supervivencia ante mancha blanca de los camarones silvestres en condiciones de laboratorio, tomándose como control camarones domesticados, y 3) ELISA para cuantificar las proteínas IGF e IGFBP en hemocitos.

9.1.- Separación de tallas grandes y pequeños.

Los resultados obtenidos en el análisis para la diferencia poblacional, mediante *t-student*, nos indicó que se obtuvo una población diferencial de dos tallas grandes y pequeños con un valor de $p = 3,70E-12$ (tabla 3) (anexo A. tabla 4).

Tabla 3.- Tallas promedios de los camarones silvestres separados.

Tallas	Longitud en mm.
Pequeños	8,65±1,61
Grandes	11,14±2,75

9.2.- Supervivencia y peso de camarones sembrados en el sector “A” CENAIM - PALMAR.

Hubo un brote de enfermedad de mancha blanca entre la 6 y 8 semana de cultivo (presencia de animales muertos) confirmado por histología (Fig 20), que ocasionó pérdidas de biomasa (Fig 21).

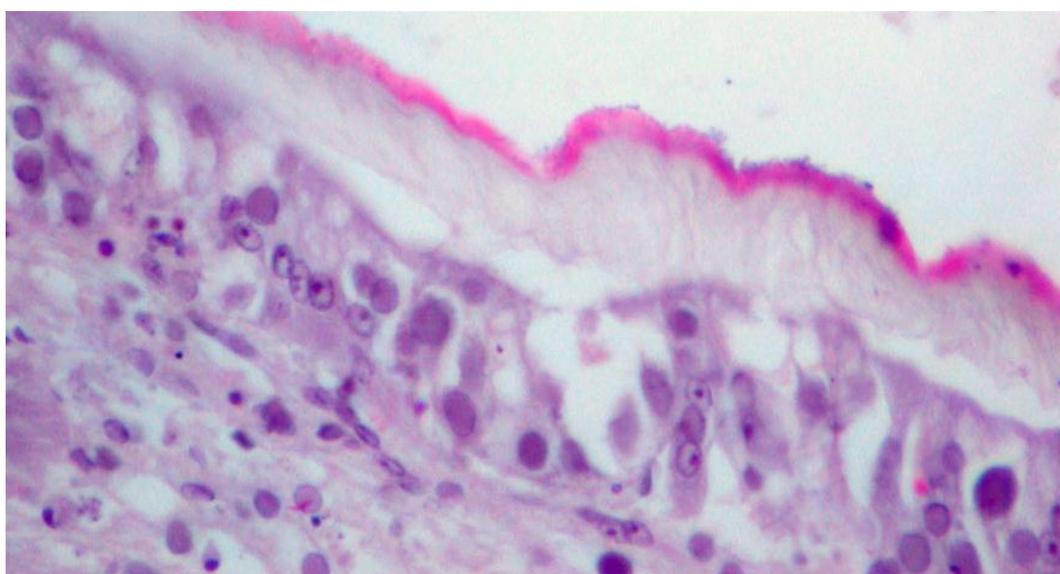


Fig 20.- Lesiones de mancha blanca en epitelio del estómago de animales moribundos debido a un brote en piscina (magnificación 70 x).

Los animales grandes tuvieron un peso significativamente mayor hasta la quinta semana (tabla 5). En la sexta semana coincidiendo con el brote de mancha blanca se perdió significancia, en tanto el muestreo de biomasa indicó pérdidas, principalmente en las piscinas de animales grandes (Fig 22). En los últimos muestreos ya no se detectaron diferencias significativas en peso (tabla 5). Estos resultados sugieren que en las piscinas grandes se perdieron los animales de mayor talla.

Tabla 5.- Pesos promedios semanales obtenidos en las piscinas.

SEMANAS	PEQUEÑOS	GRANDES	SIGNIFICANCIA
1	1,6	1,9	0,023<0.05
2	2,3	2,8	0,023<0.05
3	2,9	3,4	0,020<0.05
4	3,8	4,4	0,015<0.05
5	4,8	5,6	0,013<0.05
6	5,9	6,5	0,055>0.05
7	6,0	6,8	0,031<0.05
8	6,5	7,6	0,015<0.05
9	7,6	8,3	0,133>0.05
10	8,3	9,3	0,058>0.05
11	8,6	9,2	0,221>0.05
12	9,7	10,6	0,115>0.05

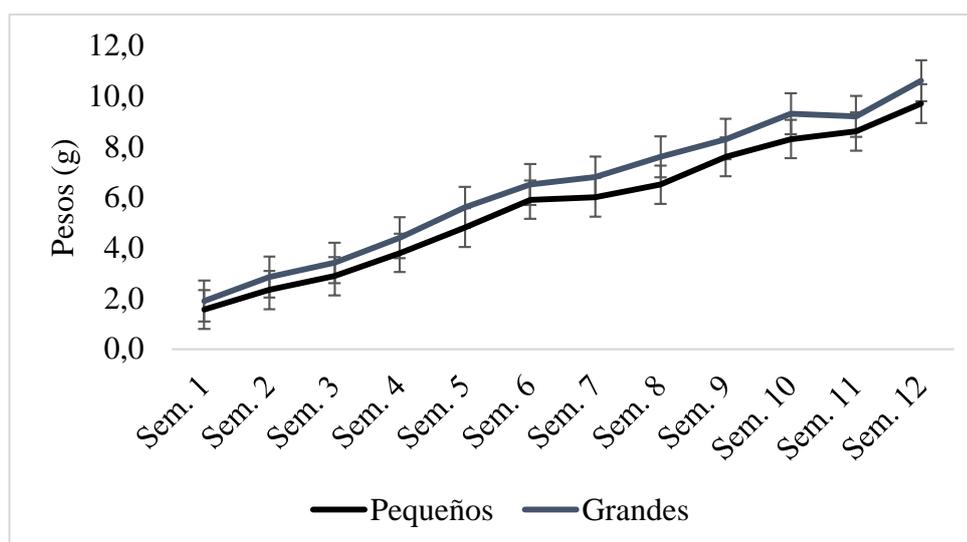


Fig 22.- Pesos semanales obtenidos en piscinas sembradas con animales pequeños y grandes.

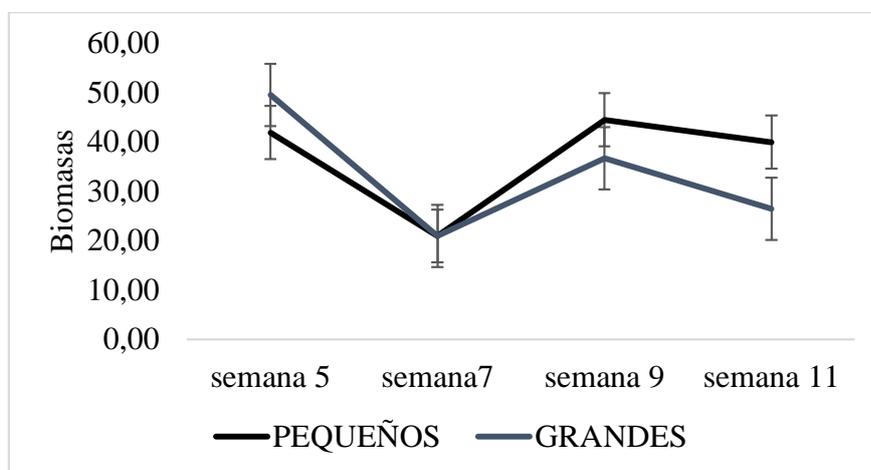


Fig 21.- Biomassas obtenidas en piscinas sembradas con animales pequeños y grandes.

En la cosecha, que se realizó unas semanas después del último muestreo de peso y biomasa, no se observaron diferencias en ningún parámetro de producción (tabla 6).

Tabla 6.- Indicadores de producción de las piscinas sembradas con animales grandes y pequeños.

Pequeños	Pesos	Spv	Libras	Lb/ha	#Camarones	F.C.A.
A1	8,36	59,42	35	875	1900	1,13
A2	8,79	59,72	37	925	1911	1,07
A4	8,69	58,8	36	900	1882	1,10
A6	8,67	44,18	27	675	1414	1,46
A8	10,26	47	34	850	1504	1,16
A9	11,3	42,69	34	850	1366	1,16
A14	10,15	53,12	38	950	1700	1,04
Media	9,46	52,13	34,43	860,71	1668,14	1,16
Desvest	1,11	7,47	3,60	89,97	238,85	0,14
Grandes	Pesos	Spv	Libras	Lb/ha	#Camarones	F.C.A.
A3	11,24	45,46	36	900	1455	1,10
A5	10,7	42,44	32	800	1358	1,23
A7	10,58	48,29	36	900	1545	1,10
A10	11,15	38,16	30	750	1221	1,32
A11	9,34	47,07	31	775	1506	1,27

A12	9,83	57,73	40	1000	1847	0,99
A13	10,44	72,02	53	1325	2305	0,75
Media	10,47	50,17	36,86	921	1605,29	1,11
Desvest	0,68	11,36	7,93	198,13	363,53	0,20

9.2.1- Análisis de supervivencia y peso de camarones sembrados en el sector “A” CENAIM - PALMAR en cosecha.

