



Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología
Universidad Nacional
Autónoma de México



**CARACTERIZACIÓN DEL ESTADO FISIOLÓGICO-INMUNOLÓGICO
DE LOS JUVENILES DE LA LANGOSTA ESPINOSA *Panulirus*
argus INFECTADOS NATURALMENTE CON EL VIRUS PaV1**

T E S I S

Que para obtener el grado de académico de Maestro en Ciencias
(Biología Marina)
presenta:

NANCY HERRERA SALVATIERRA

Director de Tesis

Dra. Cristina Pascual Jiménez

Comité Tutorial:

Dr. Enrique Lozano Álvarez
Dra. Rossanna Rodríguez Canul
Dr. Carlos Rosas Vázquez
Dr. Edgar Zenteno Galindo



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIA

A mi familia

A mis padres Roberto y Lucia por su apoyo incondicional, por siempre alentarme a seguir adelante, por sus consejos, por siempre estar junto a mí a pesar de la distancia.

A mis hermanos Isra y JR por su cariño.

A mi corazón, Israel por tu amor, paciencia y apoyo.

El presente trabajo fue desarrollado en las instalaciones de la Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación en Sisal, Yucatán; y en la Unidad Académica de Puerto Morelos de la Facultad de Ciencias de la UNAM en el marco del proyecto CONACYT 131815 y con la beca CONACYT 235700.

Se agradece el apoyo técnico de la M.C. Cecilia Barradas Ortiz y al M.C. Fernando Negrete Soto por su colaboración en el trabajo en campo para la obtención de las langostas empeladas en esta tesis. Así como al Quim. Juan Antonio Pérez Vega por su colaboración en la disección de las langostas. A la M.C. Ariadna Berenice Sánchez Arteaga y Ing. Pesq. Vianey Eunise Sosa Koh por su capacitación y apoyo en las técnicas utilizadas en este trabajo.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Cristina Pascual Jiménez por la dirección académica y apoyo en esta etapa de mi formación.

A la Dra. Rossanna Rodríguez Canul y al Dr. Enrique Lozano Álvarez por su apoyo académico para la realización de este trabajo.

Al H. Sínodo por sus consejos y observaciones.

Al la M.C. Cecilia Barradas Ortiz, al M.C. Fernando Negrete Soto, a la M.C. Ariadna Berenice Sánchez Arteaga y Ing. Pesq. Vianey Eunise Sosa Koh por su apoyo técnico, tiempo y enseñanzas.

A mis amigos de la UMDI-Sisal y por los buenos momentos.

RESUMEN

El virus PaV1 (*Panulirus argus* virus 1) es el primer virus reportado para la langosta espinosa, *Panulirus argus*. Se detectó inicialmente en Florida, EUA y posteriormente en el Caribe Mexicano. Existen reportes de Cuba, las Bahamas y Belice. Importantes aspectos de la infección han sido descritos a través de infecciones experimentales, relacionados a su prevalencia, daños histopatológicos y vías de transmisión, sin embargo, poco se conoce sobre las adaptaciones inmunológicas y fisiológicas asociadas a dicha enfermedad en condiciones naturales, en cuanto al contagio y desarrollo de la enfermedad. En el presente trabajo se determinó el efecto del proceso natural de la infección por PaV1, por medio de algunos componentes inmunológicos, las enzimas digestivas e indicadores nutricionales de la hemolinfa y del hepatopáncreas en juveniles de *Panulirus argus*.

Panulirus argus representa una metapoblación dentro de la macroregión del Caribe. Con el ánimo de comparar el desarrollo de la infección por PaV1 en localidades con diferente manejo del recurso se obtuvieron langostas en dos de localidades de Quintana Roo, México; del parque nacional arrecife de Puerto Morelos, donde la pesca de langosta es muy baja y en Bahía de la Ascensión, uno de los puntos más importantes en la pesca de este recurso y la cual forma parte de la reserva de la Biósfera "Sian Ka'an". Se capturaron juveniles de *P. argus* con y sin síntomas visuales de la infección (74 en Puerto Morelos y 44 en Bahía de la Ascensión). Se verificó la infección por medio de una prueba de PCR que amplificó una región de 459 pb y de un análisis histopatológico, dichos resultados fueron usados para clasificar a las langostas en 4 grupos: sanas, ligeramente infectadas, moderadamente infectadas y fuertemente infectadas. El análisis de la hemolinfa realizado sólo a organismos de Puerto Morelos mostró que las langostas fuertemente infectadas presentan una disminución significativa ($p < 0.05$) en la concentración de hemocitos circulatorios respecto de las sanas, también significativa para los subtipos celulares semigranulares e hilainas, mientras que en las células granulares se observó un aumento no significativo en langostas moderadamente y fuertemente infectadas, permitiendo en este estudio la oportunidad para observar una respuesta compensatoria en los organismos. El estallido respiratorio se vió afectado en el último grado de la infección, mientras que la actividad hemaglutinante es acrecentada con entrada del virus (ligeramente infectadas) decayendo significativamente con el avance de la infección (fuertemente infectados). A pesar de la disminución de los hemocitos, la respuesta del sistema fenoloxidasa aumentó significativamente en langostas fuertemente infectadas en la porción celular de la hemolinfa, mientras es mantenida a lo largo de la infección en la porción plasmática, señalando un esfuerzo inmunológico ante la infección con PaV1.

Al comparar dos localidades se encontró que las langostas sanas de Bahía de la Ascensión, tuvieron una mejor condición nutricional que las de Puerto Morelos, al contener mayores reservas energéticas de glucógeno y lípidos totales, así como colesterol y acilgliceridos en el hepatopáncreas. La infección por PaV1 en juveniles de langosta *P. argus* genera un daño progresivo del hepatopáncreas, a pesar de que se observa el mismo patrón en respuesta a la infección en cada localidad, los cambios son de mayor o menor magnitud asociados a su condición nutricional inicial, esto se ve reflejado en el trastorno paulatino de la actividad enzimática y la baja concentración de metabolitos en el hepatopáncreas.

Las langostas enfermas presentaron una alteración significativa en la actividad enzimática evidente; la actividad de glucosidasa, amilasa, tripsina y quimotripsina en el hepatopáncreas declinó progresivamente conforme avanzó la infección. Así mismo, la disminución gradual de las concentraciones de glucosa, colesterol, acilgliceridos, glucógeno y lípidos en el hepatopáncreas son un efecto del progreso de la enfermedad y el daño tisular que se geeró. Paralelamente se observa un incremento de la glucosa, colesterol y acilgliceridos en el plasma de la hemolinfa de los juveniles de langosta infectados con PaV1 evidenciando el daño tisular progresivo del hepatopáncreas mencionado anteriormente.

En este trabajo se demostró que los juveniles de langosta *P. argus* infectados naturalmente con el virus PaV1, activan de manera importante su respuesta inmunológica ante este virus en la etapa inicial de la infección, lo que podría explicar la resistencia observada de algunos organismos, pero una vez que la enfermedad se desarrolla el daño tisular en el hepatopáncreas es irreversible, causando una pobre condición nutricional asociada a una perdida en su capacidad digestiva y la disminución de sus reservas tanto en el hepatopáncreas como en el músculo.

ABSTRACT

PaV1 virus (*Panulirus argus* virus 1) is the first virus reported for the spiny lobster, *Panulirus argus*. Was initially detected in Florida, USA and later in the Mexican Caribbean. There are reports of Cuba, the Bahamas and Belize. Some aspects of the infection have been described through experimental infections, related to its prevalence, histopathological damage and transmission, however, little is known about the immunological and physiological adaptations associated with the disease under natural conditions, as the contagion and development of the disease. In this study we determined the effect of the natural process of infection PaV1 through some immunological components, digestive enzymes and nutritional indicators of hemolymph and hepatopancreas in juvenile *Panulirus argus*.

Panulirus argus is a metapopulation within the macro region in the Caribbean. With the aim of comparing the development of infection in areas with different PaV1 resource management lobsters were obtained in two villages of Quintana Roo, Mexico; the National Park of Puerto Morelos reef, where the lobster fishery is very low and Ascension Bay, one of the most important fishing of this resource which is part of the Biosphere Reserve "Sian Ka'an"; were captured juvenile *P. argus* with and without symptoms of infection (74 in Puerto Morelos and 44 in Ascension Bay). Infection was verified by a PCR test amplified a 459 pb region and histopathological analysis, these results were used to classify the lobsters into 4 groups: healthy, lightly infected, moderately infected and heavily infected. The analysis of the hemolymph made only to organisms of Puerto Morelos showed that heavily infected lobsters have a significant decrease ($p < 0.05$) in total count of haemocytes, also significant for semigranulares and hilainas cell subtypes, while in granule cells is observed an no significant increase in moderately and heavily infected lobsters, allowing in this study the opportunity to observe a compensatory response in organisms. The respiratory burst is affected in the last stage of the infection, while the hemagglutination activity is enhanced with virus entry (lightly infected) declining significantly with advancing infection (heavily infected). Despite the decrease in hemocytes, phenoloxidase system response increases significantly in heavily infected lobsters in the cell portion of the hemolymph, while it is maintained throughout the infection in the plasma portion, in an immune effort to infection with PaV1.

Comparing the two locations we found that healthy lobsters in Bahia de la Ascension, have better nutritional status than those in Puerto Morelos, containing the largest energy reserves of glycogen and total lipids, as well as cholesterol and acylglycerides in the hepatopancreas. PaV1 infection in juvenile lobster *P. argus* produces a progressive damage in the hepatopancreas, although the same pattern is observed in response to infection in each locality, the changes are of greater or

lesser associated with their initial nutritional status, this is reflected in the gradual decrease of the enzyme activity and the low concentration of metabolites in the hepatopancreas.

Diseased lobsters showed an evident alteration of enzyme activity, glucosidase, amylase, trypsin and chymotrypsin activity in the hepatopancreas gradually declines with advancing infection. Likewise, the gradual decrease in the concentrations of glucose, cholesterol, acylglycerides, glycogen and lipids in the hepatopancreas are an effect of disease progression and tissue damage generated, and in turn the increase of glucose, cholesterol and acylglycerides in hemolymph plasma of infected lobster juveniles PaV1 are evidence of progressive tissue damage hepatopancreas above.

This study showed that juvenile lobster *P. argus* naturally infected with the virus PaV1, activated their immune response to the virus at the stage of infection, which could explain the observed resistance of some organisms, but once the disease develops the hepatopancreas tissue damage is irreversible, resulting in a poor nutritional status associated with a loss in their digestive capacity and declining reserves in both the hepatopancreas and muscle.

PREFACIO

Algunos resultados de la tesis han sido presentados en los siguientes congresos (Resúmenes y/o poster en ANEXO 2).

a) Nacionales:

- ▶ Participación en la 1ª Reunión Nacional sobre conservación Zoológica: Humedales, Aguas continentales y Marinas de México. Del 16 al 18 de junio de 2010. Villahermosa, Tabasco, México.
Conferencia: Efecto de la infección natural con PaV1 sobre la concentración de Hemocitos de juveniles de langosta, *Panulirus argus*, en dos poblaciones del Caribe mexicano.
- ▶ IV Foro Estatal y I Foro Regional de Investigación tecnológica y Académica. Dirección General de Educación Tecnológica Agropecuaria. Marzo del 2011. Xmatkuil, Yucatán.
Conferencia: Efecto de la infección viral (PaV1) sobre los metabolitos de la langosta espinosa del Caribe, *Panulirus argus*.

b) Internacionales:

- ▶ XIII Congreso Latinoamericano de Ciencias del Mar y VIII Congreso de Ciencias del Mar, MarCuba del 26 al 30 de octubre del 2009. La Habana, Cuba.
Poster: "Efecto de la infección viral natural (PaV1) en la actividad enzimática de la langosta espinosa *Panulirus argus*."
- ▶ Participación en el X Simposio Internacional de Nutrición Acuícola del 8 al 10 de noviembre de 2010. San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México.
Poster: Biochemical Characterization of the digestive gland of the spiny lobster, *Panulirus argus*, infected by PaV1.
- ▶ 9th International Conference and Workshop on Lobster Biology and Management. Del 19 al 24 de Junio de 2011. Bergen, Noruega.
Conferencia: Physiological characterization of juveniles of spiny lobster, *Panulirus argus*, infected naturally by virus (PaV1).

INDICE

INTRODUCCIÓN	1
Distribución Geográfica de <i>P. argus</i>	2
Ciclo de vida	3
Enfermedades en langostas	4
PaV1	6
Sistema inmunológico	10
Condición nutricional y capacidad digestiva	12
HIPOTESIS	15
OBJETIVOS.....	15
Objetivo general.....	15
Objetivos específicos.....	16
MATERIALES Y METODOS.....	17
Área de estudio	17
Captura de organismos	17
Manejo de los organismos	18
Diseño de muestreos	18
Obtención de hemolinfa.....	18
Condición inmunológica.....	19
Conteo y caracterización de hemocitos	19
Hemaglutinación	20
Actividad de fenoloxidasa.....	20
Estallido respiratorio	20
Estandarización de métodos para capacidad digestiva	21
Estabilidad de la muestra de glándula digestiva liofilizada y no liofilizada mantenida en ultracongelación (-40 °C) a lo largo de un año para análisis de actividad enzimática y de metabolitos.	21
Estandarización de las técnicas de actividad enzimática de la glándula digestiva (pH, temperatura, concentración de la enzima y concentración de sustrato).	21

Condición nutricional.....	22
Capacidad digestiva	23
Análisis histológico y PCR	24
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	25
RESULTADOS.....	28
1. Análisis de la condición inmunológica de los juveniles <i>Panulirus argus</i> infectados naturalmente con PaV1.	28
2. Estado nutricional	34
A. Condición Nutricional	34
B. Capacidad Digestiva.....	35
3. Análisis de la condición fisiológica de los juveniles <i>Panulirus argus</i> infectados naturalmente con PaV1, en dos poblaciones.	36
DISCUSIÓN	44
CONCLUSIONES	56
LITERATURA CITADA	57
ANEXO 1	69
ANEXO 2	73

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1 Distribución geográfica de <i>Panulirus argus</i> en el continente americano	2
Fig. 2 Ciclo de vida de la langosta espinosa <i>Panulirus argus</i>	4
Fig. 3 Diagrama de la costa de Quintana Roo, mostrando las dos zonas de muestreo.	17
Fig. 4 Concentración Total de hemocitos (cel/mm ³) en hemolinfa de juveniles de langosta.....	28
Fig. 5 Concentración de hemocitos (cel/mm ³) en hemolinfa de juveniles de langosta a) Células Hialinas y Células Semigranulares, b) Células Granulares.	29
Fig. 6 Actividad hemaglutinante de juveniles de langosta.....	30
Fig. 7 Actividad de la fenoloxidasa de juveniles de langosta a) fenoloxidasa total en la fracción plasmática, b) fenoloxidasa total, fenoloxidasa y profenoloxidasa en degranulado.	31
Fig. 8 Producción intracelular del anión superóxido de los hemocitos usando la reducción de NBT.....	33
Fig. 9 Concentraciones de metabolitos en mg/ml en plasma de juveniles de langosta. Según su grado de infección. a) Proteínas totales, b) Glucosa, c) Colesterol, d) Colesterol.....	34
Fig. 10 Patrón de variabilidad obtenidas por EOF. Enzimas y metabolitos medidos en glándula digestiva de juveniles de langostas sanas en dos localidades a) Puerto Morelos y b) Bahía de la Ascensión.....	36
Fig. 11 Patrón de variabilidad obtenidas por EOF. Enzimas y metabolitos medidos en glándula digestiva de juveniles de langostas en dos poblaciones	39
Fig. 12 Actividad específica de a) Quimotripsina y b) Glucosidasa en hepatopáncreas de juveniles de langosta en dos poblaciones.....	40
Fig. 13 Concentración de a) Glucógeno y b) Lípidos totales (mg/gr) en hepatopáncreas de juveniles de langosta <i>Panulirus argus</i> de langostas sanas, infectadas y enfermas, en dos poblaciones.	42
Fig. 14 Concentración de a) Glucógeno y b) Lípidos totales (mg/gr) en músculo..	43
Fig. 15 Esquema de todas las variables medidas inmunológicas y nutricionales en diferentes tejidos ante la infección con PaV1 en juveniles de langosta <i>P. argus</i>	54