Análisis de supervivencia

La prueba de Kolmogorov-Smirnov proporcionó un resultado de sig. $P = 0,678$, indicando que los datos de supervivencias siguieron una distribución normal (ver nexa A tabla 7 y Fig 23). La significancia de Levene fue mayor al nivel de significación α (0.05); lo que indicó homogeneidad de las varianzas (ver anexo A tabla 8). En las piscinas sembradas con camarones grandes se obtuvo un promedio de 50,17 % de supervivencia, y en piscinas de camarones pequeños una supervivencia promedio de 52,13 % y un valor de $p = 0,79$ indicando que no hubo diferencias significativas (ver anexo A tabla 9 y 10).

Análisis de peso

La prueba de Kolmogorov-Smirnov proporcionó un resultado de sig. $P = 0,872$ indicando que los datos de supervivencias siguieron una distribución normal (ver anexo A tabla 11. Fig 24). La significancia de Levene fue mayor al nivel de significación α (0.05); lo que indicó homogeneidad de las varianzas de las medias de supervivencias de camarones grandes y pequeños (ver anexo A tabla 12).

El análisis estadístico dio un valor de $p = 0,063$ indicando que no hubo diferencias significativas de peso para un valor de $\alpha = 0,05$ (ver anexo A tabla 13 y 14).

Destaca que en las piscinas A8 y A9 sembradas con animales pequeños, se obtuvieron animales grandes y bajas supervivencias. En tanto en las piscinas A12 y A13 sembradas con animales grandes se obtuvieron altas supervivencias.

Correlación entre peso y supervivencia en piscinas.

Información anecdótica indica que luego de un evento de mortalidad, los animales sobrevivientes crecen rápidamente al disponer de mayor espacio y recursos. Por otra parte la literatura reporta mayor crecimiento y menor incidencia de mancha blanca en piscinas sembradas a baja densidad (Bayot *et al*, 2014). Estos dos aspectos de confusión deben considerarse en el estudio. Si los animales grandes y pequeños tienen la misma susceptibilidad al virus, la mortalidad en cada grupo debería ser aleatoria y los sobrevivientes tendrían una significativa ganancia de peso principalmente en el grupo de grandes. Sin embargo luego del brote las diferencias de peso fueron ínfimas, sugiriendo que en las piscinas sembradas con animales grandes se perdieron los camarones más grandes. La asociación entre peso y supervivencia se realizó mediante análisis de correlación y estimación del coeficiente de correlación de los dos grupos separados, encontrándose efectivamente mayor asociación en los animales pequeños ($r = -0.66$, $r^2 = 0.43$) (Fig 25) que en los grandes ($r = -0.34$, $r^2 = 0.11$) (Fig 26), obteniendo la correlación negativa para ambos grupos (ver anexo A tabla 15 y 16). Este resultado sugiere que en efecto en las piscinas grandes la mortalidad no fue aleatoria.

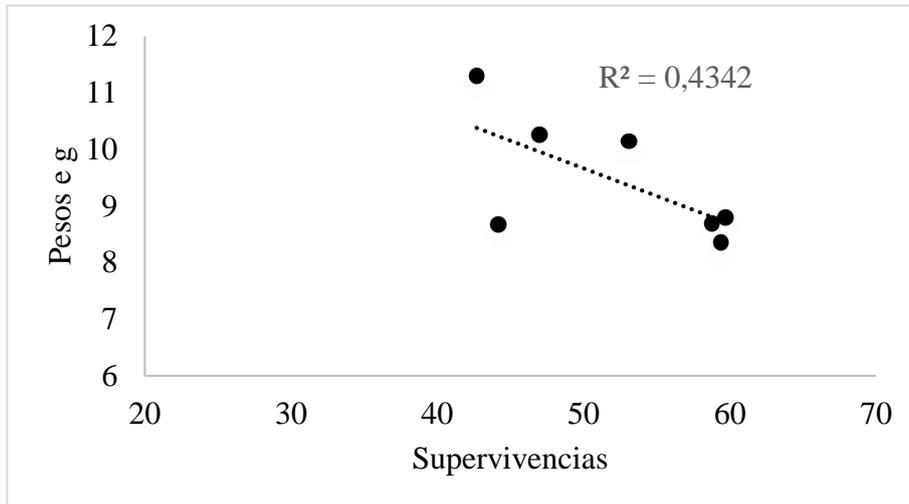


Fig 25.- Diagrama de dispersión entre peso y supervivencia de camarones silvestres pequeños.

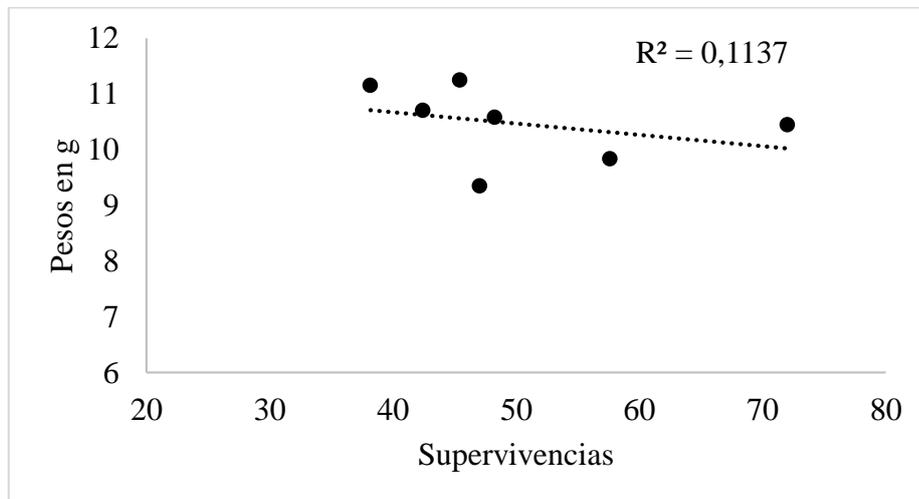


Fig 26.- Diagrama de dispersión entre peso y supervivencia de camarones silvestres grandes.

Tanto en las piscinas de animales grandes y pequeños se detectaron valores atípicos (“outliers”), si estas piscinas se eliminan del análisis los valore de peso y

supervivencia cambian, $p = 0.08$ para supervivencia (significativo al 90 % de confianza) y $p = 0.049$ para peso (anexo A tabla 17).

9.3.- Supervivencia y peso de camarones en el desafío con WSSV.

Antes de realizar el desafío se encontró una mayor supervivencia en el lote de los animales pequeños (50%), versus los camarones grandes que tuvieron una supervivencia de (35 %). Se tomaron pesos antes y después de la infección (Fig 27), observándose que no hubo detención del crecimiento en los tres grupos de animales

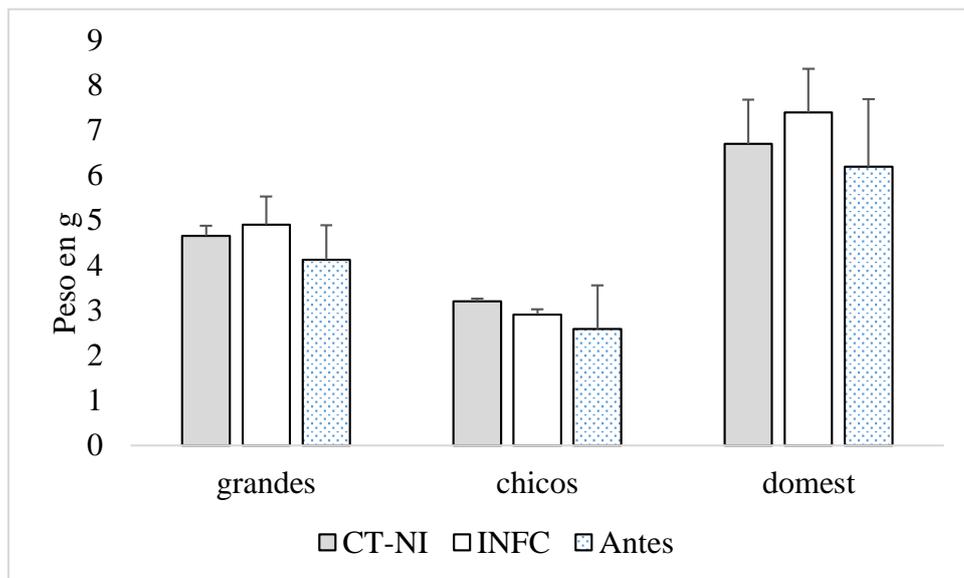


Fig 27.- Pesos de camarones pequeños, grandes y domesticados antes de la infección, no infectados (controles negativos) e infectados.

La eficiencia de la infección con mancha blanca se verificó mediante histología (Fig 28)

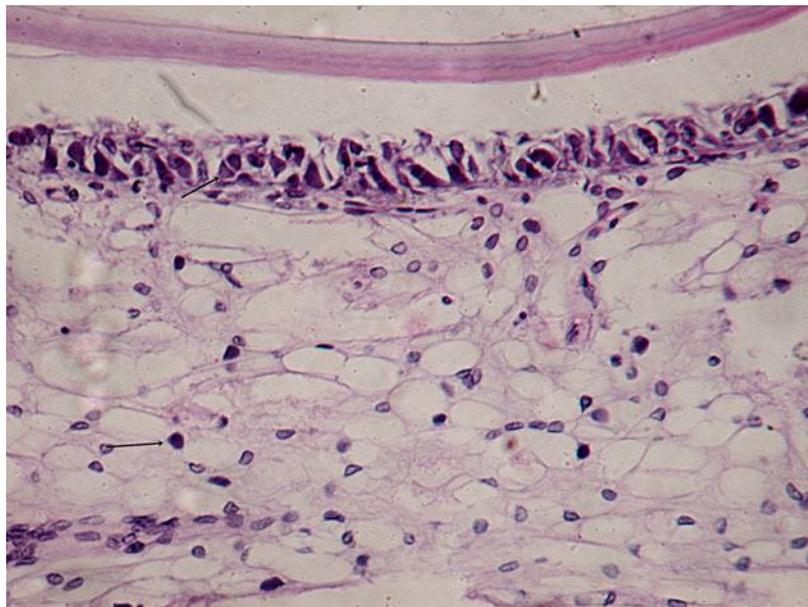


Fig 28.- Lesiones de mancha blanca en epitelio de estómago (magnificación 70 x)

Los resultados de supervivencias promedio para camarones pequeños fueron de $44\% \pm 5,48$, para camarones grandes $40\% \pm 7,07$ y para camarones domesticados $54\% \pm 5,48$ (Fig. 29)

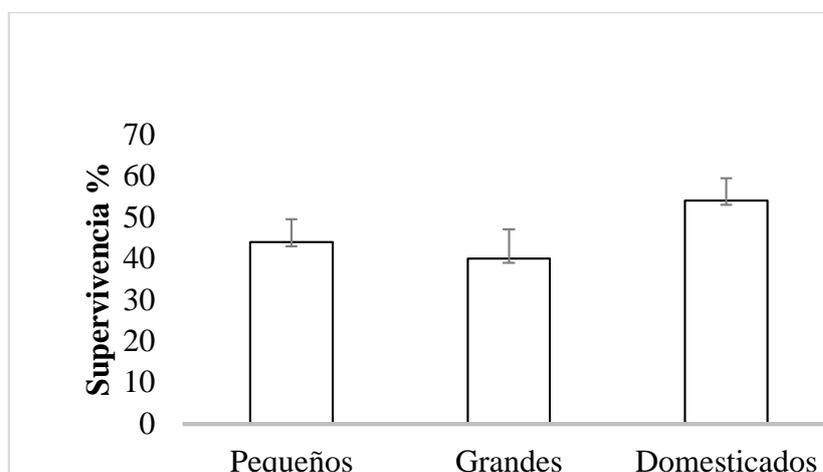


Fig. 29.- Supervivencia de camarones silvestres pequeños, grandes y camarones domesticados.

La prueba de Kolmogorov-Smirnov para supervivencia a WSSV entre camarones silvestres pequeños, grandes y camarones domesticados dio un valor de significancia de $p = 0,393$ (ver anexo A tabla 18), por lo consiguiente los datos obtenidos tuvieron una distribución normal (ver anexo A. Fig. 30). La prueba de Levene indicó homogeneidad de las varianzas de las medias de supervivencias de camarones grandes, pequeños y domesticados (ver anexo A. tabla 19).

Los datos de ANOVA fueron significativos ($p = 0,009$) para supervivencia, indicando que en las supervivencia obtenidos para camarones silvestres pequeños, grandes y camarones domesticados al menos en un grupo existió diferencias significativas (ver anexo A tabla 20). La prueba de Tukey mostró diferencias significativas de supervivencia entre camarones silvestres grandes y camarones domesticados $p = 0,009$, pero no entre camarones silvestres pequeños y domesticados (ver anexo A tabla 21).

9.4. Inmuno dosificaciones mediante ELISA de los factores de crecimiento IGF e IGFBP en los camarones antes y después de la infección experimental.

Uno de los objetivos de este estudio fue relacionar la expresión de IGF e IGFBP con una menor susceptibilidad al WSSV debido a su efecto sobre los tejidos inmunes. No fue posible detectar la IGFBP mediante ELISA (tabla 22). Sin embargo si se detectó IGF en animales pequeños antes y después de la infección y en los animales grandes después de la infección (tabla 23) (ver anexo A tabla 24 y 25).

Tabla 22.- ELISA contra IGFBP

	Pequeños	Grandes	Domesticados	CT-
Antes de la infección	151±18	167±23	163±15	203
Después de la infección	204 ±29	196 ±49	176 ± 27	

Tabla 23. ELISA contra IGF.

	Pequeños	Grandes	Domesticados	CT-
Antes de la infección	261±40	211±25	213±36	200
Después de la infección	238±42	256±42	207±4	

9.5. Parámetros inmunitarios en animales grandes y pequeños infectados y no infectados con WSSV.

Tres parámetros se midieron en animales silvestres grandes y pequeños y en animales domesticados infectados y no infectados. La actividad PO fue mayor en los animales pequeños y en los domesticados, en particular luego de la infección (Fig 31).

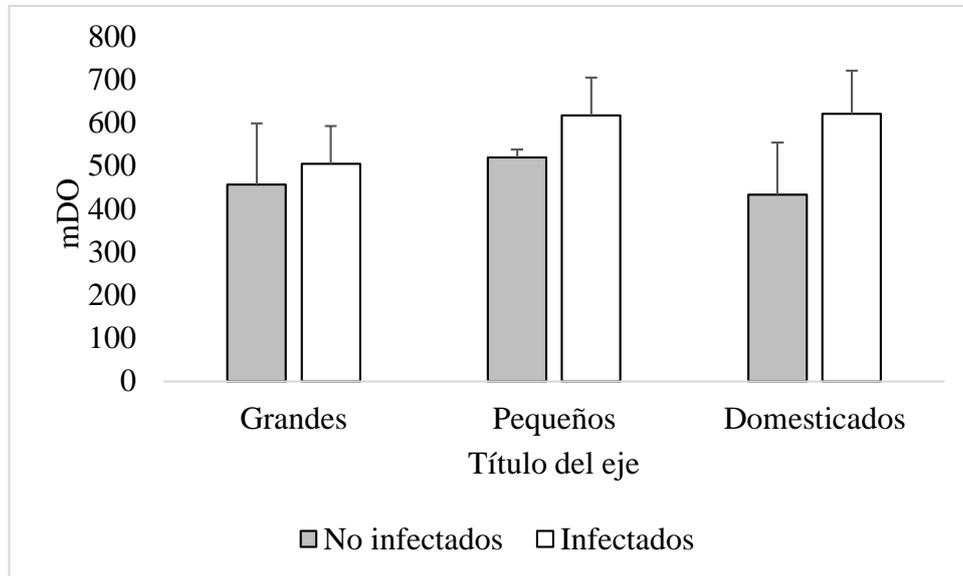


Fig 31.- Actividad Fenoloxidasa (PO) de los animales desafiados, grandes, pequeños y domesticados.

La actividad antibacteriana del plasma fue muy baja en los tres lotes, en particular en los domesticados, donde se detectó valores del 0 %. En los animales pequeños la actividad antibacteriana se incrementó luego de la infección (Fig 32).

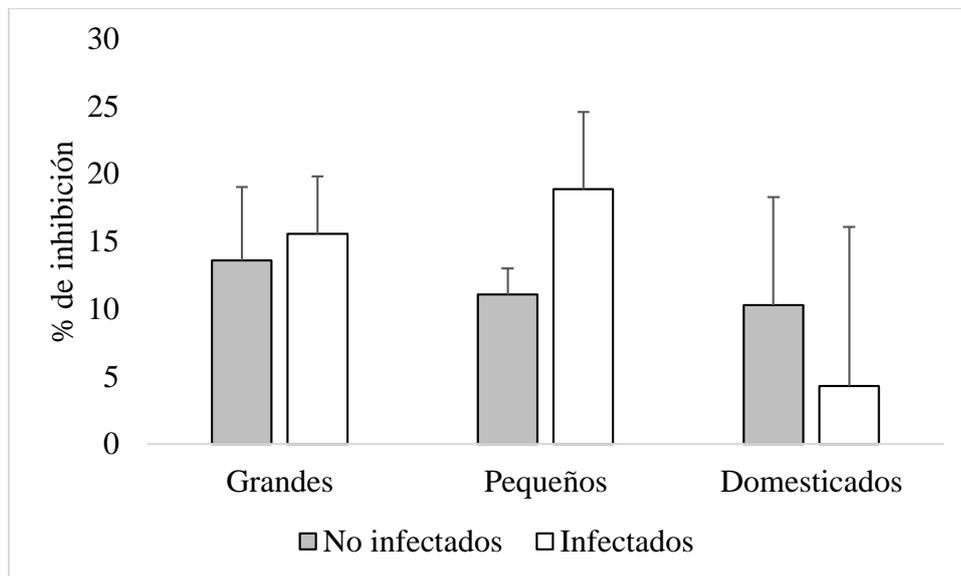


Fig 32.- Actividad antibacteriana del plasma de animales silvestres pequeños, grandes y domesticados infectados y no infectados con WSSV.