LISTA DE TABLAS

Tabla 1 Escala de grados de severidad para la infección con <i>Panulirus argus</i> Virus 1 (PaV1) en la langosta espinosa <i>Panulirus argus</i> (Modificada de Li <i>et al.</i> , 2008) y n total capturada.....	24
Tabla 2 Temperatura y pH óptimo para cada una de las enzimas.....	35

INTRODUCCIÓN

Las langostas espinosas (Crustacea: Decapoda: Palinuridae) se distribuyen extensamente en todos los mares tropicales y templados. Hasta ahora se han reconocido 50 especies de palinúridos, de las cuales, 33 tienen importancia pesquera. En los últimos 15 años más del 50% de la captura mundial de langostas espinosas estuvo constituida por la langosta del Caribe, *Panulirus argus*, por tanto esta especie es la de mayor importancia comercial en toda la macroregión del Caribe. Sin embargo, existen pocos estudios sobre el estado de salud y la presencia de enfermedades, debido probablemente a los pocos problemas de salud que presentan. De las pocas enfermedades que afecta a *P. argus* están las infecciones ocasionadas por bacterias, hongos, helmintos, cestodos, nemertinos, etc. (Stewart, 1975; *Wonget al.*, 1998; Diggles, 2001; *Porter*, 2001; Phillips y Melville-Smith 2006, Huchin-Mian 2007; Candia-Zulbarán 2011). En 1999, se descubrió el primer virus que afecta a *Panulirus argus* en los Cayos de la Florida (EUA). Este virus denominado *Panulirus argus virus 1* (PaV1) infecta principalmente a organismos juveniles y los principales signos clínicos de la infección viral son: letargia, morbilidad, cese de la muda, falta de coagulación y una marcada coloración lechosa de la hemolinfa, siendo sus efectos letales para juveniles (Shields y Behringer, 2004).

En México, la langosta *Panulirus argus* constituye un recurso pesquero de gran importancia económica y posee un amplio potencial para la región costera de la Península de Yucatán. Yucatán y Quintana Roo contribuyen con el 33% de la producción nacional de langosta, con alrededor de 1,100 toneladas (peso vivo) (*Salas et al.*, 2005). Por tanto la presencia de enfermedades como la causada por PaV1 podría representar una amenaza tanto para la población de langostas espinosas como para su aprovechamiento. El efecto letal y el potencial infeccioso del virus en las langostas añaden mayor importancia al estudio de esta infección viral por las implicaciones biológicas, ecológicas y económicas que podría tener en las zonas del Mar Caribe en donde se distribuye este importante recurso pesquero (Shields y Behringer, 2004; Huchin-Mian 2007). La caracterización del estado fisiológico y de la condición inmunológica, resulta importante para lograr un mejor entendimiento sobre el potencial efecto negativo que tiene esta infección viral en las langostas *P. argus*.

Distribución Geográfica de *P. argus*

La langosta espinosa del Caribe *Panulirus argus* tiene una distribución tropical y subtropical en el Atlántico Oeste, desde las costas de Carolina del Norte en Estados Unidos hasta Brasil, incluyendo países de la región del Caribe (Fig. 1) En México, se encuentran desde zonas sublitorales hasta 60 m aproximadamente. Los juveniles y adultos de *P. argus* se encuentran a todo lo largo de la costa de Quintana Roo, la cual se caracteriza por sus formaciones arrecifales, que son parte de la segunda barrera coralina más grande del mundo. Los adultos son particularmente abundantes en la plataforma continental alrededor de las Islas Mujeres y Contoy, así como en el de banco Chinchorro (Briones *et al.*, 1997; Lozano y Negrete, 1991; SEMARNAP, 2000).

En la zona oriental del estado de Yucatán, se ha reportado que las langostas adultas se encuentran en áreas al norte de los puertos de San Felipe, Río Lagartos y el Cuyo, en donde existen formaciones rocosas de altura significativa (3-6 m). En tanto que en la zona poniente se han reportado en manchones arrecifales dispersos como el Arrecife Madagascar y otros similares. El Arrecife Alacranes es el hábitat más importante de langostas en el estado de Yucatán (Bello *et al.*, 2005; Briones *et al.*, 1997).

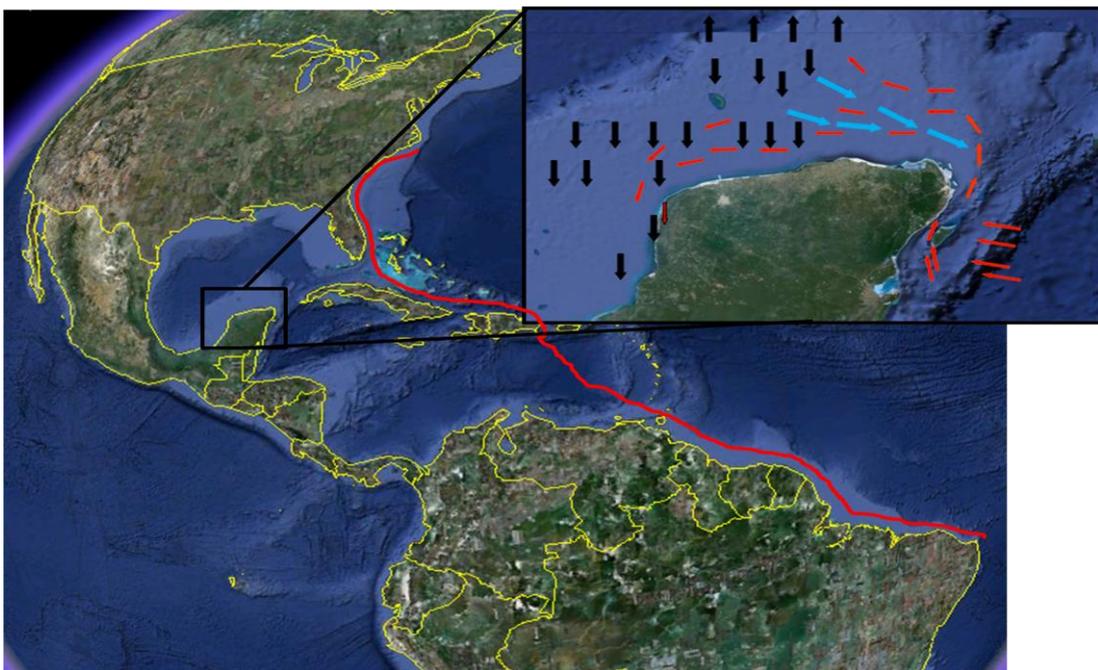


Fig. 1 Distribución geográfica de *Panulirus argus* en el continente americano. En el recuadro superior derecho se muestra la distribución teórica de la especie por estadios, en flechas azules la migración de reproductores; en flechas rojas el arribo de larvas provenientes de otras poblaciones y en negro las larvas de poblaciones locales (Esquema tomado de Ríos-Lara *et al.* 2011).

Ciclo de vida

P. argus, como todos los palinúridos, tienen un ciclo de vida largo y complejo que involucra 5 estadios: huevo, larva (filosoma), postlarva (puerulo), juvenil y adulto (Lozano-Álvarez *et al.*, 2003). Los machos y hembras se aparean en hábitats arrecifales, las hembras incuban los huevos en zonas más profundas durante tres semanas (Fig. 2). Una vez completo el desarrollo embrionario, los huevos eclosionan liberando las larvas. La etapa larval es oceánica y muy larga, pasan por once estadios de desarrollo que duran de 5 a 9 meses, tiempo en el cual son ampliamente distribuidas por las corrientes marinas (Briones *et al.*, 1997). En el undécimo estadio de filosoma, este sufre una metamorfosis hacia la postlarva denominada puerulo. El puerulo retorna a la zona costera, se asienta en hábitats de vegetación sumergida como pastos marinos, macroalgas y manglares, lugar en donde continua su desarrollo y crecimiento adoptando hábitos bentónicos (Briones-Fourzán y Lozano-Álvarez, 2001). La etapa juvenil está representada por tres fases ecológicas: juvenil temprano (5-14 mm, longitud de cefalotórax, LC), asociados a la vegetación sumergida de las zonas someras; juvenil tardío (15-44 mm CL), que se encuentran en aguas someras, ocupando principalmente pequeñas cavidades en rocas y comienzan a presentar comportamiento gregario con otras langostas, aparentemente debido a un aumento en el riesgo de ser depredados. Y la fase de subadulto (45-79 mm LC) con hábitos gregarios, ocupan una amplia zona de alimentación y se resguardan en hendiduras formadas en los arrecifes (Briones-Fourzán *et al.*, 2003).

Los adultos (>80 mm LC), no requieren cohabitar con otros individuos, aunque este comportamiento no desaparece del todo. Estos organismos ocupan en el día las hendiduras de corales o fondos rocosos y por la noche pueden tener amplias excursiones alimenticias en el arrecife con la posibilidad de tener varios refugios en el complejo ambiente arrecifal (Briones-Fourzán *et al.*, 2003).



Fig. 2 Ciclo de vida de la langosta espinosa *Panulirus argus*. (Tomada de Castañenda-Xiu 2009, Modificado de Cruz *et al.*, 1987).

Enfermedades en langostas

Las langostas presentan pocas enfermedades o pocas han sido descritas, siendo el género *Homarus* el más estudiado por su importancia económica. Los intentos de crecimiento de langostas juveniles en sistemas de cultivo pueden ser el factor que propicie la presencia de muchas enfermedades, la mala calidad del agua puede generar el crecimiento de parásitos externos, infección en apéndices lastimados, enfermedades por hongos, bacterias (enfermedad del caparazón) y por *Vibrio spp*; así como infección por nematodos e infestación de parásitos ciliados en las branquias (Diggles 2001, Huchin-Mian 2007, Shields 2011).

La "gaffkemia o enfermedad de la cola roja" es la más conocida en langostas homáridas, se trata de una infección en la hemolinfa causado por *Aerococcus viridans* una bacteria Gram positiva, la cual ha sido encontrada tanto en poblaciones de *Homarus americanus* como de *H. gammarus*, y probablemente es la enfermedad infecciosa más importante para este género (Lavallée *et al.*, 2001). La infección es transmitida a través de lesiones. La prevalencia de la enfermedad en poblaciones naturales es variable, pero generalmente es baja. Las langostas enfermas presentan una coloración rojiza del exoesqueleto, hemolinfa rosada, la coagulación se ve

afectada, una disminución en la concentración de hemocitos y septicemia. En general los otros tejidos permanecen normales o poco afectados (Stewart, 1975). De acuerdo con Shields (2011), las langostas espinosas muestran un alto grado de resistencia a las infecciones experimentales con esta bacteria, mostrando la relación específica de *Aerococcus viridans* con hospederos del género *Homarus*.

La enfermedad del caparazón o síndrome es una necrosis quitinolítica progresiva del exosqueleto de los crustáceos acuáticos es causada por bacterias quitinolíticas Gram-negativas, dentro de las más comunes tenemos *Vibrio vulnificus*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*. Esta enfermedad requiere de un portal de entrada a través de la cutícula, ha sido encontrada principalmente en *H. americanus* y *H. gammarus*. Sin embargo, este padecimiento también afecta a la langosta espinosa *Panulirus argus*, *P. cygnus* y *Jasus edwardsii* pero en otra forma de necrosis en la cola "tail fan necrosis" porque los urópodos y telson son los que aparecen melanizados y erosionados. Esta enfermedad en poblaciones silvestres sanas posee una prevalencia baja <1% (Porter *et al.*, 2001; Shields, 2011).

En el caso de los hongos, pocos oomycetes se conocen que infectan a la langosta espinosa, pero generalmente se dan infecciones en huevos, larvas y juveniles de langosta en sistemas de cultivo, muy poco frecuente en organismos adultos de vida silvestre. Quizá la gruesa y resistente capa de quitina de su exoesqueleto los protege de la infección. Existen reportes de grandes mortalidades de filosomas de *P. japonicus* asociada a *Atkinsiella panulirata* o de *Halophthotos sp.* afectando a la langosta australiana *J. edwardsii* (Diggles, 2001; Shields, 2011).

Se han reportado en poblaciones naturales de langosta espinosa infecciones de helmintos como los turbelarios, protozoos, trematodos a los que las langostas sirven como hospederos intermedios y son fácilmente observables en el tejido muscular, cestodos generalmente enquistados en tejido conectivo, nemertinos, especies depredadoras de huevos que pueden presentarse en epidemias y generan daños importantes en la población, además también están los crustáceos como copépodos y anfípodos (Shields, 2011)

En cuanto al reporte de infecciones virales en langosta, se ha demostrado en infecciones experimentales que varias especies de langostas pueden ser portadores

asintomáticos del virus WSSV (White Spot Syndrome Virus). Cuatro especies de langostas colectadas en las costas de Taiwán, *Panulirus ornatus*, *P. versicolor*, *P. longipes* y *P. penicillatus*, fueron infectadas vía oral con el virus WSSV, el virus fue detectado pero ninguna de las langostas desarrolló la enfermedad (Wang *et al.*, 1998, Shields 2011).

PaV1

El primer virus patogénico que afecta a la langosta espinosa *P. argus*, es denominado PaV1 (*Panulirus argus* virus 1). Este agente viral de ADN de doble cadena permanece sin clasificación, pero comparte características con los de las familias *Iridioviridae* y *Herpesviridae*. En análisis realizados con microscopía electrónica de transmisión en tejidos provenientes de langostas enfermas se encontró la presencia de virones icosaedros (182 ± 9 nm) distribuidos en el citoplasma y la periferia nuclear de la célula; también se encontraron inclusiones virales eosinofílicas en células epiteliales, así como cromatina y proteínas condensadas en el citoplasma de las células, además de hipertrofia nuclear (Shields y Behringer, 2004). En el 2006, Li *et al.*, desarrollaron un método de detección para PaV1 a través de hibridación fluorescente *in situ* (FISH). Montgomery-Fullerton *et al.* (2007) desarrollaron un ensayo para la detección de PaV1 a través de PCR (amplificación de 499 pb) el cual permite detectar al virus en etapas tempranas de la infección (10 días post-infección). Este método no requiere sacrificar al organismo para la obtención de tejidos, ya que se puede detectar con una pequeña cantidad de hemolinfa de una langosta viva, también es una herramienta útil para la detección del virus en tejido (Huchin-Mian *et al.*, 2009).