9.6. Hemogramas de hemocitos en camarones silvestres pequeños, grandes y domesticados en desafío.

Se obtuvieron los hemogramas de los camarones silvestres de tallas pequeñas, grandes y camarones domesticados no infectados e infectados, no se encontró diferencia significativa en cuanto a conteos de hemocitos (ver anexo A tabla 26 y 27), (Fig 33.). El análisis de histología mostró que los animales supervivientes de los tres grupos no presentaron lesiones de mancha blanca, detectándose una fuerte infiltración de hemocitos en los tejidos.

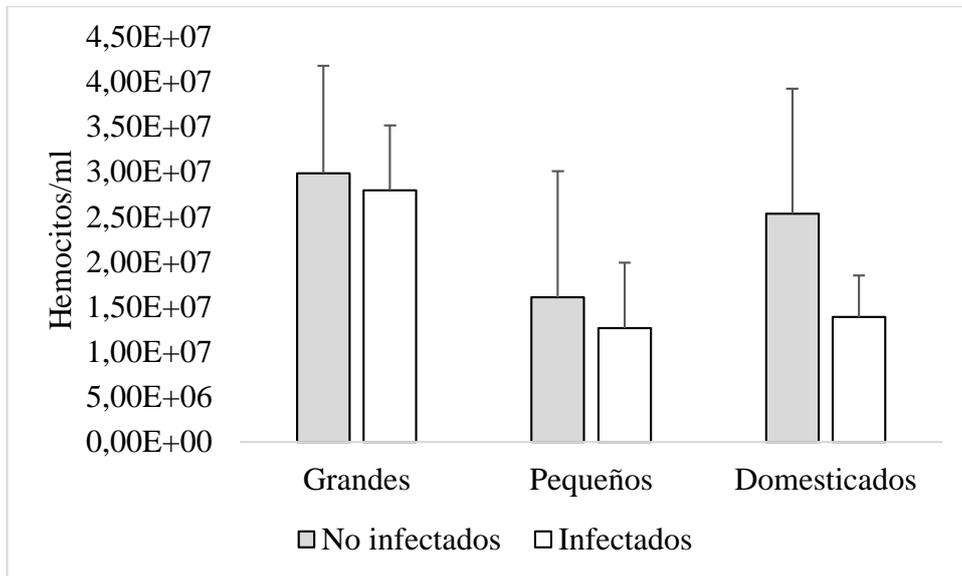


Fig 33.- Hemograma de animales silvestres pequeños, grandes y domesticados infectados y no infectados con WSSV.

10. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

10.1. Conclusiones

- En el campo si bien se cosecharon más libras de las piscinas sembradas con animales pequeños, no se encontraron diferencias significativas en peso y supervivencia. Los análisis estadísticos indicaron mortalidad de los animales más grandes en las piscinas sembradas con animales grandes (perdida de significancia durante los brotes). Los análisis histológicos detectaron el virus de la mancha blanca.
- En la infección con WSSV, los análisis histológicos detectaron lesiones típicas del virus de la mancha blanca.
- En el desafío la mayor supervivencia se detectó en los camarones domesticados con diferencias significativas con respecto a los grandes, más no a los pequeños.
- Solo en los hemocitos de animales pequeños se detectó IGF antes del desafío y en los sobrevivientes. Solo en los sobrevivientes grandes se detectó IGF.
- Los parámetros inmunitarios actividad PO y actividad antibacteriana fueron más importantes en los animales silvestres pequeños sobrevivientes, indicando una mejor calidad de hemocitos.
- En conjunto los datos analizados hasta el momento permiten concluir que los animales de mayor talla son más susceptibles al WSSV y a las

condiciones de cultivo. Hay evidencia de mayor mortalidad entre los animales más grandes y menor supervivencia de los representantes de este grupo que crecieron en laboratorio. Por otra parte se detectó IGF en los hemocitos de los animales pequeños, animales que además expresaron mejores parámetros inmunitarios.

10.2. Recomendaciones

- Fortalecer el presente estudio con camarones domesticados que han sido mejorados genéticamente en laboratorios.
- Si se evalúa la supervivencia y ganancia de pesos en camarones silvestres con siembras en piscinas, utilizar al menos una piscina con camarones domesticados como control.
- Se recomienda continuar el estudio, para determinar si la IGFBP interviene en la localización de la IGF, en tejidos hematopoyéticos, órgano linfoides y músculos.
- Utilizar en los desafíos camarones con pesos homogéneos tanto silvestres como domesticados, para obtener la relación peso y supervivencia con exactitud.
- Realizar la inmunolocalización de los factores de crecimiento.

11. BIBLIOGRAFIA.

- Aguirre Guzmán, G., y F. Ascencio-Valle. 2000. Infectious disease in shrimp species with aquaculture potential. *Recent Research of Developmental Microbiology*, 4: 333-348 *Research Signpost T.C. 36/248 (2)*, Trivandrum 8, India.
- Alday de Graindorge, V. y Griffith, D. 2000. Ecuador. In: *Thematic review on Management Strategies for Major Diseases in Shrimp Aquaculture*. A component of the WB/ NACA/WWF/FAO Program on Shrimp Farming and the Environment. Report of the workshop held in Cebu, Philippines from 28–30 November, 1999. pp. 17–19.
- Anggraeni, M.S., and L. Owens. (2000). The haemocytic origin of lymphoid organ spheroid cells in the penaeid prawn *Penaeus monodon*. *Diseases of Aquatic Organisms* 40, 85-92.
- Bachere, E. (2000). Shrimp immunity and disease control. *Aquaculture*, 191,3-11
- Bachere, E. (2002). Anti-Infections immune effectors in marine invertebrate. Potential for disease control in larviculture. *Aquaculture*, 237,427-438.
- Baker, J., J. p. Liu, E. J. Robertson and A. Efstratiadis. 1993. Role of insulin-like growth factors in embryonic and post natal growth. *cell*.75:73-82.
- Bayne, J.C., 1990. Phagocytosis and non-self recognition in invertebrates. *BioScience* Vol. 40 N0. 10:723-731.

- Bayot B., Rodríguez J., Arguello W., Herminia Cornejo M., Sonnenholzner S. 2014. An evaluation of intraspecific competition for Pacific white shrimp *Penaeus vannamei* (Boone) in extensive/ semi-intensive ponds.
- Bell TA, Lightner DV (1988) A handbook of normal penaeid shrimp histology. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA
- Berger, C. 2000. Aportes de la Bio-tecnología a la alimentación y a la inmunoestimulación de camarones peneidos. En: Cruz Suárez, L.E., D. Ricque-Marie, M. Tapia Salazar, M.A. Olvera-Novoa, y R. Civera-Cerecedo, (Eds.) Avances en Nutrición Acuícola. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 19-22 Noviembre, 2000. Merida, Yucatán.
- Bonami, J.R., D.V. Lightner, R.M. Redman, and, 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.
- Bonami J.R., Hasson, K.W., Mari, J., Poulos, B.T. and Lightner, D.V. (1997). Taura syndrome of marine penaeid shrimp: characterization of the viral agent. *Journal of General Virology* 78, 313-319.
- Calderón, J., B. Bayot, I. Betancourt, and V. Alday de Graindorge. (1999). Monitoreo del virus de la mancha blanca en Ecuador. *El Mundo Acuícola* 5, 211-214.
- Cámara nacional de acuicultura 2014. Informe de las exportaciones camarones en ecuador mayo 2014. Revista # 105

- Chang, C.F., M.S. Su, H.Y. Chen, C.F. Lo, G.H. Kou, y I.C. Liao. 1996. Effect of dietary B -1,3 glucans on resistance to white spot syndrome virus (WSSV) in postlarval and juvenile *Penaeus monodon*. Diseases of Aquatic Organisms 36:163-168.
- Chang, P.S., H.C. Chen, y Y.C. Wang. 1998. Detection of white spot syndrome associated baculovirus in experimentally infected wild shrimp, crab and lobsters by in situ hybridization. Aquaculture 164:233-242.
- Chou, H. Y., C. Y. Huang, C. F. Lo, y G.H. Kou, 1998. Studies of transmission of white spot syndrome associated baculovirus (WSBV) in *Penaeus monodon* and *P. japonicus* via water-borne contact and oral ingestion. Aquaculture 164:263-276.
- Chou, H.Y., C.Y. Huang, C.H. Wang, H.C. Chiang, y C.F. Lo. 1995. Pathogenicity of a baculovirus infection causing white spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Taiwan. Diseases of Aquatic Organisms 23:165-173.
- Chuang, N. N. and P.C. Wang. 1994. Characterization of insulin receptor from the muscle of the *Penaeus japonicus*. Comp. Biochem. Physiol.108:289'297.
- Cohen, J. J. 1993. Overview: Mechanims of apoptosis. Immunology Today 14(3): 126-130.
- CSIRO (Commonwealth Scientific Industrial Research Organization). 2404. [www.csiro.au/images/ general/IGF.1](http://www.csiro.au/images/general/IGF.1)
- Cowley J.Christine M. Dimmock', Chainarong wongteerasupaya, Vichai Boonsaeng, Sakol panyim, Peter J. walker (1999). Yellow head virus

from Thailand and gill-associated virus from Australia are closely related but distinct prawn viruses.