Análisis histológicos en organismos enfermos con PaV1 muestran que la infección viral afecta al tejido conectivo, la glándula digestiva y a las células circulatorias o hemocitos, principalmente al subtipo hialino y semigranular (Shields y Behringer 2004). Aunque no existen cultivos celulares continuos para crustáceos, Li y Shield (2007) diseñaron un cultivo primario usando células hialinas y semigranulares para cuantificar al virus PaV1 en muestras de hemolinfa.

La prevalencia de PaV1 para la población de langostas juveniles en los Cayos de la Florida, EUA, es de un 7%; con datos obtenidos de 1999 al 2001, tomando en

cuenta signos visibles de la enfermedad (Shields y Behringer 2004). Así mismo, estudios del virus realizados en la laguna arrecifal de Puerto Morelos localizada en el Caribe mexicano en el 2001 mostraron una prevalencia del 2.5% también tomando en cuenta solo los signos visuales de la infección y un nivel de cohabitación (porcentaje de langostas sanas habitando con langostas enfermas) en refugios naturales y en "casitas" (refugio artificial, utilizado para la pesca), del 3.5%. Sin embargo, para el 2006 este nivel había aumentado significativamente a una prevalencia del 10.9% y una cohabitación del 29.4%, sin existir un cambio en la densidad de la langosta (Lozano-Álvarez *et al.*, 2008). En Cuba la prevalencia media global determinada fue de 4.48%, sin embargo este estudio incluye análisis histológicos y confirmación de la presencia del virus por PCR (Cruz-Quintana *et al.* 2011). Candia-Zulbarán (2011) reportó la prevalencia de este virus basada en signos visuales de la infección, para Bahía de la Ascensión, Quintana Roo de 3.2% en el 2006 (n=348) y 0.96% en 2010 (n=2824). Considerando exclusivamente las langostas adultas (≥ 80 mm LC) en estas muestras, la prevalencia del síndrome varió entre un máximo de 4.1% (2006, n = 268) y un mínimo de 0.2% (2010, n = 1596). Existen pocos antecedentes de prevalencia del síndrome en langostas grandes. En una evaluación llevada a cabo en 2001 en un conjunto de áreas marinas protegidas en Florida, se registró una prevalencia $<1\%$ en una muestra de 863 langostas subadultas y adultas, pero sin especificar cuántas eran subadultas y cuántas adultas (Shields y Behringer, 2004). Por otro lado, Huchin-Mian *et al.* (2009) detectaron, por medio de análisis moleculares, la presencia de PaV1 en 11 de 22 colas de langosta congeladas exportadas de Belice, algunas de las cuales, por su tamaño, claramente correspondían a langostas adultas. Tomando en cuenta la presencia de portadores asintomáticos de la enfermedad, la prevalencia de la infección por PaV1 puede ser mayor a la registrada hasta ese momento (Shields y Behringer 2004; Huachin-Main *et al.*, 2008).

A diez años de su descubrimiento hay información disponible sobre el virus PaV1 y sus efectos patológicos en las langostas *P. argus*. Se sabe que infecta inicialmente fagocitos fijos en el hepatopáncreas y al tejido conectivo que lo rodea. Las langostas fuertemente infectadas tienen una pobre condición nutricional, asociado al bajo metabolismo y al cese de la alimentación. A través de análisis histológicos se observó una marcada atrofia en el hepatopáncreas así como una notable falta de reservas, esto a través de la observación histológica que muestra una reducción de

las células de reservas (RI "reserve inclusión cells) indicando una falta de glucógeno, así mismo evaluaciones de los componentes del suero de la hemolinfa mostraron diferencias significativas en glucosa, fosfatos, triglicéridos y lipasas apoyando la hipótesis de que su muerte resulta de un agotamiento metabólico (Shields y Behringer, 2004; Li *et al.*, 2008; Behringer *et al.*, 2008, 2011).

Respecto a la transmisión del virus PaV1 se conocen diferentes vías no todas igualmente probables o eficientes, las cuales son la inoculación, ingestión, contacto y a través del agua, siendo las dos últimas las formas más probables en el medio ambiente, la ingesta de tejido infectado podría darse naturalmente pero el canibalismo ha sido poco observado fuera del laboratorio y no se conocen presas que puedan servir como reservorio de PaV1 (Butler *et al.*, 2008; Behringer *et al.*, 2011). Recientemente se reportó que las gónadas de hembras adultos estaban fuertemente infectadas, sugiriendo una nueva vía de infección, la transmisión vertical de PaV1. Este tipo de transmisión ya ha sido reportado en virus que afectan crustáceos peneidos como el virus de la enfermedad de la mancha blanca (WSSV) y con el virus de la necrosis infecciosa hipodérmica hematopoyética (IHHNV) (Cruz-Quintana *et al.*, 2011). Esto podría coincidir con el trabajo de Ramírez-Estévez *et al.* en el 2010 quienes reportan la prevalencia de PaV1 por sexos, en machos la clase que presentó mayor prevalencia solo fueron juveniles de 15 mm LC, mientras en hembras las langostas enfermas presentaron un intervalo de tallas de 15 a 80 mm, con los mayores porcentajes en las clases de ≤ 20 mm y 75-80 mm de longitud de cefalotórax (LC). No obstante, los mecanismos involucrados en el proceso de transmisión, tanto del hospedero como del patógeno permanecen aún desconocidos. Behringer *et al.*, (2006) descubrieron que las langostas *P. argus* tienen la capacidad de identificar a langostas infectadas con el virus PaV1 y evitar compartir el mismo refugio, lo cual podría contribuir a disminuir la transmisión de la enfermedad. Esta conducta de evasión de coespecíficos enfermos, además de ser rara en la naturaleza (Behringer *et al.* 2008), es contraria al comportamiento social gregario de *P. argus*.

Para evaluar si en verdad las langostas sanas evitaban compartir el mismo refugio con las langostas enfermas, Behringer *et al.*, (2006) llevaron a cabo un experimento de laboratorio, en la cual individuos sanos y enfermos tuvieron las condiciones para escoger entre un refugio vacío y otros refugios que contenían, o una langosta sana o una enferma. Encontraron que las langostas sanas al escoger su refugio evitaban

aquellos con langostas enfermas y preferían compartir refugio con otras langostas sanas.

Por otro lado, cuando las langostas enfermas escogían su refugio, no discriminaban si en dicho refugio había un individuo sano o enfermo. Estos mismos autores observaron que en condiciones naturales las langostas enfermas raramente comparten el mismo refugio con otras langostas, se reportó que el 93% de ellas permanecían solitarias y menos del 7 % compartían sus refugios. En contraste en un estudio realizado en Bahía de la Ascensión, Quintana Roo se observó del total de casitas que contenían langostas, el 62.7% estuvo ocupado sólo por langostas sanas, el 6.5% sólo por langostas enfermas, mientras que el 30.8% estuvo co-ocupado por langostas sanas y enfermas. Esos resultados podrían sugerir que las casitas permiten la cohabitación de langostas sanas y enfermas, sin que medie necesariamente un contacto físico entre ellas, ya que estas casitas tienen un área de 1.5–2 m² pueden albergar un alto número de langostas (Candia-Zulbarán, 2011).

Dentro de los estudios realizados sobre las langostas de Bahía de la Ascensión se han abordado temas referentes al uso de casitas y el sistema de "campos", a la langosta como recurso pesquero con énfasis en su dinámica poblacional, y la de la pesquería, incluyendo análisis bioeconómicos (Sosa-Cordero *et al.* 2008; Candia-Zulbarán, 2011). Así mismo Briones-Fourzán *et al.* (2007) con base en un extenso experimento de campo llevado a cabo en la laguna arrecifal de Puerto Morelos, Quintana Roo (una reserva natural, donde existe una baja actividad pesquera) concluyeron que las casitas aumentan la densidad y la biomasa de los juveniles ya que mitigan la falta de refugios naturales, fomentan el gregarismo, permiten la cohabitación de juveniles pequeños con langostas más grandes con mayores habilidades defensivas y permiten a los juveniles explotar los recursos alimentarios disponibles de una manera más eficiente, reduciendo su tiempo de exposición a depredadores. Estas características reducen la mortalidad por depredación y aumentan la persistencia de las langostas. De esta manera, el uso de campos o parcelas de fondo marino asignadas a diferentes pescadores, quienes son los únicos autorizados para utilizar las casitas que coloquen en su campo, en Bahía de la Ascensión, aunado al exitoso esquema de organización y regulación implementado por la cooperativa pesquera local, ha permitido la sustentabilidad de la pesquería de langostas en dicha localidad (Candia-Zulbarán 2011, Sosa-Cordero *et al.* 2008).

Desde el punto de vista epidemiológico el uso de casitas podría significar un mayor riesgo de contagio al aumentar la cercanía entre las langostas, al incrementar el gregarismo y la abundancia de los organismos. Este aspecto ha sido abordado recientemente, un estudio de tres años en Bahía de la Ascensión en el cual se monitorearon 530 "casitas" en tres diferentes zonas de la Bahía reporta un promedio de prevalencia del 4.7 % similar a lo reportado en Cuba (4.7 %) donde se usan las "casitas", y también similar a lo reportado en los Cayos de Florida (5%) donde no se usan las "casitas". Estos descubrimientos sugieren que la dinámica de la enfermedad en la población de *P. argus* está asociada mas a factores intrínsecos y extrínsecos que por el uso de las "casitas". Cabe recordar que *P. argus* en el Caribe constituye una metapoblación interconectada por la gran migración de una importante cantidad de organismos en diferentes etapas de su ciclo de vida, empezando por sus estadios larvales (de 6 a 10 meses), así como la migración de adultos a aguas profundas (Seijoa, 2007). Esto puede favorecer el flujo genético y permitir el mantenimiento de la variabilidad genética de la población estable en términos de la frecuencia alélica, no obstante, se ha observado en otros organismos marinos que las adaptaciones a los aspectos regionales o locales pudieran generar diferencias en cuanto a la plasticidad fisiológica, incluyendo lo referente a la respuesta ante patógenos (Féral, 2002).

Sistema inmunológico

Los hemocitos se consideran la primera línea de defensa, ya que participan directamente en los procesos de reconocimiento, procesamiento y amplificación de la respuesta inmunitaria (Söderhall, 1982; Söderhall y Häll, 1984; Johansson y Söderhall, 1988; Jiravanichpaisal *et al.*, 2006). La amplificación de esta respuesta está asociada al sistema profenoloxidasa (proPO) que se encuentra compartimentalizado en el interior de los gránulos de los hemocitos en el caso de muchos crustáceos (Söderhal, 1982; Söderhall y Smith, 1983). Sin embargo para las langostas *P. interruptus* (Hernández-López *et al.*, 2003) se ha reportado que a diferencia de otros crustáceos, la pro-fenoloxidasa (proPO) es humoral, mientras que la enzima que la activa (activadora de la pro-fenoloxidasa PPAE), se encuentra dentro de los hemocitos. Se ha observado que este activador es liberado por degranulación en respuesta a partículas foráneas o patógenos. Así mismo Perdomo-Morales *et al.*, (2007) determinaron que la actividad de la fenoloxidasa de *P. argus*

se encuentra tanto en las células como en el plasma y que la hemocianina es la fuente de dicha enzima. El sistema de la PPEA es liberado directamente por estimulación de los hemocitos con beta-glucanos (β G) o lipopolisacáridos (LPS) de hongos y bacterias (Söderhäll y Häll, 1984) o a través de proteínas séricas de reconocimiento que alertan a los hemocitos (Vargas-Albores *et al.*, 1996; 1997). El sistema proPO al activarse genera algunos factores que estimulan a los hemocitos para eliminar el material extraño por medio de procesos como fagocitosis, formación de nódulos y encapsulamiento (Söderhäll y Häll, 1984; Sung *et al.*, 1998).

Uno de los mecanismos más importantes de la respuesta inmunitaria realizada por los hemocitos es la fagocitosis. Durante el proceso se liberan sustancias líticas como el peróxido, superóxido y derivados del óxido nítrico, los cuales son biológicamente muy reactivos (Muñoz *et al.*, 2000; Campa-Córdova *et al.*, 2002). Este proceso es conocido como estallido respiratorio y juega un papel muy importante en la actividad microbicida de los hemocitos (Song y Hsieh, 1994).

Las proteínas ocupan una posición central para el metabolismo y el sistema inmunológico, por ser la base para la formación de enzimas, hormonas, hemocianina, proteínas de reconocimiento, y además intervienen directamente en la construcción de tejidos, en la reparación y mantenimiento de éstos. Asimismo, son fuente de energía en los procesos catabólicos y son esenciales en el metabolismo de carbohidratos y lípidos.

Dentro de las proteínas sanguíneas se encuentra la hemocianina, la proteína más abundante en moluscos y artrópodos. La hemocianina (Hc) es una macromolécula en la que el cobre funciona como sitio activo, para la reducción del oxígeno. La Hc tiene como principal función el transporte de oxígeno aun que se ha observado que también actúa como reserva de proteínas (Pascual *et al.*, 2006). Se ha reportado que la Hc de muchas especies de artrópodos y moluscos poseen actividad tirosinasa, iniciando la síntesis de melanina (Decker and Tuczec 2000; Perdomo-Morales *et al.*, 2008). Así mismo existen reportes que señalan que componentes endógenos de la hemolinfa, como algunos péptidos antimicrobianos, pueden dirigir la activación de la hemocianina, sugiriendo una posible participación de la fenoloxidasa derivada de la hemocianina en la respuesta inmune (Van Bruggen, 1980; Marianne. *et al.*, 1998; Fabrice Mouche *et al.*, 1999; Nagai *et al.*, 2001). Recientemente se describió la

presencia de la actividad de la fenoloxidasa en la fracción plasmática de la hemolinfa de *Panulirus argus* la cual tienen su origen en la hemocianina (Rainer y Brouwer, 1993; Van Holde *et al.*, 1991; Perdomo-Morales *et al.*, 2008).

Condición nutricional y capacidad digestiva

El desarrollo de una enfermedad infecciosa está determinado por múltiples factores, entre los que destacan la transmisión del agente causal y la capacidad del hospedero para responder a la infección. La capacidad de respuesta del hospedero está en función de la condición fisiológica general, las reservas de energía metabólica y las condiciones ambientales imperantes en el momento de la infección. En el caso de los crustáceos, la caracterización bioquímica de los tejidos ha permitido determinar que tanto los componentes de la hemolinfa, el músculo y la glándula digestiva, reflejan el aprovechamiento, la demanda y el uso de la energía en estos organismos (Rosas *et al.*, 2001).

Los decápodos poseen un sistema circulatorio abierto, mediante el cual son distribuidos los nutrientes, el pigmento respiratorio o hemocianina, las hormonas, los hemocitos y las enzimas que juegan un papel importante en la respuesta inmune de los organismos (como lisozima, fenoloxidasa, proteasas, inhibidoras de proteasas, etc). Los componentes en la hemolinfa se han utilizado en crustáceos como indicadores del estado fisiológico (Rosas *et al.*, 2001), en condiciones de hipoxia producidas por transporte comercial (Ocampo *et al.*, 2003), la exposición a contaminantes (Förlin *et al.*, 1996), diferentes niveles de proteína o condiciones de inanición (Pascual *et al.*, 2006). Los metabolitos plasmáticos como glucosa, acilglicéridos, proteínas, colesterol han sido ampliamente utilizados. Entre ellos el colesterol forma parte de los lípidos de gran importancia para el metabolismo por ser precursor de la vitamina D, de hormonas esteroideas y de la β -ecdisona (hormona de la muda). Los acilglicéridos han sido utilizados como índices de condición por la importancia en el transporte de energía y almacenamiento (Ocampo *et al.*, 2003).