Davidson. J. K., Falkmer, S., Mehratra, B. K. and S. Wilson. 1971. Insulin assay and light microscopical studies of digestive organs in protostomian and deuterostomian species and coelenterates. *Gen. Comp. Endocrin.* 17:388-401. And 88

De la Rosa-Vélez, J., Cedaño-Thomas, Y., Cid-Becerra, J., Méndez-Payán, J. C., Vega-Pérez, C., Zambrano-García, J. & Bonami, J. R. 2006. Presumptive detection of yellow head virus by reverse transcriptase-polymerase chain reaction and dot-blot hybridization in *Litopenaeus vannamei* and *L. stylirostris* cultured on the Northwest coast of Mexico. *Journal Fish Diseases* 29: 717-726.

Destoumieux, D., P. Bulet, D. Loew, A. Van Dorsselaer, J. Rodríguez, and E. Bachere (1997). Penaeidins, a new family of antimicrobial peptides isolated from the shrimp *Penaeus vannamei* (Decapoda). *The Journal of Biological Chemistry.* 1997; 272(45): 28398-28406.

Destomieux, D., Muñoz, M., Cosseau, C., Rodríguez, J., Bulet, P., Comps, M. y Bachère, E. 2000. Penaeidins, antimicrobial peptides with chitin-binding activity, are produced stored in shrimp granulocytes y released after microbial challenge. *Journal of Cell Science* 113: 461- 469.

Durand, S., D.V. Lightner, L.M. Nunan, R.M. Redman, J. Mari, and R. Bonami. (1996). Application of gene probe as diagnostic tools for White Spot Baculovirus (WSBV) of penaeid shrimp. *Diseases of Aquatic Organisms* 27, 59- 66.

- Durand, S.V., 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.
- Escobedo-Bonilla, C.M., Alday-Sanz, V., Wille, M., Sorgeloos, P., Pensaert, M.B., Nauwynck, H.J., 2008. A review on the morphology, molecular characterization, morphogenesis and pathogenesis of white spot syndrome virus. *Journal of Fish Diseases* 31, 1–18.
- FAO (2006) State of World Aquaculture: 2006. FAO Fisheries Technical Paper No. 500. Food and Agricultural Organization, Rome.
- Flegel, T. W. y T. Pasharawipas. 1998. Active viral accommodation: A new concept for Crustacean Response to viral Patogen. In: Flegel, T. W. (Eds). *Advances in Shrimp Biotechnology*. National Center for Genetic Engineering y Biotechnology. Bangkok 245-250p.
- Gallardo. N. O. Carrillo., E. moltó., M. Deas., R. González-Sufuez., J' M' Canascosa' M. Ros and A. Andres. 2003. Isolation and biological characterization of a 6-k Da protein from hepatopancreas of lobster *Panulirus argus* with insulin-like effects. *General and comparative endocrinology*. Vol. 131. Pp' 284'294'.
- Granja, C., L. F. Aranguren., O. M. Vidal, L. Aragón, y M. Salazar. 2003. Does hypertermia increase apoptosis in white spot syndrome virus (WSSV) infected *Litopenaeus vannamei*. *Diseases of Aquatic Organisms* 54: 73-78.
- Gross, P.S., Bartlett, T.C., Browdy, C.L., Chapman, R.W., Warr, G.W., 2001. Immune gene discovery by expressed sequence tag analysis of

hemocytes and hepatopancreas in the Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*, and the Atlantic White Shrimp *L. setiferus*. *Dev. Comp. Immunol.* 25, 565–577.

Giulianini, P. G., M. Bierti, S. Lorenzon, S. Battistella and E. A. Ferrero. 2007. Ultrastructural and functional characterization of circulating hemocytes from the freshwater crayfish *Astacus leptodactylus*: Cell types and their role after in vivo artificial non-self challenge. *Micron*, 38:49-57

Gullian, M., F. Thompson, y J. Rodriguez. 2003. Selection of probiotic bacteria and study of their immunostimulatory effect in *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* 233 (2004) 1- 14.

Gutierrez a. (2008). Characterization of insulin-related peptides and their relation to mold and metabolism of the shrimp *Litopenaeus vannamei*, K.U. Leuven, Lovaina – Bélgica.

Häcker, G. 2000. The morfology of Apoptosis. *Cell Tissue Res* 301: 15-17.

Hasson, K.W., D.L. Lightner, B.T. Poulos, R.M. Redman, B.L. White, J.A. Brock, y J.R. Bonami. 1995. Taura syndrome in *Penaeus vannamei*: demonstration of a viral etiology. *Diseases of Aquatic Organisms* 23:115-126.

Hasson, K; W. Lightner. (1999). Taura Syndrome Virus (TSV) lesin development and the disease cycle in the pacific White Shrimp *Litopenaeus vannamei* *Diseases of Aquatic Organisms*,36,81-93.

- Hose, J.E., and G. Martin. (1989). Defense functions of granulocytes in the ridgeback prawn *Sicyonia ingentis*. *Journal of Invertebrate Pathology* 53, 335-346.
- Jose S., Jayesh P., Sudheer N.S., Poulouse G., Mohandas A., Philip R., Singh I.S.B. 2012. Lymphoid organ cell culture system from *Penaeus monodon* (fabricius) as a platform for white spot syndrome virus and shrimp immune-related gene expression. *Journal of Fish Diseases* 35:321-334.
- Kasornchandra, J., S. Boonyaratpalin, y T. Itami. 1998. Detection of white spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Asia. Microscopic observation and polymerase chain reaction. *Aquaculture* 164:243-251.
- Kautsky, N., P. Rönnbäck, M. Tedengren, y M. Troell. 2000. Ecosystem perspectives on management of disease in shrimp pond farming. *Aquaculture* 191:145-161.
- Khanobdee, K., C. Soowannayan, T.W. Flegel, S. Ubol, and 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, and M.J. Oh. (1999). Changes in *Penaeus chinensis* haemocytes during white spot baculovirus (WSBV) infections. *Bulleting of the European Association of Fish Pathologists* 19(5), 213.
- Kurosky, P. J., B. Xu, A. K. Chopra, D. H. Coppenhaver, I. P. Singh, S. Baron. 2000. Broad antiviral activity in tissues of crustaceans. *Antiviral Res* 48 (1): 39 -47.

- Le Moullac, G., L.P. De Laborie, D. Saulnier, C. Goarant, and M. Dehasque. (1998). Principles and problems involved in the evaluation of immunostimulants on juvenile shrimp. IV Symposium International de Nutrition Acuicola, La Paz, B.S.C. Mexico.
- Lightner, D.V., R.M. Redman, K.W. Hasson, y C.R. Pantoja. 1995. Taura syndrome in *Penaeus vannamei* Crustacea: Decapoda: gross signs, histopathology and ultrastructure. *Diseases of Aquatic Organisms* 1:53-59.
- Lightner, D.V. 1996. Handbook of pathology and diagnostic procedures for diseases of penaeid acute viremia (PAV). *Fish Pathology* 31:39-45.
- Lightner, D.V., K.W. Hasson, B.L. White, and 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.
- Lightner, D.V., y P. Chen. 2000. Necrosis hipodérmica hematopoyética infecciosa. <http://www.oie.int>.
- Lin, K., Hsin, H., Libina, N., and Kenyon, C. (2001). Regulation of the *Caenorhabditis elegans* longevity protein DAF-16 by insulin/IGF-1 and germline signaling. *Nat. Genet.* 28, 139-145.
- Lin x., Soderhall K., Soderha I. 2011. Invertebrate Hematopoiesis: an Astakine – Dependent Novel Hematopoietic Factor. *The Journal of Immunology*: 2073- 2079.

- Lo, C. F., Leu, J. H., Chen, C. H., Peng, S. E., Chen, Y. T., Chou, C. M., Yeh, P. Y., Huang, C. J., Chou, H. Y., Wang, C. H. & Kou, G. H. 1996. Detection of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) in penaeid shrimps using polymerase chain reaction. *Diseases of Aquatic Organisms* 25: 133-141.
- Lo, C.F., Y.S. Chang, C.T. Cheng, y G.H. Kou. 1998. PCR monitorig of cultured shrimp for white spot syndrome virus (WSSV) infection in growout ponds Paginas 281-286. En: T.W. Flegel (editor). *Advances in Shrimp Biotechnology*. National Center for Genetic and Biotechnology, Bangkok, Tailandia.
- Martin, G., and B. Graves. (1985). Fine structure and classification of shrimp hemocytes. *Journal of Morphology* 185, 339- 348.
- Martínez-Córdova L, A Campaña-Torres & M Porchas-Cornejo. 2002. Promotion and contribution of biota in low water exchange ponds farming blue shrimp, *Litopenaeus stylirotris* (Stimpson). *Aquaculture Research* 33: 27-32.
- Mohan, C.V., K.M. Shankar, S. Kulkarni, y P.M. Sudha. 1998. Histopathology of cultured shrimp showing gross signs of yellow head syndrome and white spot syndrome during 1994 Indian epizootics. *Diseases of Aquatic Organisms* 34:9-12.
- Montesdeoca, M., Y. Amano, F. Echevarría, I. Betancourt, F. Panchana, M. Sotomayor y J. Rodríguez. 2002. La respuesta inmunitaria celular del camarón *Litopenaeus vannamei* al WSSV y su utilidad en el control de la enfermedad en los estanques. *El Mundo Acuícola* 8:38-42.

- Montoya – Rodríguez. A. y S. López-Félix. 2000. Estandarización de técnicas moleculares para la detección de patógenos en organismos acuáticos. Pp. 263-279. En memoria del III Simposium Internacional de Acuicultura. Mazatlán, Sin. Méx., del 5 al 7 de octubre. 382 pp.
- Momoyama K. H. Hiraoka. H. Nakano, K. Koube, K. Inouye, and N. Oseko. (1994). Mass mortalities of cultured kuruma shrimp, *Penaeus japonicus* in Japan in 1993: histopathological study. *Fish Pathology*, 29, 141-148.
- Muñoz, M., F. Vandebulcke, D. Saulnier, E. and 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.
- Nadala ECB, Loh PC (2000) Dot-blot nitrocellulose enzyme immunoassays for the detection of white-spot virus and yellow-head virus of penaeid shrimp. *J Virol Methods* 84:170–175
- Natividad KDT, Nomura N, Matsumura M (2008) Detection of White spot syndrome virus DNA in pond soil using a 2-step nested PCR. *Journal of Virological Methods* 149: 28–34. doi: 10.1016/j.jviromet.2008.01.013 <https://www.deepdyve.com/lp/elsevier/detection-of-white-spot-syndrome-virus-dna-in-pond-soil-using-a-2-step-NylqrjrOa2>
- O'Brien, V. 1998. Viruses y apoptosis. *Journal of General Virology* 79: 1833-1845.
- O'Connor R., Kauffmann-Zeh Liu Y., Lehar S., Evan G., Baserga R., Blatter W., A., Identification of Domains of The Insulin-Like Growth Factor I. 1997. Receptor That Are Required For Protection from Apoptosis. *Molecular and cellular biology* 17 (1): 427-435.

- Pantoja C.R., and D.V. Lightner. (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.
- Park JH, Lee YS, Lee S, Lee Y (1998) An infectious viral disease of penaeid shrimp newly found in Korea. *Dis Aquat Org* 34:71–75.
- Pascual Cristina, (2007). Bases teórico prácticas para el conteo de células sanguíneas en camarones cultivados, Facultad de Ciencias Universidad Autónoma de México (UNAM).
- Pérez et al. 2002., Supervivencia diferencial de familias de *Litopenaeus vannamei* Desafiadas con el virus de la mancha blanca.
- Pollak M., Schernhammer E., Hankinson S. 2004. Insulin- Link growth factors and neoplasia. *Nature reviews/cancer* 4: 505 – 5018.
- Poulos, B. T., Pantoja, R. C., Bradley-Dunlop, D., Aguilar, J. & Lightner, D. V. 2001. Development and application of monoclonal antibodies for the detection of white spot syndrome virus of penaeid shrimp. *Diseases of Aquatic Organisms* 47: 13-23.
- Powell J., Burge J., Craig L., Eleanor F 2006. Efficiency and sensitivity determination of Shrimple®, an immunochromatographic assay for white spot syndrome virus (WSSV), using quantitative real-time PCR.
- Pramod Kiran, R.B., K.V. Rajendran, S.J. Jung, y M.J. Oh. 2002. Experimental susceptibility of different life-stages of the giant freshwater prawn,

Macrobrachium rosenbergii (de Man), to white spot syndrome virus (WSSV). Journal of Fish Diseases 25:201-207.

Rajendran, K.V., K.K. Vijayan, T.C. Santiago, y R.M. Krol. 1999. Experimental host range and histopathology of white spot syndrome virus (WSSV) infection in shrimp, prawns, crabs and lobsters from India. Journal of Fish Diseases 22:183-191.

Rodríguez, J., V. Boulo, E. Mialhe, and E. Bachere. (1995). Characterisation of shrimp haemocytes and plasma components by monoclonal antibodies. Journal of Cell Science 108.

Rojtinnakorn, J., I. Hirono, T. Itami, Y. Takahashi, and 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.

Ruiz Uribe, (2007). Citospin, una alternativa para el estudio y caracterización morfológica de Hemocitos de camarones Peneidos, revista Ciencia y Mar XI (31), PP 33-38.

Sanders, B. (1983). Insulin-like peptides in the lobster *Homarus americanus*. I. Insulin immunoreactivity. General and Comparative Endocrinology 50, 366-373

Sahul Hameed, A.S. K., Yoganandhan, S. Sathish, M. Rasheed, V. Murugan, and K. Jayaraman. (2001). White spot syndrome virus (WSSV) in two species of freshwater crabs (*Paratelphusa hydrodomous* and *P. pulvinata*). Aquaculture 201, 179-186.

- Sahtout, A; & H. Hassan, (2001). DNA fragmentation, an indicator of apoptosis, cultured black tiger shrimp *Penaeus monodon* infected with White spot syndrome virus (WSSV) *Diseases of Aquatic Organisms*, 44,155-159.
- Sara V. R. and K. Hall. 1990. Insulin-like growth factor and their binding proteins-Physiological. *Reviews: the American Physiological Society*. Vol. 70-No. 3- Pp.591-605.
- Savill, J., V. Fadok, P. Henson, y C. Haslett. 1993. Phagocyte recognition of cell undergoing apoptosis. *Immunology Today* 14 (3): 131-136.
- Shankar, K.M., y C.V. Mohan. 1998. Epidemiological aspects of shrimp viral disease in India - A review. *Journal of Aquaculture in the Tropics* 13 (1): 43-49.
- Shi, Z. 2000. Etude d'un virus bacilliforme des crevettes Penaidae ("White Spot Syndrome Virus", WSSV): clonage, analyse partiel du génome et outils de diagnostic. Thèse Doctoral. Academie de Montpellier. Université Montpellier II. Sciences et Techniques du Languedoc. 205 pp.
- Söderhäll, K., y L. Cerenius. 1992. Crustacean Immunity. *Annual Review Fish Diseases* 1: 2- 21.
- Söderhäll, K., Cerenius, L. & Johansson, M.W. (1994) The prophenoloxidase activating system and its role in invertebrate defence. In: *Annals New York Academy of Sciences* pp 155-161.
- Söderhäll, K., y L. Cerenius. 1998. Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Curr. Opin. Immunol* 10: 23-28.

- Sugumaran, M. 1996. Roles of the insect cuticle in host defense reactions. Páginas 355-374. En: K. Sordehall, S. Iwanaga, y G.R. Vasta (editores). *New Directions in Invertebrate Immunology*. SOS publications. Massachusetts, EE.UU.
- Tsing, A. (1987). Reserches sur les hémocytes el l'immunité chez le crustacé *Penaeus japonicus* (Bate 1991). Thèse de Doctorat, Université des Sciences et Techniques du Languedoc, Montpellier, Francia.
- Van de Braak, C.B; T., Faber, R; Boon, J. H. (1996). Cellular and humoral Characteristics of *Penaeus monodon* (Fabricius, (1798) haemolymph. *Comparative hematology International*,6,194-203.
- Van de Braak, K., M.H.A. Botterblom, W. Liu, N. Taverne, W.P.W. Van der Knaap and J.H.W.M. Rombout. (2002) a. The role of the haematopoietic tissue in haemocyte production and maturation in the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Fish & Shellfish immunology* 12, 253-272.
- Van de Braak C.B.T., M.H.A. Botterblom, E.A. Huisman, Rombout, J.H.W. and W.P.W. Van der Knaap. (2002) b. Preliminary study on haemocyte response to white spot syndrome virus infection in black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Diseases of Aquatic Organisms* 51, 149-155.
- Van Hulten, M.C., J. Witteveldt, S. Perters, N. Kloosterboer, R. Tarchini, M. Fiers, H. Sandbrink, R.K. Lankhorst, y J.M. Vlak. 2001a. The white spot syndrome virus DNA genome Sequence. *Virology* 286:7-22.
- Vargas-Albores. Gloria Yepiz-Plascencia. 2000. Beta glucan binding protein and its role in shrimp immune response.