Los carbohidratos son una fuente de energía importante, sin embargo, en la langosta el nivel de carbohidrasas (amilasa, glucosidasa, celulasa, quitinasa, etc.) es bajo, evidenciando que no son el nutriente más importante en la dieta de estos organismos (Johnston, 2003; Perera *et al.*, 2008a). No obstante, el metabolismo de carbohidratos resulta de gran importancia, pues es esencial para la formación de

quitina y el proceso de la muda. La fuerte interacción entre el metabolismo de proteínas y de carbohidratos está claramente representado a través de la ruta gluconeogénica (Rosas *et al.*, 2003). Desde esta perspectiva el estudio del estado nutricional, los ajustes fisiológicos y el manejo de las reservas requiere de la inclusión de componentes del metabolismo de lípidos y de carbohidratos, aun en organismos de hábitos carnívoros como las langostas.

La glándula digestiva es el principal órgano de síntesis y secreción de enzimas digestivas, absorción de sustancias digeridas, almacenamiento de lípidos y glucógeno, y distribución de minerales y sustancias orgánicas. Este órgano presenta modificaciones en sus elementos celulares, en el lumen glandular y su tejido conectivo en función del ciclo de muda. Es uno de los principales órganos de monitoreo de la salud, pues los análisis histológicos efectuados en este órgano han permitido evaluar la condición nutricional e infecciones principalmente en camarones cultivados. Los estudios histológicos de este tipo indican que bajos contenidos de colesterol afectan la estructura histológica del hepatopáncreas y a largo plazo la tasa metabólica del organismo. Así mismo el ayuno genera reducción del tamaño celular, condensación de la cromatina nuclear, engrosamiento de la membrana basal y disminución progresiva de las reservas de lípidos y glucógeno. La diagnosis a través del hepatopáncreas es una herramienta adicional para evaluar cambios fisiológicos y ambientales ya que es un órgano altamente sensible (Verri *et al.*, 2001; Rosas *et al.*, 2006).

La langosta espinosa es un depredador que se alimenta de una gran variedad de especies bentónicas incluyendo moluscos, crustáceos, poliquetos y otros invertebrados, por lo que presenta la producción de un diverso rango de enzimas digestivas, reflejando una fisiología digestiva flexible. La actividad de las enzimas digestivas en langosta ha sido reportada para pocas especies como son la langosta espinosa japonesa, *Panulirus japonicus*, la australiana *Jasus edwardsii* (Johnston, 2003), en la californiana *P. interruptus* (Celis-Gerrero *et al.*, 2004), en la langosta americana *Homarus americanus* y *P. argus*. Perera *et al* (2008), reportaron los cambios ontogénicos de las enzimas digestivas para *P. argus*, quien posee una relación positiva entre la tripsina y la amilasa con respecto a la talla, mientras que las esterases y lipasas decrecen con la edad de las langostas. Estos resultados sugirieron a los autores que la actividad de las enzimas responde a las necesidades

fisiológicas de las langostas según su dieta. Otro factor que afecta las enzimas es el estadio de muda. Tripsina, quimotripsina, amilasa y lipasas incrementan gradualmente alcanzando su máxima actividad en la intermuda y premuda (Biesiot and McDowel, 1990; Wells *et al.*, 2001; Johnston, 2003; Perera *et al.*, 2008a, 2008b; Simon 2009).

El virus PaV1 en langostas *P. argus* en EUA, México, Belice y Cuba, abre un nuevo panorama en el estudio de enfermedades virales para el grupo de palinúridos. Los análisis histopatológicos de langostas experimentalmente infectadas señalan a la glándula digestiva, al tejido conectivo y a la hemolinfa como los principales tejidos afectados por la infección por PaV1. La respuesta fisiológica inmunológica del hospedero ante la infección, puede ser abordada a través la caracterización bioquímica y la actividad enzimática en los principales tejidos, como glándula digestiva, branquias, músculo y hemolinfa. Entender el proceso infectivo y conocer más sobre esta enfermedad viral en la langosta *P. argus* es sumamente relevante, tanto por los efectos negativos que puede tener en las poblaciones silvestres, así como por los efectos adversos sobre su pesquería. Con este enfoque, analizar a los juveniles que se contagiaron y que desarrollaron la infección en condiciones naturales constituye una nueva perspectiva que puede sumar información relevante para entender mejor a la enfermedad contemplando la variabilidad de la respuesta fisiológica del hospedero vinculada al ambiente al comparar a juveniles provenientes de dos localidades.

HIPOTESIS

Se conoce que la infección por PaV1 en juveniles de langosta *Panulirus argus* afecta diferentes tejidos así como a los hemocitos, células que se consideran la primer línea de defensa. Por lo tanto, es de esperarse que algunos procesos del sistema inmunológico serán afectados por la presencia y diseminación de este patógeno. El hepatopáncreas es el primer órgano afectado por el virus PaV1, y en langostas severamente infectadas se ha observado una marcada alteración estructural del órgano así como una notable falta de reservas. Siendo el hepatopáncreas el principal órgano de síntesis y secreción de enzimas digestivas, almacenamiento de lípidos, glucógeno, y donde se lleva a cabo la actividad digestiva, es de esperar que todos estos elementos de reserva y función digestiva sean afectados por la enfermedad. Puesto que la respuesta fisiológica del hospedero está asociada con el ambiente, las langostas de localidades similares presentaran un desarrollo de la infección similar.

OBJETIVOS

Objetivo general

Estudiar el proceso infeccioso por el virus PaV1 a través de la caracterización fisiológica e inmunológica de los juveniles de la langosta espinosa, *Panulirus argus*, con el fin de ofrecer una visión más integradora de los efectos que genera el desarrollo de la infección sobre los componentes inmunológicos, la condición nutricional y la capacidad digestiva de las langostas infectadas naturalmente, y provenientes de dos localidades cercanas.

Objetivos específicos

Condición inmunológica

Evaluar la condición inmunológica de la langosta *Panulirus argus* infectada con PaV1 a través del conteo de hemocitos, la actividad de la fenoloxidasa, la actividad inhibitoria de tripsina, la actividad hemaglutinante y el estallido respiratorio.

Estado fisiológico

Conocer los efectos de la infección con virus PaV1 en la capacidad digestiva a través de la evaluación de la actividad de la tripsina, la quimotripsina, la amilasa y la glucosidasa de la glándula digestiva de la langosta *Panulirus argus*.

Determinar el estado nutricional a través de la concentración de proteínas totales, colesterol, glucosa y acilglicéridos en el plasma y la glándula digestiva, y las reservas de glucógeno y lípidos totales en la glándula digestiva y el músculo de la langosta *Panulirus argus* infectada con PaV1.

Comparar el estado fisiológico de langostas sanas y en los diferentes grados de infección por el virus PaV1, a través de la caracterización bioquímica de la glándula digestiva, capturadas en dos localidades: Puerto Morelos y Bahía de la Ascensión.

MATERIALES Y METODOS

Área de estudio

Se utilizaron langostas de la especie *Panulirus argus* obtenidas en el parque nacional arrecife de Puerto Morelos ($20^{\circ}51' \text{ N}$; $86^{\circ}53' \text{ O}$) ubicado en el municipio de Benito Juárez, frente al poblado de Puerto Morelos, Quintana Roo, México. Este sitio de muestreo representa una zona donde se realiza muy poca pesca de la langosta por tratarse de un área protegida. También se hicieron muestreos en Bahía de la Ascensión, la cual forma parte de la reserva de la Biósfera "Sian Ka'an", ($19^{\circ} 05' - 20^{\circ} 07' \text{ N}$; $87^{\circ} 22' - 88^{\circ} 02' \text{ O}$) sitio natural localizado en la costa del Caribe mexicano perteneciente a los municipios quintanarroenses de Felipe Carrillo Puerto y Tulum, en donde se realiza una alta actividad de pesca de la langosta a través del uso de casitas y manejo de parcelas o campos.

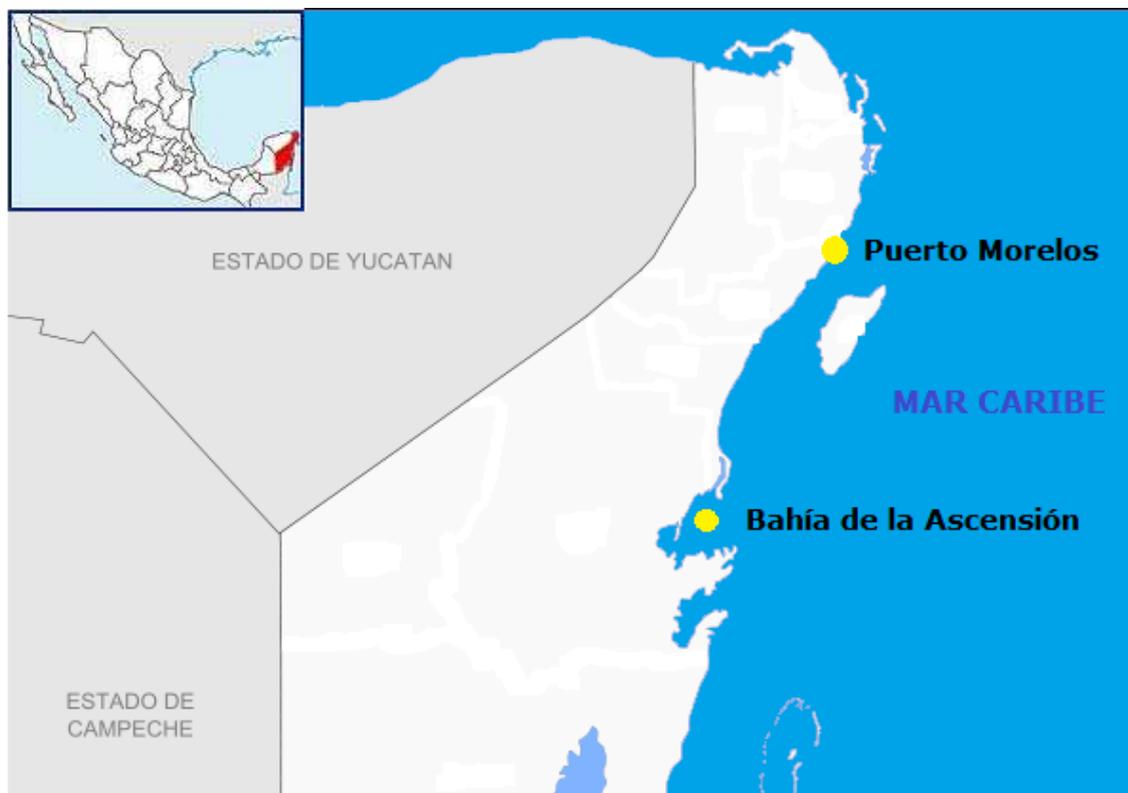


Fig. 3 Diagrama de la costa de Quintana Roo, mostrando las dos zonas de muestreo.

Captura de organismos

Se realizaron muestreos donde se recolectó mediante buceo organismos juveniles de langosta espinosa *P. argus* con signos de infección viral por PaV1: enrojecimiento del

cuerpo, coloración lechosa de la hemolinfa, además de organismos sin signos de infección por PaV1, considerados visualmente sanos. Los organismos sanos y enfermos fueron colocados por separado en tinas con aireación y trasladados a las instalaciones de Laboratorio de Crustáceos de la Unidad Académica de Sistemas Arrecifales Puerto Morelos del Instituto de Ciencias de Mar y Limnología de la UNAM.

Manejo de los organismos

Las langostas recién capturadas fueron mantenidas en estanques con un volumen de 5700 litros de agua de mar con circulación continua. El sistema de agua se mantuvo abierto con una tasa de recambio de 2 a 3 veces por día, con una temperatura promedio de 28°C, una salinidad de 34.8 y oxígeno disuelto del 6- 6.3 %; el agua de mar fue tratada con ozono. En los estanques se colocaron refugios artificiales para favorecer condiciones de manejo en cautiverio. Los organismos fueron mantenidos en estas condiciones por menos de tres días y para no interferir en las evaluaciones bioquímicas y enzimáticas de los diversos tejidos, los organismos fueron mantenidos en inanición. Previo a la obtención de la hemolinfa las langostas fueron colocadas y transferidas a contenedores con agua de mar a 5° C menos del agua del contenedor inicial con el objetivo de disminuir su metabolismo y decrecer el efecto de la manipulación sobre los componentes de la hemolinfa (Pascual *et al.*, 2006)

Diseño de muestreos

Se realizaron 2 muestreos durante el 2009 el primero en julio llevado a cabo en Bahía de la Ascensión, el segundo en agosto del 2009 se realizó en Puerto Morelos y fue el más amplio, ya que incluye la evaluación de los componentes metabólicos e inmunológicos de la hemolinfa. En todos los muestreos la condición de infección y el grado de severidad fue confirmada por el análisis histopatológico y la prueba de diagnóstico molecular PCR (Huchin-Mian, 2007). Estas dos pruebas fueron desarrolladas en el marco del proyecto de investigación por el estudiante de doctorado Juan Pablo Huchin Mian.

Obtención de hemolinfa

La hemolinfa se obtuvo individualmente con una jeringa con solución anticoagulante (350mM NaCl, 10mM Cl, 10mM Hepes, 10mM EDTA-Na₂, pH 7.3, 791 mOsm/Kg;

Hernandez-López *et al.*, 2003) enfriada a 2-8 °C. Antes de la punción, el anticoagulante de la jeringa fue descartado, sólo fue usado para mojar las paredes de la jeringa. La muestra de hemolinfa se depositó en una superficie de parafilm sobre un campo frío para tomar alícuotas para las diversas evaluaciones. Para las evaluaciones metabólicas e inmunológicas en el plasma, la hemolinfa se diluyó en solución isotónica para langostas con EDTA o anticoagulante en una proporción 1:2. Se centrifugó a 800 *g*, 5 min a 4° C y el sobrenadante fue separado y conservado a 4°C hasta su evaluación.

El contenido granular de los hemocitos fue obtenido de acuerdo a Hernández-López *et al.*, (1996). El paquete celular obtenido de la separación del plasma fue lavado con anticoagulante y centrifugado como se describe anteriormente. El sobrenadante fue descartado y el paquete celular fue re-suspendido varias veces con amortiguador de cacodilatos (Ácido cacodílico 10 mM; CaCl 10 mM; pH 7.0) en el mismo volumen que el plasma, posteriormente fue centrifugado a 15,000 *g* 5 min a 4 ° C. El sobrenadante fue separado y utilizado como fuente para las reacciones de fenoloxidasasa en el degranulado de hemocitos.

Después de la obtención de hemolinfa se registró el peso húmedo de los organismos, la talla y se obtuvo un corte de uno de los pleópodos para determinar el estadio de muda en base al desarrollo setal (Lyle and McDonald, 1983). Para la disección de cada organismo se realizó un corte en el cefalotórax de cada langosta y se extrajeron muestras de hepatopáncreas y músculo, congeladas en nitrógeno líquido y almacenadas a -40°C hasta su análisis.

Condición inmunológica

Para evitar cualquier activación del sistema inmunológico por endotoxinas, todo el material de vidrio utilizado fue previamente lavado con Etoxa-clean y las soluciones fueron preparadas usando agua libre de pirógenos.