- Vásquez, L; &Colls. (1998). Mecanismos de Inmunidad en Crustáceos, Revista Interciencia vol. 23 # 6 pp. 344-348. Palabra clave Inmunidad en crustáceos.
- Venegas, C.A., L. Nonaka, K. Mushiake, T. Nishizawa, y K. Muroga. 1999. Pathogenicity of penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV) to kuruma prawn at different development stages. Fish Pathology 170:179-194.
- Vidal, O., C. Granja, and 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 Y.C., C. Lo, J. Leu, C. Chou, C. Yeh, H. Chou, M. Tung, C. Chag, M. Su, G. Kou. 1995. Purification and genomic analysis of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) of *Penaeus monodon*. Diseases of Aquatic Organisms 23:239-242.
- Wang C.Y., C.F. Lo, P.S. Chang, y G.H. Kou. 1998. Experimental infection of white spot baculovirus in some cultured and wild decapods in Taiwan. Aquaculture 164:221-231.
- Wang, Y.G., M.D. Hassan, M. Shariff, S.M. Zamri, y X. Chen. 1999. Histopathology and cytopathology of white spot syndrome virus (WSSV) in cultured *Penaeus monodon* from peninsular Malaysia with emphasis on pathogenesis and the mechanism of white spot formation. Diseases of Aquatic Organisms 39:1-11.
- Wongteerasupaya, C., J.E. Vickers, S. Sriurairatana, G.L. Nash, A. Akarajamorn, V. Boonsaeng, S. Paniym, A. Tassanakajon, B. Withyachumnarkul, y

T.W. Flegel. 1995. A non-occluded, systemic baculovirus that occurs in cells of ectodermal and mesodermal origin and causes high mortality in the black tiger prawn *Penaeus monodon*. *Diseases of Aquatic Organisms* 21:69-77.

Wongteerasupaya C, Wongwisansri S, Boonsaeng V, Panyim S, Pratanpipat P, Nash G, Whithyachumnarnkul B, Flegel TW (1996) DNA fragment of *penaeus monodon* baculovirus PmNOBII gives positive in situ hybridization with white-spot viral infections in six penaeid shrimp species. *Aquaculture* 143:23–32

Wu, J.L., A. Namikoshi, T. Nishizawa, K. Mushiake, K. Teruya, K. Muroga. 2001. *Diseases of Aquatic Organisms* 47:129-135.

Yoganandhan, K., R.B. Narayanan, y A.S Sahul Hameed. 2003. Larvae and early post-larvae of *Penaeus monodon* (Fabricius) experimentally infected with white spot syndrome virus (WSSV) show no significant mortality. *Journal of Fish Diseases* 26:385-391.

Zhang, X. C Huang, X. Xu, y C. L. Hew. 2001. Transcription and identification of an envelope protein gene (p22) from shrimp white spot syndrome virus. *Journal of General Virology*. www.socgenmicrobiol.org.uk/.../Figs/F4_pg.htm

12. ANEXO

ANEXO A

Tabla 4.- Análisis de *t - student* separación de tallas pequeños y grandes.

	Diferencias relacionadas					t	gl	Sig. (bilateral)
	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media	95% Intervalo de confianza para la diferencia				
				Inferior	Superior			
PEQUEÑOS - GRANDES	-2,49000	1,20498	0,22200	-2,93995	-2,04005	-11,318	29	3,70E-12

Tabla 7.- Prueba de Kolmogorov-Smirnov para supervivencia en cosecha.

Supervivencia.	Camarones silvestre Grandes/Pequeñas
N	14
Parámetros normales ^{a,b} Media	51,1498
Desviación típica	9,29143
Diferencias más Absoluta	0,192
extremas Positiva	0,192
Negativa	-0,118
Z de Kolmogorov-Smirnov	0,720
Sig. Asintót. (bilateral)	0,678

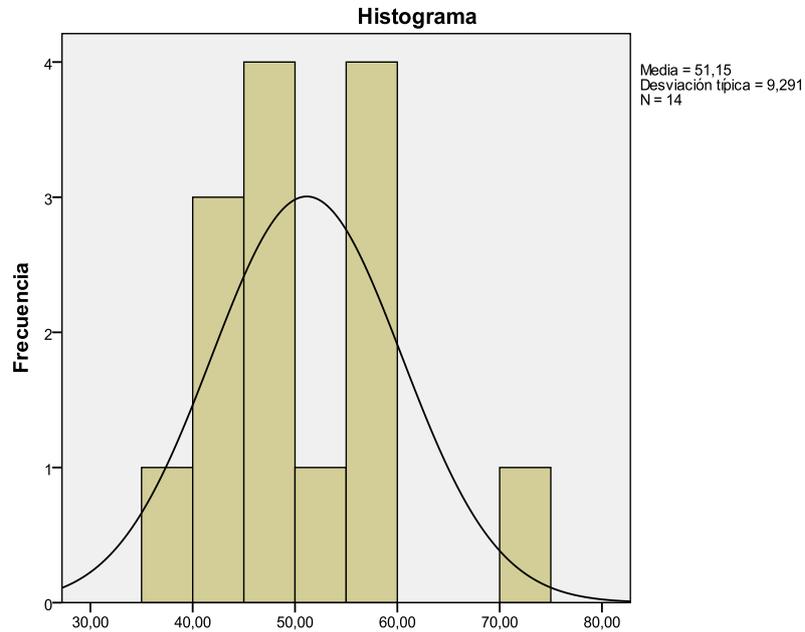


Fig 23.- Curva de normalidad de varianzas, de las medias poblacionales de las supervivencias de camarones silvestres grandes y pequeños.

Tabla 8.- Prueba de homogeneidad de varianzas de supervivencia en cosecha.

Camarones silvestre Grandes/Pequeñas			
Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
0,502	1	12	0,492

Tabla 9.- Análisis de Anova para supervivencia de camarones en cosecha.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	13,528	1	13,528	,146	0,709
Intra-grupos	1108,771	12	92,398		
Total	1122,298	13			

Tabla 10.- Prueba T para supervivencia en piscinas de camarones Grandes y Pequeños.

Prueba t para medias de dos muestras emparejadas		
	Variable 1	Variable 2
Media	50,1671	52,1329
Varianza	128,9829	55,8090
Observaciones	7,0000	7
Coefficiente de correlación de Pearson	-0,0862	
Diferencia hipotética de las medias	0,0000	
Grados de libertad	6,0000	
Estadístico t	-0,3683	
P(T<=t) una cola	0,3627	
Valor crítico de t (una cola)	1,9432	
P(T<=t) dos colas	0,709	
Valor crítico de t (dos colas)	2,4469	

Tabla 11.- Prueba de Kolmogorov-Smirnov para pesos en cosecha.

Pesos.	Camarones silvestre Grandes/Pequeñas
N	14
Parámetros normales ^{a,b}	
Media	9,9637
Desviación típica	1,02846
Diferencias más extremas	
Absoluta	0,159
Positiva	0,159
Negativa	-0,143
Z de Kolmogorov-Smirnov	0,594
Sig. asintót. (bilateral)	0,872

a. La distribución de contraste es la Normal.

b. Se han calculado a partir de los datos.

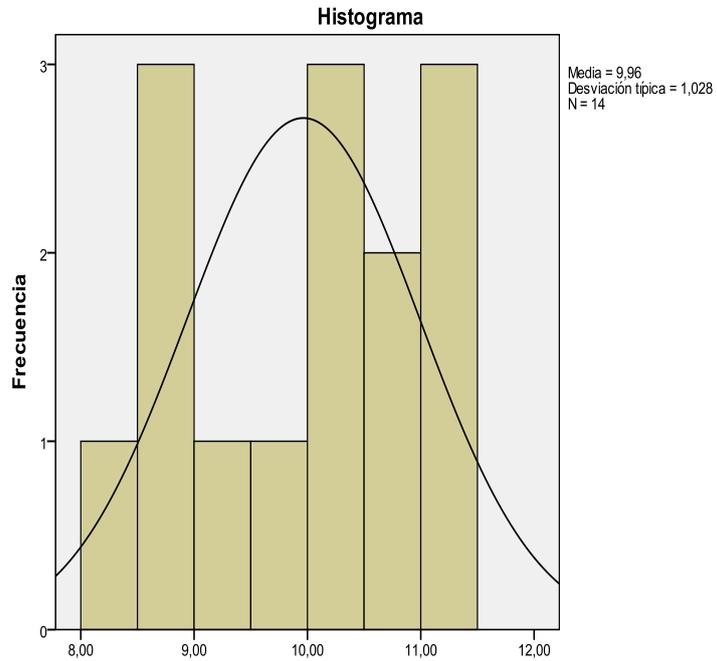


Fig 24.- Curva de normalidad de varianzas, de las medias poblacionales de los pesos de camarones silvestres grandes y pequeños.

Tabla 12.- Prueba de homogeneidad de varianzas para pesos.

Camarones silvestre Grandes/Pequeñas			
Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
4,079	1	12	0,066

Tabla 13.- Resultados de significación para pesos ANOVA.

Camarones silvestre Grandes/Pequeñas

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	3,559	1	3,559	4,191	0,063
Intra-grupos	10,191	12	,849		
Total	13,750	13			

Tabla 14.- Prueba T para pesos en piscinas de camarones Grandes y Pequeños.

Prueba t para medias de dos muestras emparejadas		
	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
Media	10,4686	9,46
Varianza	0,4679	1,2296
Observaciones	7,0000	7
Coefficiente de correlación de Pearson	-0,8185	
Diferencia hipotética de las medias	0,0000	
Grados de libertad	6,0000	
Estadístico t	1,5564	
P(T<=t) una cola	0,0853	
Valor crítico de t (una cola)	1,9432	
P(T<=t) dos colas	0,063	
Valor crítico de t (dos colas)	2,4469	

Tabla 15.- Datos de correlación para pesos y supervivencias de camarones silvestres pequeños.

Pequeños		Pesos	Supervivencia
Pesos	Correlación de Pearson	1	-0,659
	Sig. (bilateral)		0,107
	N	7	7
Supervivencia	Correlación de Pearson	-,659	1
	Sig. (bilateral)	,107	
	N	7	7

Tabla 16.- Datos de correlación para pesos y supervivencias de camarones silvestres grandes.

Grandes		Pesos	Supervivencia
Pesos	Correlación de Pearson	1	-0,338
	Sig. (bilateral)		0,458
	N	7	7
Supervivencia	Correlación de Pearson	-,338	1
	Sig. (bilateral)	,458	
	N	7	7

Tabla 17.- Valores atípicos encontrados en piscinas de animales pequeños y grandes.

Pequeño A9	Peso	11,3	1,66>1,5
Grande A13	Supervivencia	72,02	1,93 >1,5

Tabla 18.- Prueba de Kolmogorov-Smirnov para supervivencia a WSSV.

Supervivencia a WSSV.		Supervivencia a WSSV
N		15
Parámetros normales ^{a,b}	Media	46,0000
	Desviación típica	8,28079
Diferencias más extremas	Absoluta	0,232
	Positiva	0,232
	Negativa	-0,219
Z de Kolmogorov-Smirnov		0,900
Sig. asintót. (bilateral)		0,393

a. La distribución de contraste es la Normal.

b. Se han calculado a partir de los datos.

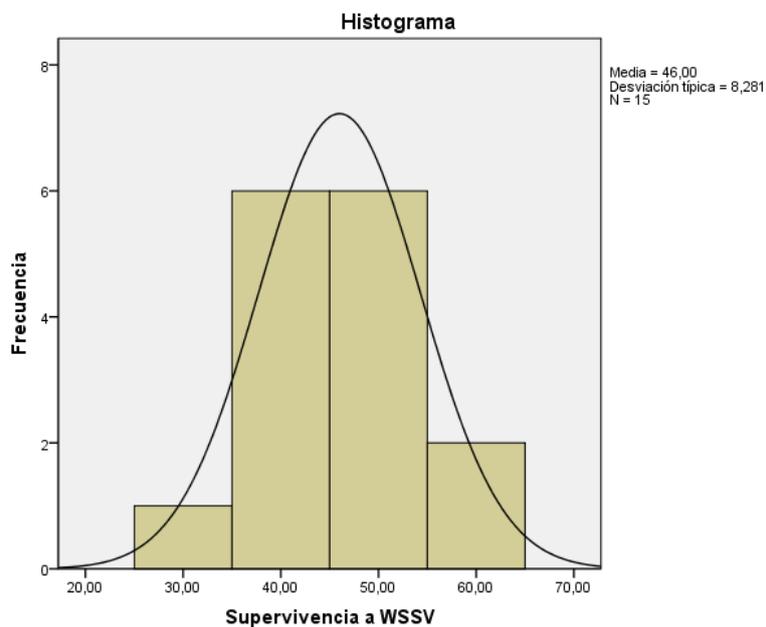


Fig 30.- Curva de normalidad, supervivencia a WSSV.

Tabla 19.- Prueba de homogeneidad de varianzas para supervivencia a WSSV.

Supervivencia a WSSV			
Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
0,099	2	12	0,907

Tabla 20.- Resultados de significación para supervivencia a WSSV ANOVA.

ANOVA

Supervivencia a WSSV

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	520,000	2	260,000	7,091	0,009
Intra-grupos	440,000	12	36,667		
Total	960,000	14			

Tabla 21.- Pruebas post hoc para supervivencia a WSSV.

Comparaciones múltiples

Supervivencia a WSSV

HSD de Tukey

(I) Grandes, Pequeños Domesticados	(J) Grandes, Pequeños Domesticados	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
Grandes	Pequeños	-4,00000	3,82971	,564	-14,2171	6,2171
	Domesticados	-14,00000*	3,82971	,009	-24,2171	-3,7829
Pequeños	Grandes	4,00000	3,82971	,564	-6,2171	14,2171
	Domesticados	-10,00000	3,82971	,055	-20,2171	,2171

Tabla 24.- Lecturas de placas microelisa para la detección y cuantificación de IGFBP.

	Pequeños					Grandes					Domesticados						
	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac		
ANTES	9	17	22	25	30	6	8	16	21	26	1	10	14	20	27	BLANCO	CONTROL
	195	225	212	119	175	307	144	218	176	190	164	148	217	112	115	98	219
	157	146	121	146	228	161	151	188	160	237	180	160	173	133	146	100	186
	133	155	140	127	123	132	132	198	170	130	188	172	168	168	188	145	439
DESPUES	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac		
	9	17	22	25	30	6	8	16	21	26	1	10	14	Ac20	27		
	188	258	322	216	209	163	194	166	165	269	196	198	150	174	145		
	186	162	216	176	281	138	170	120	220	198	191	161	151	172	235		
	262	224	226	157	198	182	194	140	241	250	280	223	197	187	151		

Tabla 25.- Lecturas de placas microelisa para la detección y cuantificación de IGF.

	Pequeños					Grandes					Domesticados						
	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac		
ANTES	9	17	22	25	30	6	8	16	21	26	1	10	14	20	27	BLANCO	CONTROL
	220	242	321	270	171	215	217	239	204	235	266	204	241	173	165	121	201
	995	400	200	430	221	176	190	336	289	264	269	266	201	213	203	138	186
	382	231	289	225	207	186	235	180	195	337	173	192	219	248	172	132	214
DESPUES	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac		
	9	17	22	25	30	6	8	16	21	26	1	10	14	Ac20	27		
	314	204	188	265	406	231	336	203	255	241	199	204	199	193	214		
	241	263	188	273	275	306	193	280	226	206	212	267	221	215	189		
	219	176	251	233	192	300	192	361	276	261	283	211	215	222	361		

Tabla 26.- Promedios de hemocitos no infectados e infectados.

	Pequeños	Grandes	Domesticados
No Infectados	1,94E+07	2,12E+07	2,68E+07
Infectados	1,57E+06	1,78E+06	2,60E+06

Tabla 27.- Desviaciones estandar de no infectados e infectados.

	Pequeños	Grandes	Domesticados
No Infectados	2,29E+06	6,81E+06	3,62E+06
Infectados	4,12E+05	6,56E+05	5,10E+05

ANEXO B

Monitoreos en el sector “a” CENAIM-PALMAR.



Estación experimental CENAIM-PALMAR.



Sector “A” CENAIM-PALMAR.



Toma de muestra de camarones.



Obtención de camarones para pesos.



Pesos individuales de camarones.



Toma de datos de pesos de camarones.

ANEXO C

Obtención de muestras en la estación CENAIM-PALMAR.



Toma de muestras para Inmunoensayos.



Fijación de camarón con Davidson.



Extracción de hemolinfa.



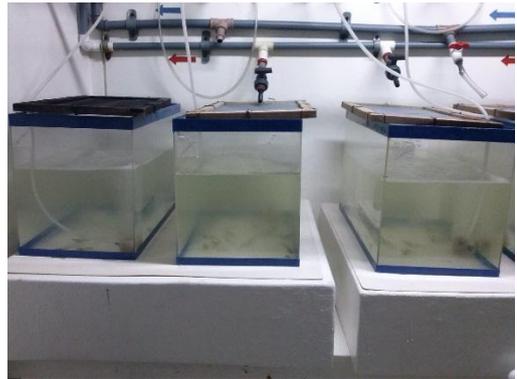
Obtención de hemolinfa para ELISA.

ANEXO D

Infección de camarones en el set # 1 CENAIM.



Preparación de acuarios para infección.



Camarones en sus respectivos acuarios.



Preparación de la papilla infectada.

ANEXO E

Aplicación de inmunoensayos.



Camarones en bloques de parafina.



Cortes para histología.



Placas con tejido animal.



Proceso de desparafinado de placas.



Hemocitos extraídos y fijados.



Discos colocados en placas microelisa.



Placa microelisa para lecturas.



Lector de microplaca.