Conteo y caracterización de hemocitos

Una muestra de hemolinfa fue mezclada con solución Alsever (115 mM glucosa; 30 mM citrato de sodio; EDTA-Na₂ 10 mM; 338 mM NaCl) con 20 % de formol (v/v). La muestra fue refrigerada 2-8 °C hasta su análisis. El conteo de los hemocitos se realizó con una cámara de Neubauer, y la categorización celular en hemocitos granulares, semigranulares y hialinos fue determinada de acuerdo a las

características citológicas del tamaño, radio citoplasmático, contenido y tamaño de gránulos (Le Moullac *et al.*, 1997). Se analizó el conteo por duplicado con un cuadrante mínimo de 0.004 m^3 (Pascual *et al.*, 2006). Los resultados fueron expresados como la concentración de células por mm^3 .

Hemaglutinación

50 μl de plasma de langosta fueron diluidos serialmente (1:2) con 50 μl de solución salina al 0.9 % en una microplaca de fondo U. Posteriormente 50 μl de suspensión de eritrocitos humanos (O^+) al 2% en una solución salina (0.9 %) fueron añadidos a cada pozo e incubados por 2 h a temperatura ambiente ($26 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$). Para cada placa una columna de eritrocitos y solución salina fueron utilizados como control negativo. La cantidad de hemaglutinación fue registrada como la última dilución en donde se registró la actividad de hemaglutinación elevada a la potencia 2.

Actividad de fenoloxidasa

La actividad total de fenoloxidasa fue evaluada por espectrofotometría al detectar la formación de dopacromo producido de L-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA), de acuerdo a Ashida & Söderhall (1984) y Hernández-López *et al.* (1996) con algunas modificaciones. 100 μl de muestra (plasma o degranulado de hemocitos) fue incubado por 10 minutos a temperatura ambiente ($26 \pm 2^\circ\text{C}$) con 100 μl of tripsina (1 mg/ml) para transformar la profenoloxidasa en su forma activa, fenoloxidasa. Posteriormente se añadieron a la reacción 150 μl of L-DOPA (Sigma D9628) (3 mg/ml). Se registró la absorbancia a los 30 segundos a 490nm en un lector de microplaca (Biorad mod. 550). Para evaluar la actividad de profenoloxidasa se omitió la incubación con tripsina. Para los blancos se sustituyó el L-DOPA por agua libre de pirógenos, esto permitió contar un control individualizado ya que el color de la hemolinfa puede variar muchos entre las langostas. Así mismo la diferencia entre estas dos se registro como la proPO presente. Los resultados fueron expresados como el incremento de 0.001 de la densidad óptica.

Estallido respiratorio

La fagocitosis es mérida indirectamente a través de la producción intracelular del anión superóxido de los hemocitos, se cuantificó usando la reducción de NBT (Nitroblue Tetrazolium) a formazán de acuerdo a Song y Hsieh (1994). Se depositó en cada pozo de la microplaca 100 μL de hemolinfa, las microplacas fueron

centrifugadas a 300 g por 15 min. El plasma se removió y 100 μ L de Zymosan fueron añadidos, se incubó la reacción por 30 min a temperatura ambiente. El zymosan fue descartado y los hemocitos fueron lavados tres veces con 100 μ L de solución Hank, posteriormente fueron teñidos con 100 μ L de solución NBT (0.3 %) por 30 min. La solución fue removida y los hemocitos lavados con 100 μ L de metanol (70 %) y secados. Para disolver el formazán se añadió 120 μ L de KOH y 140 μ L de DMSO (Dimetil Sulfoxido). Se registró la densidad óptica por duplicado a 630 nm, utilizando un lector de microplaca (Bio-Rad Mod. 550). Los resultados se expresaron en densidad óptica.

Estandarización de métodos para capacidad digestiva

Estabilidad de la muestra de glándula digestiva liofilizada y no liofilizada mantenida en ultracongelación (-40 °C) a lo largo de un año para análisis de actividad enzimática y de metabolitos.

Para evaluar el mejor procedimiento para preservar las muestras hasta su análisis, se diseñó una prueba para determinar la estabilidad de la actividad enzimática y metabolitos (proteína soluble, glucosa, colesterol y acilglicéridos) durante un año, con tejido liofilizado y no liofilizado. Se utilizaron para ello muestras de 50 mg de hepatopáncreas de un juvenil sano de *P. argus*. Se realizaron análisis el mismo día de la obtención de la muestra, y estos valores constituyeron la línea base (día cero). Las sub-muestras fueron inmediatamente congeladas en nitrógeno líquido y la mitad de ellas fueron liofilizadas. Las muestras se mantuvieron a -40 °C durante un año. A los 15 días, un mes, tres, seis y doce meses se extrajeron tres muestras al azar de cada grupo (liofilizadas y mantenidas en congelación) para evaluar la actividad enzimática y los metabolitos y se realizó un análisis de varianza para determinar el efecto del tiempo de preservación.

Estandarización de las técnicas de actividad enzimática de la glándula digestiva (pH, temperatura, concentración de la enzima y concentración de sustrato).

Cinética cero

En las reacciones catalizadas por enzimas y analizadas en condiciones *in vitro* el incremento en la concentración del sustrato aumenta la velocidad de la reacción hasta que la reacción alcanza un punto en que dicha velocidad se hace

independiente de la concentración del sustrato. La concentración del sustrato a la cual se obtiene la mitad de la velocidad máxima de actividad es definida como la constante de Michaelis o K_m , y refleja la afinidad de la enzima, la cual es específica para cada enzima y puede variar entre especies o por el estadio de vida. Como el pH y la temperatura afectan la actividad de las enzimas es importante determinar los valores óptimos para observar la máxima actividad en condiciones controladas (Lehninger, 1995). Tomando en cuenta la atrofia del hepatopáncreas reportado en langostas severamente infectadas, se considero importante establecer la temperatura, pH, concentración de enzima, de sustrato y el tiempo de incubación idóneo para la determinación de la actividad enzimática de los juveniles de *P. argus*.

Determinación de pH y temperatura optimo.

Según las referencias del pH y temperatura óptimo reportados para reacciones *in vitro* para enzimas digestivas de *P. argus* por Perera *et al* (2008b) se probaron 4 intervalos de temperaturas, que podían ir desde los 30 a los 70 °C y varios pH para cada enzima, en el caso de las enzimas de tipo proteasa se probaron pH desde 5 hasta 9, en el caso de las enzimas carbohidrasas el intervalo de pH fue de 3 a 7.

Concentración de enzima y sustrato

Para asegurarnos que las reacciones enzimáticas estuvieran limitadas por la concentración de enzima o de sustrato que adicionamos a la reacción, se probaron diferentes concentraciones del extracto y del sustrato.

Para ello se probaron diferentes concentraciones de sustratos, específicos para cada enzima, en incrementos y decrementos del 15% según la concentración primaria y se determinó la K_m de dicho sustrato. Así mismo, se probaron diferentes diluciones del extracto enzimático las cuales fueron determinadas en 4 incrementos y 4 decrementos del 15% a partir de una concentración inicial de dilución del tejido (6X).

Condición nutricional

Para el análisis enzimático y de metabolitos en el hepatopáncreas, una muestra del tejido fue homogenizada en condiciones frías (4°C) con agua libre de pirógenos manteniendo una dilución constante de 6X, después se centrifugó a 16,000 *g* por 20

minutos a 4°C y se tomó el sobrenadante para todas las evaluaciones, manteniendo dicho extracto siempre en frío. Para la medición de proteínas totales, se realizó una dilución adicional de 1:10 del extracto con agua libre de pirógenos.

Las concentraciones de los metabolitos se determinó calorimétricamente a partir de plasma con un lector de microplacas (BIO-RAD Modelo 550) y reactivos de diagnóstico clínico humano: Glucosa, acilglicéridos y colesterol de Bayer (Sera Pak Plus). Proteínas totales (Bio-Rad) basada en la técnica de Bradford (1976). La concentración de cada metabolito es reportada como mg/mg de tejido; se calculó a partir de una curva patrón utilizando el estándar comercial.

Capacidad digestiva

Quimotripsina (Geiger and Fritz, 1988)

En una microplaca de 96 pozos se adicionó 5 µl de extracto, después se utilizaron 290 µl de buffer TRIS a 50°C y un pH 7 (temperatura y pH obtenidos en la estandarización) y por último 6 µl de sustrato SAPPNA 150 mM, (Succinil-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilide), se colocó en espectrofotómetro y se registraron los valores a los 30 segundos y en primer minuto. Se leyó a 405nm.

Tripsina (Geiger and Fritz, 1988)

En una microplaca de 96 pozos se adicionó 5 µl de extracto, después se utilizaron 290 µl de buffer TRIS a 60°C y un pH 8 y por último 6 µl de sustrato BAPNA 100 mM, (N α benzoyl-L-arginina p-nitroanilide) se colocó en espectrofotómetro y se registraron los valores a los minutos 1 y 2. Se leyó a 405nm.

Glucosidasa

En una microplaca se adicionó 5 µl del extracto y 145 µl de buffer sodio fosfato 50mM a 60°C y pH 6 y se añadió 6 µl del sustrato PNPG (p-Nitrofenil ∞ D-GlucoPyranoside 120 mM); se incubó a 60°C por 60 min, con agitación constante de 450 rpm en una incubadora de microplaca finalmente se añadió 145 µl de carbonato de sodio 1M para detener la reacción y se leyó en lector de ELISA a 415 nm

α-amilasa (Bernfeld, 1955)

La actividad de la α - amilasa se expresa en mg maltosa liberada en el tiempo que dura la reacción. La actividad se expresa como actividad amilásica/mg de proteína.

En una microplaca de 96 pozos se agregó 20 μ l de extracto, 80 μ l de Glucógeno (Ostra 1.5 % preparado en buffer sodio fosfato 10mM a 60°C y pH 5) y 40 μ l de agua libre de pirógenos. Se agito y se incubó a 60°C por 40 minutos con agitación constante de 450 rpm en una incubadora de microplaca. Por último en una estufa a 100°C se colocó la microplaca por 5 minutos y se leyó a 540 nm.

Análisis histológico y PCR

El grado de severidad de la infección por PaV1 se determinó considerando los criterios emanados del análisis histológico de la glándula digestiva, musculo y branquias realizado por Huchin-Mian (2008). Esos criterios fueron corroborados con un análisis de diagnostico molecular por PCR de acuerdo a Montgomery-Fullerton *et al.* (2007 (Tabla 1).

Tabla 1 Escala de grados de severidad para la infección con *Panulirus argus* Virus 1 (PaV1) en la langosta espinosa *Panulirus argus* (Modificada de Li *et al.*, 2008) y n total capturada.

CONDICIÓN	DESCRIPCIÓN	n total	
		Puerto Morelos	Bahía de la Ascensión
Grado 0 Sanas	<ul style="list-style-type: none">• PCR negativo• Sin inclusiones intracelulares Tipo A (CAI) determinado por microscopia.• Tejido con una estructura bien organizada y normal según lo observado para <i>P. argus</i>	33	7
Grado 1 Ligeramente infectadas	<ul style="list-style-type: none">• PCR positivo• Pocas CAI (< 10 por sección)• Tejido con estructura normal• Sin lesiones características del síndrome presente	9	8
Grado 2 Moderadamente Infectadas	<ul style="list-style-type: none">• PCR positivo• Algunas CAI (10-100 por sección)	8	9

	<ul style="list-style-type: none"> • Daño tisular y de órganos de ligero a moderado • Incremento moderado de tejido intersticial al rededor de los túbulos hepatopancreáticos. 		
Grado 3 Fuertemente infectada	<ul style="list-style-type: none"> • PCR positivo • Gran número de of CAI (>100 por sección) con algunos formaciones de tejido intersticial al rededor de los túbulos hepatopancreáticos. • Presencia de focos necróticos, lesiones severas o destrucción de los túbulos hepatopancreáticos • Presencia de nodulaciones o granulomas 	24	20

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis de las variables medidas solo en Puerto Morelos, como son las de la respuesta inmune, se utilizaron ANOVAS de una vía, aun en los casos en donde por falta de muestras alguno de los grupos no está representado, como es el caso de la profenoloxidasa y la fenoloxidasa en el degranulado, en donde no se conto con langostas moderadamente enfermas para su análisis. En el análisis del estallido respiratorio se utilizó una prueba de T-Student debido a que solo se tienen muestras de langostas sanas y fuertemente infectadas. Se comprobó la homogeneidad de varianza y distribución normal, se tomó por significativas probabilidades menores a 0.05.

El objetivo del presente trabajo es el de ofrecer una visión lo más integral posible sobre los efectos de la infección provocada por el virus PaV1 en la condición inmunológica y nutricional de langostas silvestres. Por esta razón es necesario realizar análisis que permitan interpretar los resultados en esa forma. Para hacer esto se usó el análisis de funciones empíricas ortogonales (EOF por sus siglas en ingles) para la comparación de las dos localidades muestreadas.

El análisis multivariado de EOF resulta una herramienta interesante para detectar la variación simultánea de diversos componentes de un sistema o proceso, y que

muchas veces es difícil de apreciar por medio de análisis univariados. Este tipo de análisis ha sido utilizado en modelos biológicos con crustáceos, Emerciano *et al.*, (datos sin publicar) lo aplicó para determinar cambios en la composición bioquímica y en el perfil de ácidos grasos en desoves de camarones *Farfantepenaeus duorarum* silvestres y cultivados

La idea central de este análisis es reducir la dimensionalidad de un grupo de datos, de variables interrelacionadas, reteniendo tanto como sea posible la variación de este conjunto de datos. Para lo cual se genera una nueva serie de datos, los cuales no están correlacionados y contienen la variación de las variables originales; este análisis dimensional, permite simplificar cualquier fenómeno en el cuál se involucran variables independientes con magnitudes físicas diferentes, para generar el nuevo grupo de datos, sin unidades y de magnitudes comparables. Este análisis parte de la media y desviación estándar de cada uno de los grupos (sanas, infectadas, moderadamente enfermas y severamente enfermas) en cada una de las respuestas medidas. A cada uno de los datos originales, se les restó la media de su grupo y dividió entre la desviación estándar de su mismo grupo, de tal forma que cada dato toma un nuevo valor entre 1 y -1, dichos valores representan la variabilidad de esa langosta localizada en un determinado grupo y con respecto a la media de su mismo grupo. Estos datos no poseen unidades, permitiéndonos relacionar todas las variables, sin importar la unidad inicial que presentaban (g/mg; actividad específica, densidad óptica, células/mm³, etc.).

Una vez obtenida la nueva matriz de datos sin unidades y de magnitudes comparables (entre 1 y -1) es posible obtener la relación o función que nos dice cómo interactúan dichas variables ante una condición. Sin embargo la interacción de las variables puede tener varias funciones, donde la primera de ellas siempre explica el mayor porcentaje de variabilidad de los datos y así sucesivamente. En nuestro caso, solo se consideró la primera función que se obtiene de cada condición, ya que esta representó entre el 40 y el 60% de la tendencia de nuestros datos.

Este análisis permite comparar cada condición y cada población por separado, ya que obtuvimos una gráfica para sanas, otra para langostas infectadas, una más para langostas moderadamente infectadas y una última para langostas fuertemente enfermas, esto en cada una de las localidades. Sin embargo para poder conocer los

cambios que existen en cada una de las variables de las langostas enfermas con respecto a su condición inicial de sanas, fue necesario generar una nueva función, para esta nueva relación se partió de nuestra segunda base de datos, en donde a cada una de las variables de cada langosta en algún nivel de enfermedad se les restó el valor promedio de las sanas y se dividió entre la desviación estándar de su condición, obteniendo así las variaciones en cada uno de los niveles de enfermedad con respecto a langostas sanas, de la misma manera que en las funciones anteriores obtenemos valores entre 1 y -1; donde el cero representa nuestro valor promedio. Así mismo solo se tomó en cuenta la función que representa el mayor porcentaje de la variación del grupo, ya que se obtuvo del 40 al 99% de la variación considerando la primer función.

Una vez conocida la manera en que cada una de las condiciones oscila, determinamos cuales fueron las variables que mostraron la mayor variación en cada una de las condiciones y para conocer el comportamiento de estas variables en particular se les realizó un análisis de ANOVA de una vía cuando se quería conocer su comportamiento dentro de una población o una ANOVA de dos vías para comparar entre las dos localidades, comprobando su homogeneidad de varianza y su distribución normal, se tomó por significativas probabilidades menores a 0.05. Este mismo análisis se utilizó para las variables que no tenían todas las condiciones representadas o que eran muy pocas para poder entrar en el análisis de los EOF como en el caso de lípidos totales y Glucógeno en Puerto Morelos en hepatopáncreas, así como estas mismas variables pero en músculo que sólo se lograron medir en Puerto Morelos. Para el análisis de EOF se utilizó el software matemático MATLAB y el de STATISTICA para la realización de las ANOVAS y T de Student. Para ambos análisis estadísticos se utilizaron solamente juveniles de langosta en intermuda.

RESULTADOS

1. Análisis de la condición inmunológica de los juveniles *Panulirus argus* infectados naturalmente con PaV1.

1.1 Hemocitos

Se realizó el conteo total y la caracterización de hemocitos para cada una de las langostas y se analizaron según el grado de infección que presentaban, dicha clasificación se obtuvo con los resultados del análisis histológico y de PCR realizado a cada langosta.

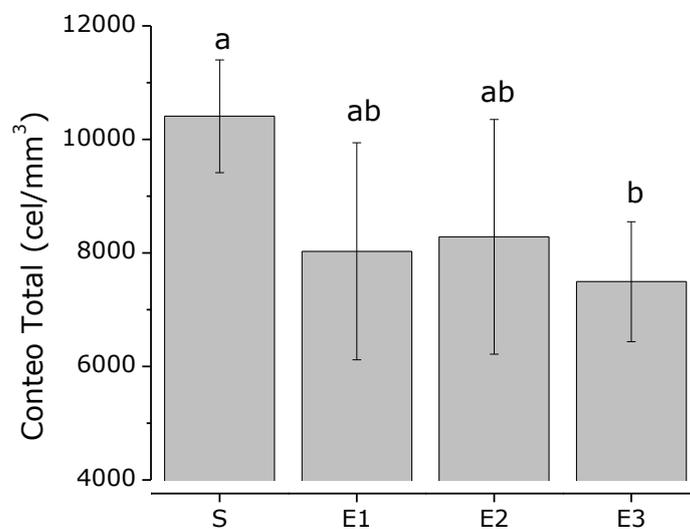


Fig. 4 Concentración Total de hemocitos (cel/mm³) (media ± error estándar) en hemolinfa de juveniles de langosta *Panulirus argus* capturados en el Parque Nacional Arrecife Puerto Morelos. S= Sanas; E1= Ligeramente infectadas; E2= Moderadamente infectadas y E3= Fuertemente infectadas. Las letras diferentes denotan diferencias significativas $p < 0.05$. (n; S=26; E1=7; E2=6; E3=23)

La infección con PaV1 afecta la concentración de los hemocitos. En el conteo total vemos que con respecto a las sanas, las langostas ligeramente infectadas presentan una disminución del 6%, las enfermas nivel 2 presentan una disminución del 48% y las nivel 3 un 42%, sin embargo, sólo la concentración total de células de los juveniles sanos es significativamente mayor que el de los enfermos con proceso avanzado de la infección (Fig. 4).

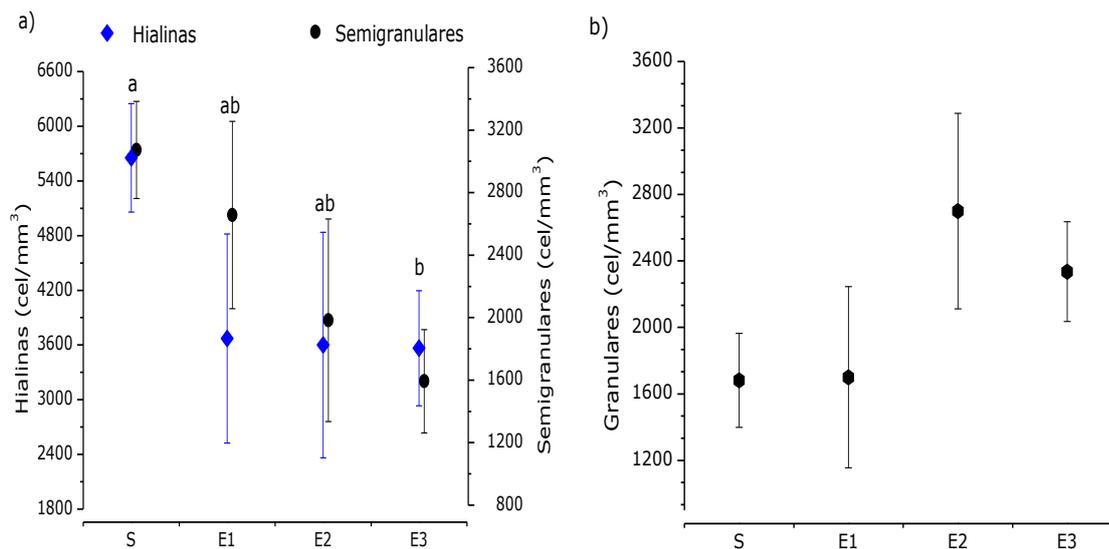


Fig. 5 Concentración de hemocitos (cel/mm³) (media \pm error estándar) en hemolinfa de juveniles de langosta *Panulirus argus* capturados en el Parque Nacional Arrecife Puerto Morelos. a) Células Hialinas y Células Semigranulares, b) Células Granulares. S= Sanas; E1= Ligeramente infectadas; E2= Moderadamente infectadas y E3= Fuertemente infectadas. Las letras diferentes denotan diferencias significativas $p < 0.05$. (n; S=26; E1=7; E2=6; E3=23)

Lo observado en el conteo total se repite en las células semigranulares, las cuales sufren una disminución del 11%, 41% y 54% en los niveles de infección 1, 2 y 3 respectivamente y mostrando diferencias significativas entre sanas y fuertemente infectadas (Fig. 5,a), así como en las células hialinas donde encontramos disminuciones, de un 23% en las enfermas nivel 1, 38% en las enfermas nivel 2 y 40% para las enfermas nivel 3 respecto del las sanas (Fig. 5,a). Las células granulares por su parte mostraron un aumento en las etapas finales de la enfermedad, aun que sin mostrar diferencias significativas por su condición (Fig. 5,b).

1.2. Evaluaciones en hemolinfa

Se midió la actividad hemaglutinante, la de la fenoloxidasa y la producción intracelular del anión superóxido de los hemocitos a través de la reducción de NBT (Nitroblue Tetrazolium) a formazán y se analizaron según el grado de infección determinado por el análisis histológico y PCR realizado a cada langosta.

1.2.1 Hemaglutinación

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que existe una diferencia significativa de la actividad hemaglutinante respecto a la condición de salud de los organismos. Las langostas infectadas (enfermas nivel 1) poseen una actividad hemaglutinante significativamente más elevada (112 ± 13.7) que las langostas sanas (75.5 ± 7.7). Sin embargo esa respuesta decae significativamente conforme progresa la enfermedad (ver figura 6).

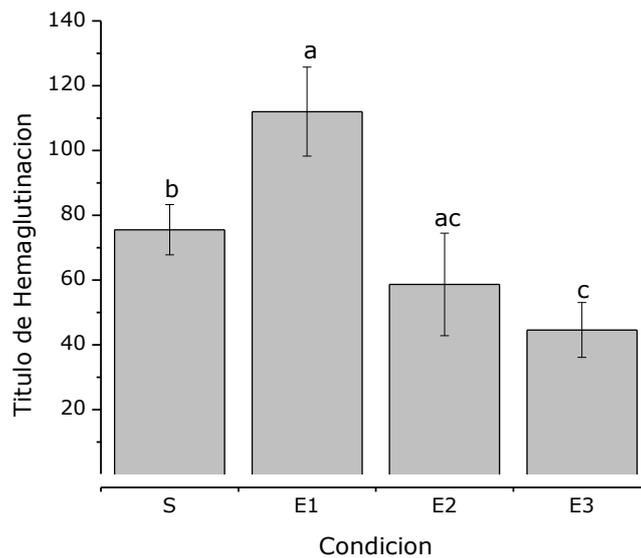


Fig. 6 Actividad hemaglutinante (media \pm error estándar) de juveniles de langosta *Panulirus argus* infectados naturalmente con PaV1 capturados en el Parque Natural Arrecife Puerto Morelos. S= Sanas; E1= Ligeramente infectadas; E2= Moderadamente infectadas y E3= Fuertemente infectadas. Las letras diferentes denotan diferencias significativas $p < 0.05$. (n; S=25; E1=8; E2=6; E3=21)

1.2.2. Actividad de la Fenoloxidasa

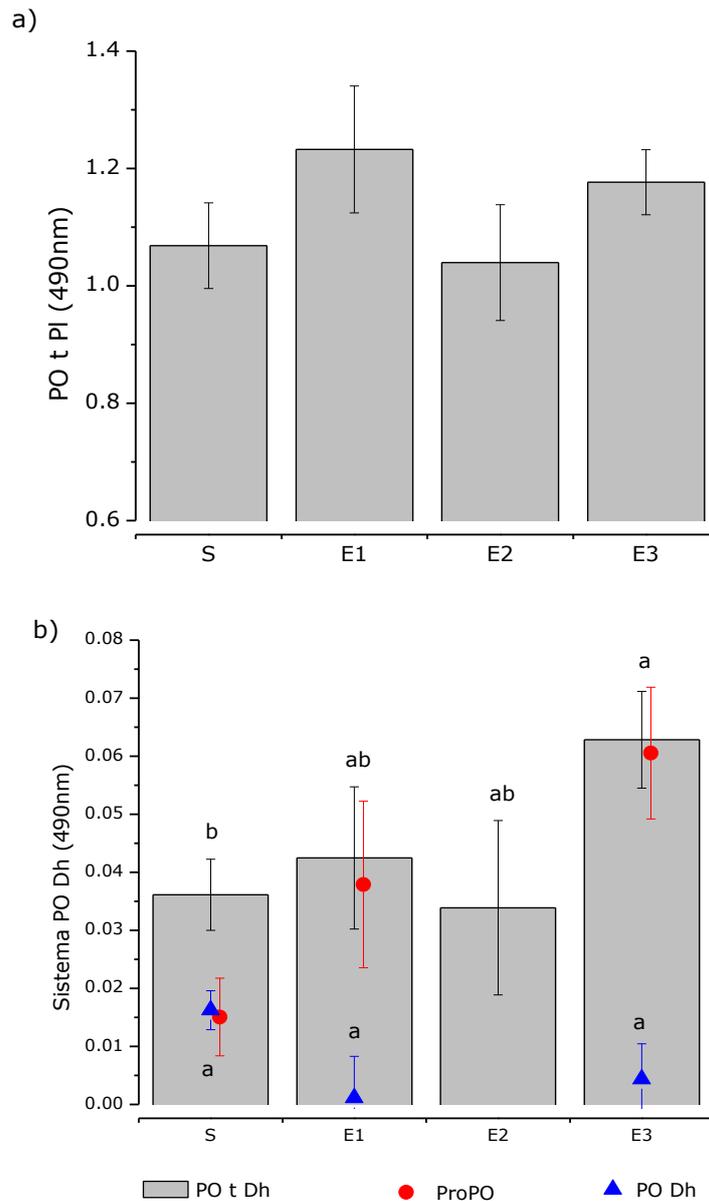


Fig. 7 Actividad de la fenoloxidasa (media \pm error estándar) de juveniles de langosta *Panulirus argus* infectados naturalmente con PaV1. a) fenoloxidasa total en la fracción plasmática, b) fenoloxidasa total, fenoloxidasa y profenoloxidasa en degranulado. S= Sanas; E1= Ligeramente infectadas; E2= Moderadamente infectadas y E3= Fuertemente infectadas. Las letras diferentes denotan diferencias significativas $p < 0.05$. (n; S=11-23; E1=5-5; E2=6-0; E3=19-7 para plasma y degranulado respectivamente)

La actividad de la fenoloxidasa fue medida en los dos compartimentos de la hemolinfa, la parte plasmática, así como en la parte celular en el degranulado de los hemocitos previamente obtenido. Perdomo-Morales *et al.*, en el 2007 reportaron que la actividad de esta enzima en *Panulirus argus* se encuentra presente en ambos compartimentos. Podemos observar que en el degranulado se midió tanto la

profenoloxidasa (ProPO), como la fenoloxidasa (PO) que se encontraba activa en el momento de la evaluación así como la fenoloxidasa total (POt), o sea una vez que toda la pro-fenoloxidasa ha sido activada, esto en presencia de tripsina, mientras en plasma sólo se midió la fenoloxidasa total (Fig. 7a).

Observamos que tanto en plasma, donde hay mayor actividad de esta enzima, como en el degranulado la actividad total de esta enzima, se comporta de manera similar, su actividad se incrementa al ser infectada (E1), así como en la etapa final de la enfermedad, siendo en el degranulado donde esta respuesta se encuentra significativamente elevada.

En el exploramiento de la actividad de esta enzima en el degranulado, podemos observar que cuando las langostas están sanas la concentración de enzima activada (PO) y sin activar (ProPO) son parecidas, sin embargo al estar presente el virus, dicha enzima se encuentra inactiva casi en su totalidad, a lo largo de la infección, mientras que su forma inactiva aumenta significativamente conforme progresa la infección (Fig. 7b), pero solo la presencia exógena de tripsina es capaz de activarla.

1.2.3. Estallido Respiratorio

Debido a la falta de muestra en la realización de este análisis, el estallido respiratorio solo se midió en langostas sanas y fuertemente infectadas, los resultados mostraron diferencias significativas con respecto a la condición que presentaban las langostas, en su actividad basal y en las que habían sido activadas por zymosan, ambas presentan el mismo comportamiento, donde la disminución de esta respuesta es evidente en ambos casos (Fig. 8).

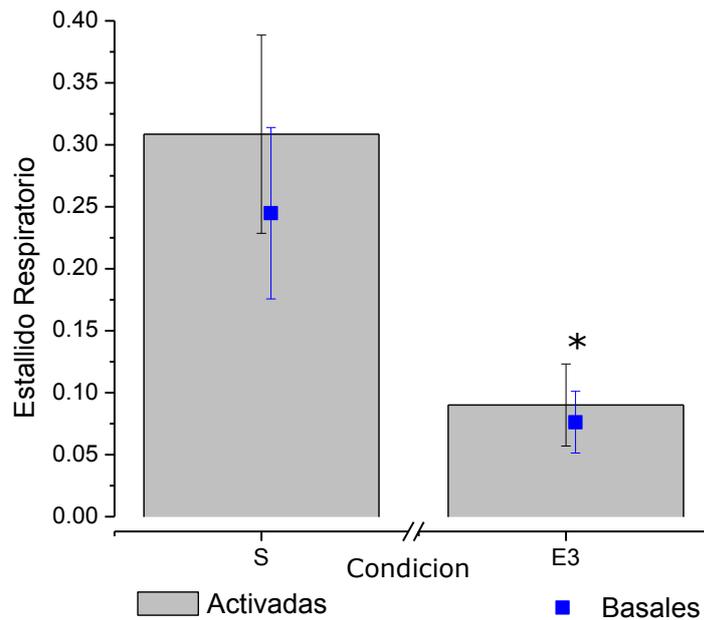


Fig. 8 Producción intracelular del anión superóxido de los hemocitos usando la reducción de NBT, actividad basal y activada por una levadura (media \pm error estándar) de juveniles de langosta *Panulirus argus* infectados naturalmente con PaV1 capturados en el Parque natural Arrecife Puerto Morelos. S= Sanas; y E3= Fuertemente infectadas. Las letras diferentes denotan diferencias significativas $p < 0.05$. (n; S=12, E3=11)

2. Estado nutricional

A. Condición Nutricional

2.5. Metabolitos plasmáticos

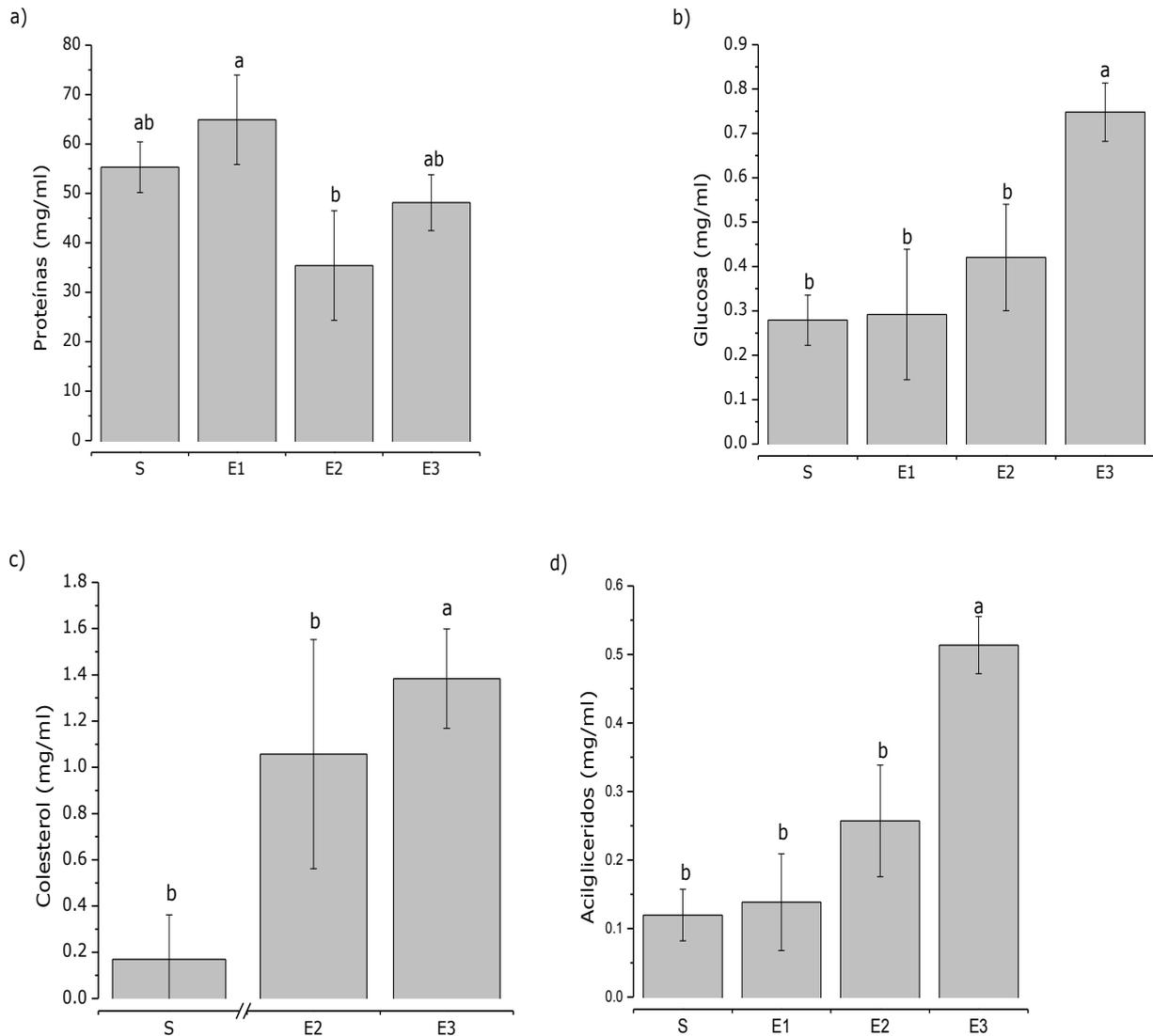


Fig. 9 Concentraciones de metabolitos en mg/ml (media \pm error estándar) en plasma de juveniles de langosta *Panulirus argus* infectados naturalmente con PaV1 capturados en el Parque natural Arrecife puerto Morelos. Según su grado de infección. a) Proteínas totales, b) Glucosa, c) Colesterol, d) Colesterol. S= Sanas; E1= Ligeramente infectadas; E2= Moderadamente infectadas y E3= Fuertemente infectadas. Las letras diferentes denotan diferencias significativas $p < 0.05$. (n; S=19-28; E1=3-9; E2=3-6; E3=16-23)

La concentración de proteínas totales analizadas muestra diferencias por la condición de salud que presentan, las langostas infectadas (E1) son significativamente

mayores a las moderadamente enfermas ($P < 0.05$), quienes no guardan ninguna diferencia con ninguno de las otras condiciones ($P > 0.05$; Fig. 9a)

La concentración de glucosa, colesterol y acilglicéridos (Fig.9b,c,d) en la hemolinfa no fueron afectados de forma significativa por la severidad de la infección, a excepción de las langostas mas infectadas (E3) ($P < 0.05$).

B. Capacidad Digestiva

2.1 Estandarización de las técnicas de actividad enzimática de la glándula digestiva (pH, temperatura, concentración de la enzima y concentración de sustrato).

Se realizaron evaluaciones en el hepatopáncreas de una langosta sana, con el fin de encontrar el mejor método de preservación de las muestras, se verificó que la concentración de metabolitos y enzimas al ser congelados no muestran una diferencia significativa con respecto al tiempo de preservación, siendo que la liofilización si presento diferencias significativas, para más detalle ver Anexo 1.

2.1 Determinación de pH, temperatura y concentración de sustrato óptimo.

Se determinó para cada enzima la temperatura, pH y concentración de sustrato óptimos. Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 2 (Ver Anexo 1).

Tabla 2 Temperatura y pH óptimo para cada una de las enzimas.

	Temperatura	pH	[Sustrato]
Tripsina	60°C	8	150 mM
Quimotripsina	50°C	7	100 mM
Amilasa	60°C	5	120 mM
Glucosidasa	60°C	6	1.5 %

3. Análisis de la condición fisiológica de los juveniles *Panulirus argus* infectados naturalmente con PaV1, en dos poblaciones.

3.1 Análisis multivariado

Para las langostas que fueron capturadas en Puerto Morelos y en Bahía de la Ascensión, a través de la caracterización bioquímica de la glándula digestiva (metabolitos, actividad enzimática digestiva y reservas energéticas) se comparó el efecto de la infección del virus PaV1 sobre la condición fisiológica de los organismos usando el análisis de funciones empíricas ortogonales. En la figura 9 se observa que el patrón de la variabilidad que presenta las parámetros de la glándula digestiva en el grupo de sanas de ambas localidades es muy similar, con lo que podemos deducir que las enzimas digestivas y los metabolitos poseen una similitud en su relación o uso, sin embargo, las magnitudes de sus desviaciones, nos hablan de las diferencias que posee una población con respecto a la otra, muy marcadamente podemos observar que la tripsina y quimotripsina en el caso de Puerto Morelos (Fig. 10a) se encuentran con valores menores a uno, indicándonos que la dispersión de nuestros datos está en su mayoría por debajo de la media, mientras los de Bahía de la Ascensión poseen una variación menor como grupo, donde todos están cercanos a la media. Los metabolitos presentaron un patrón de variabilidad muy similar, podemos observar que tanto las proteínas, como la glucosa, colesterol y acilglicéridos poseen una dispersión que se encuentran por arriba de la media del grupo.

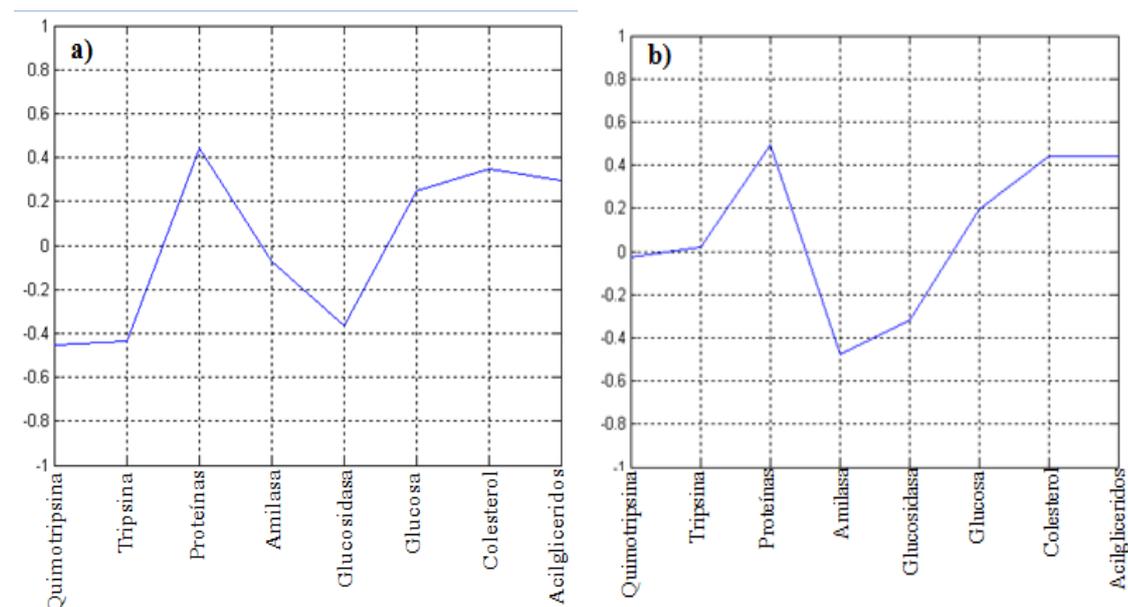


Fig. 10 Patrón de variabilidad obtenidas por EOF. Enzimas y metabolitos medidos en glándula digestiva de juveniles de langostas sanas en dos localidades a) Puerto Morelos y b) Bahía de la Ascensión. Las cuales representan el 53 y 49% de las variaciones de los datos para dichas poblaciones respectivamente.

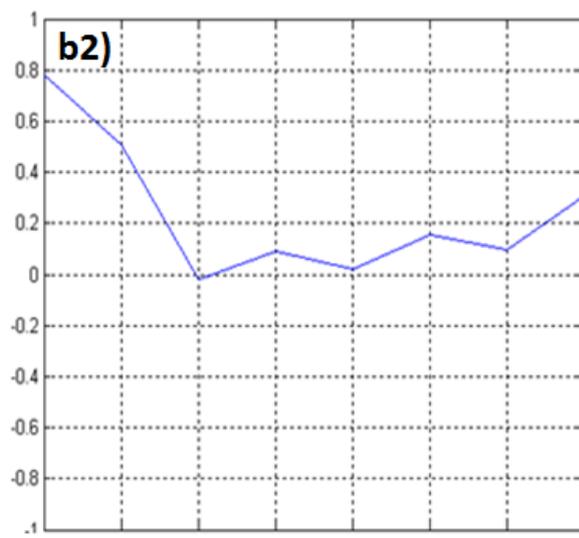
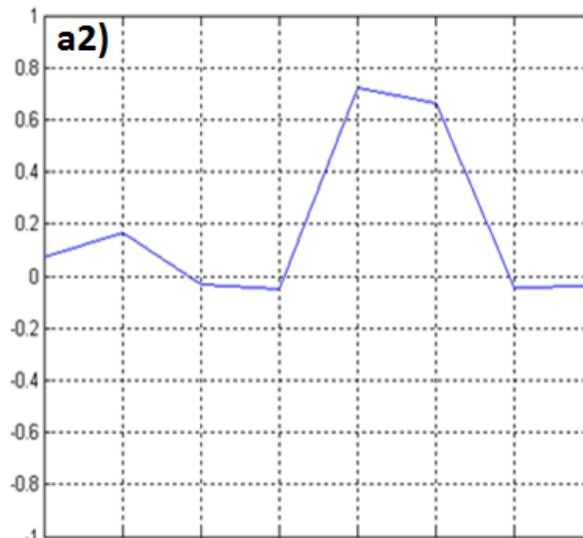
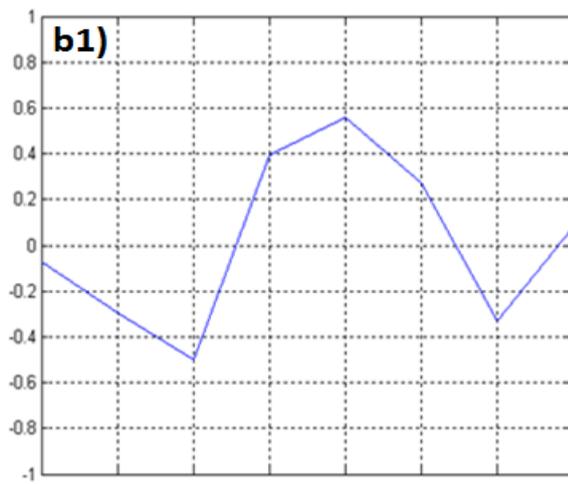
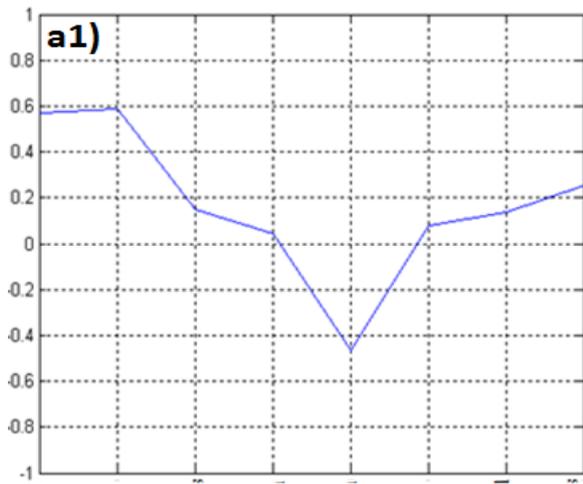
Una vez obtenida la variabilidad presente en las langostas sanas y conociendo el comportamiento de las variables, comparamos la variación que presentan las langostas una vez infectadas o enfermas. Las gráficas mostradas en la figura 10 muestran el cambio que presenta cada variable ante los diferentes niveles de la infección, es evidente que en las langostas infectadas y moderadamente enfermas el comportamiento de las variables es muy distinto según la población a la que pertenecen.

Las langostas en su condición de infectadas poseen un claro cambio en casi todas sus variables, siendo los acilglicéridos los únicos que presentan cambios muy pequeños en la variación de su respuesta en ambas poblaciones, en Bahía de la Ascensión esta variabilidad disminuye acercándose a la media del grupo. La actividad de las enzimas proteolíticas de las langostas capturadas en Puerto Morelos muestra un gran cambio de su varianza, donde ésta es notablemente elevada, mientras que en las langostas de Bahía de la Ascensión dicho cambio es al contrario, poniendo la dispersión de los datos por debajo de la media del grupo, esta situación es reflejada por el comportamiento similar en las proteínas de esta localidad. Sin embargo, este no es el caso de las carbohidrasas en las langostas de Puerto Morelos, el comportamiento de estas enzimas prácticamente no se ve alterado en langostas infectadas, mientras que en Bahía de la Ascensión, su dispersión se encuentra por debajo de la media, situación totalmente contraria a la presentada en la condición E1 donde está muy por encima de la media.

Cuando observamos langostas moderadamente enfermas (Fig. 11 a2, b2) la respuesta de proteínas, amilasa y colesterol no presentan diferencias de una población a otra, estas variables poseen una desviación pequeña y muy cercana a su media, en cambio la desviación de la tripsina en Bahía de la Ascensión así como la glucosidasa y glucosa en Puerto Morelos se ve notablemente aumentada. En el nivel final de la enfermedad (Fig. 11 a3, b3) los patrones de variación vuelven a compartir características; las proteasas, proteínas y glucosa comparten su patrón de variación en ambas localidades, mientras el colesterol y la glucosidasa varían notablemente de una localidad a otra.

Todo lo anterior conduce a establecer que el comportamiento de las variables medidas en las langostas sanas de ambas localidades poseen un acomodo parecido,

pero las diferencias que presentan en sus magnitudes nos refleja las diferencias asociadas con la localidad, lo cual a su vez, repercute en su respuesta ante la infección con PaV1, ya que dependiendo de su condición inicial, su respuesta a lo largo de la infección es notablemente diferente (E1, E2). Al llegar a la condición más avanzada de la enfermedad, E3 el desgaste del organismo lleva a que su estado final sea muy parecido sin importar su condición inicial y/o la población a la que pertenecen.



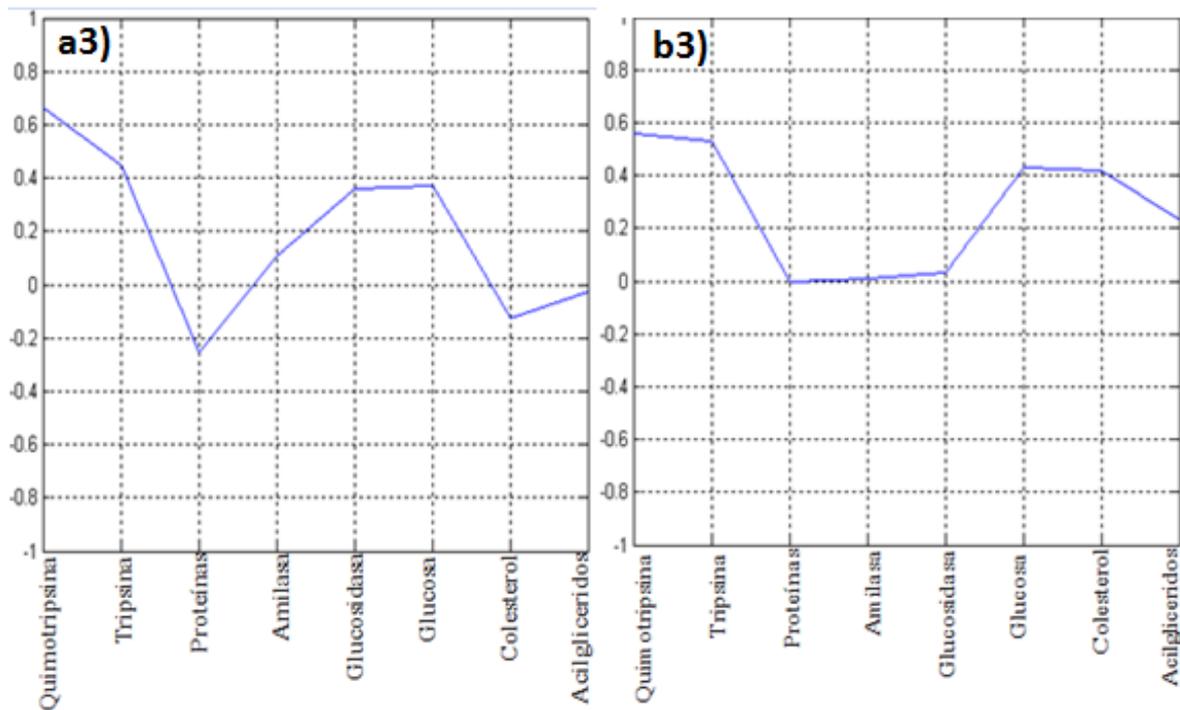


Fig. 11 Patrón de variabilidad obtenidas por EOF. Enzimas y metabolitos medidos en glándula digestiva de juveniles de langostas infectadas (E1), moderadamente enfermas (E2) y fuertemente enfermas (E3) en dos poblaciones Puerto Morelos (a1; a2 y a3 respectivamente) y Bahía de la Ascensión (b1; b2 y b3 respectivamente).

3.2 Evaluaciones de enzimas y metabolitos

Con el fin de comprender mejor el comportamiento y las diferencias entre las poblaciones que denota el análisis de EOF, se realizó análisis de ANOVA de dos vías, donde los factores fueron la condición de salud y la localidad a la que pertenecen.

En la Fig. 12a se observa la actividad específica de la quimotripsina y la glucosidasa en las langostas de ambas localidades. Las langostas de Puerto Morelos poseen una actividad específica notablemente superior a la de las langostas de Bahía de la Ascensión. En el caso de la quimotripsina los cambios en la actividad no fueron significativos, y se observa que la actividad específica es casi 5 veces mayor en el grupo de las langostas sanas, diferencia que va en decremento conforme avanza la enfermedad, y en las langostas enfermas nivel 3 se observan valores similares con el grupo de langostas de Bahía de la Ascensión cuyos valores se mantienen relativamente constantes entre los grupos con diferente nivel de infección. En la actividad de la glucosidasa (Fig. 12b), si encontramos diferencias significativas tanto por la localidad como por la condición de salud, las langostas sanas de Puerto Morelos poseen una actividad específica dos veces mayor a la de Bahía de la

Ascensión, esta actividad enzimática va en decremento en cada una de las localidades conforme avanza la enfermedad.

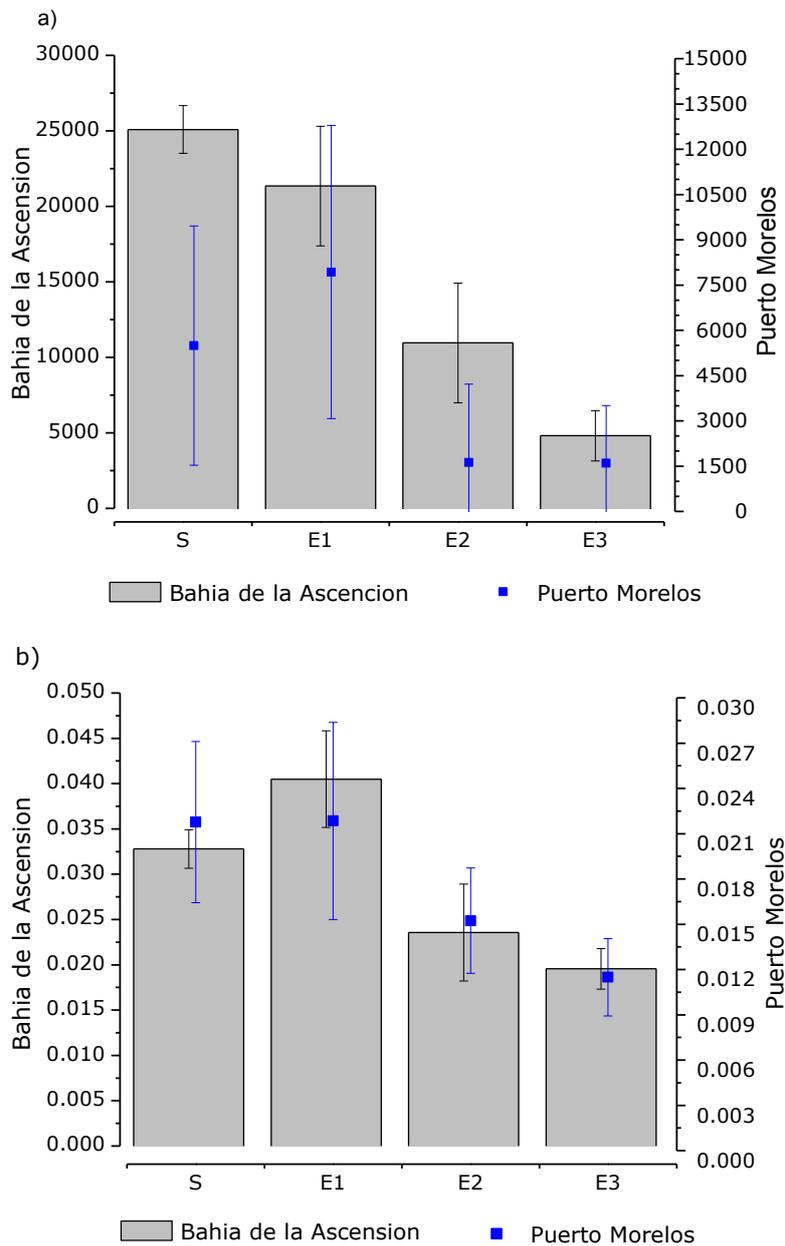


Fig. 12 Actividad específica de a) Quimotripsina y b) Glucosidasa en hepatopáncreas de juveniles de langosta *Panulirus argus* de langostas sanas, infectadas y enfermas, en dos poblaciones, Puerto Morelos y Bahía de la Ascensión. Se muestran medias \pm error estándar. Las letras diferentes denotan diferencias significativas en la ANOVA de dos vías, $p < 0.05$.

Las concentraciones de lípidos solubles en el hepatopáncreas fueron también medidos en ambas poblaciones de langostas, estos metabolitos al igual que las enzimas digestivas muestran diferencias significativas, por su condición de salud, por su localidad y por la interacción entre éstas. Ambos metabolitos se encuentran en

concentraciones significativamente más altas en langostas sanas de Bahía de la Ascensión e incluso en langostas infectadas; tanto en colesterol como en acilglicéridos, el progreso de la enfermedad afecta la concentración de estos metabolitos, disminuyendo significativamente con respecto de las sanas para casi todos los estados de la enfermedad pero solo para Bahía de la Ascensión, por otro lado las langostas de Puerto Morelos poseen tan poca concentración de dichos metabolitos, que el progreso de la enfermedad ya no genera ninguna disminución notable de éstos en el hepatopáncreas.

3.2.3. Reservas energéticas en hepatopáncreas y músculo

Una de las principales limitantes en la realización de todas las mediciones de este trabajo fue el hecho de que al trabajar con organismos juveniles muchas veces las muestras obtenidas del hepatopáncreas eran muy pequeñas y ya que tanto el diagnóstico molecular por PCR como el análisis histológico no podían ser descartados, se decidió priorizar el uso de la muestra para estas pruebas así como para la medición de metabolitos y enzimas digestivas, por ello en la cuantificación del glucógeno y lípidos totales no se contó con el mismo número de muestras que para otras evaluaciones, siendo que en lípidos una de las condiciones no se encuentra representada, estas diferencias limitó la inserción de estas variables en el análisis multivariado, por lo que se presenta el resultado de la ANOVA de dos vías en el caso de las evaluaciones en hepatopáncreas, mientras que para el músculo solo se contó con muestra de una sola población, por lo cual solo se realizó una ANOVA de una vía con la condición como único factor.

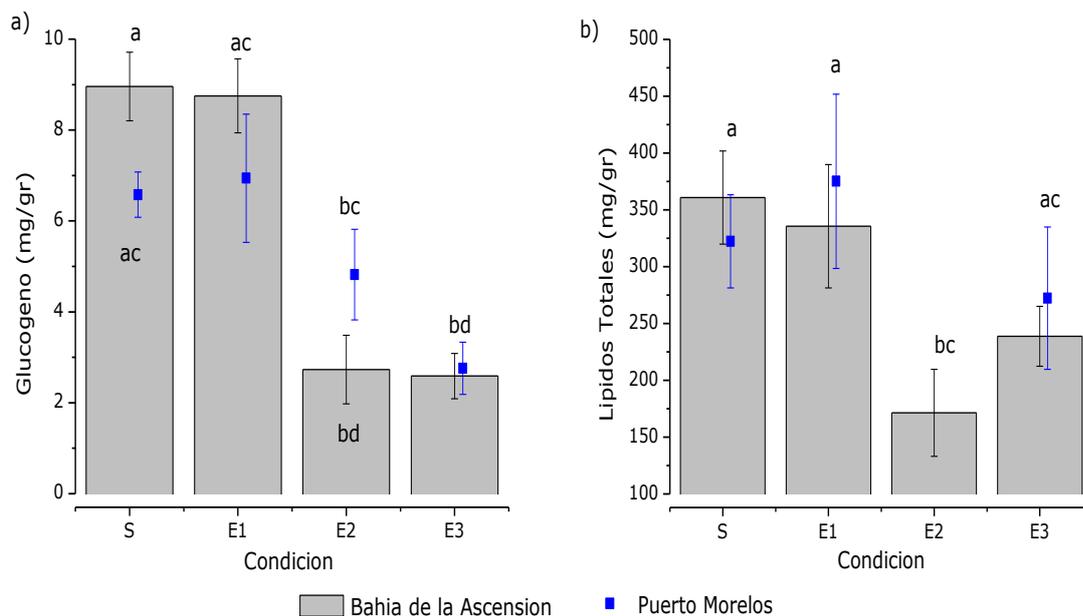


Fig. 13 Concentración de a) Glucógeno y b) Lípidos totales (mg/gr) en hepatopáncreas de juveniles de langosta *Panulirus argus* de langostas sanas, infectadas y enfermas, en dos poblaciones, Puerto Morelos y Bahía de la Ascension. Se muestran medias \pm error estándar. Las letras diferentes denotan diferencias significativas en la ANOVA de dos vías, $p < 0.05$.

La cuantificación de las reservas energéticas en el hepatopáncreas muestra una diferencia significativa entre localidades y por su condición, en el caso del glucógeno, Bahía de la Ascension presenta concentraciones casi 50% mayores que Puerto Morelos, las langostas sanas y las langostas infectadas no muestran diferencias entre ellas para ninguna de las poblaciones, pero las concentraciones se ven significativamente disminuidas cuando las langostas están moderadamente enfermas en Bahía de la Ascension y hasta su último nivel para los organismos de Puerto Morelos. En el caso de los lípidos solo son significativas las diferencias según su condición, para Bahía de la Ascension la disminución más evidente se da en las langostas en E2. En el caso de Puerto Morelos no contamos con muestras que estuvieran en este grupo (E2).

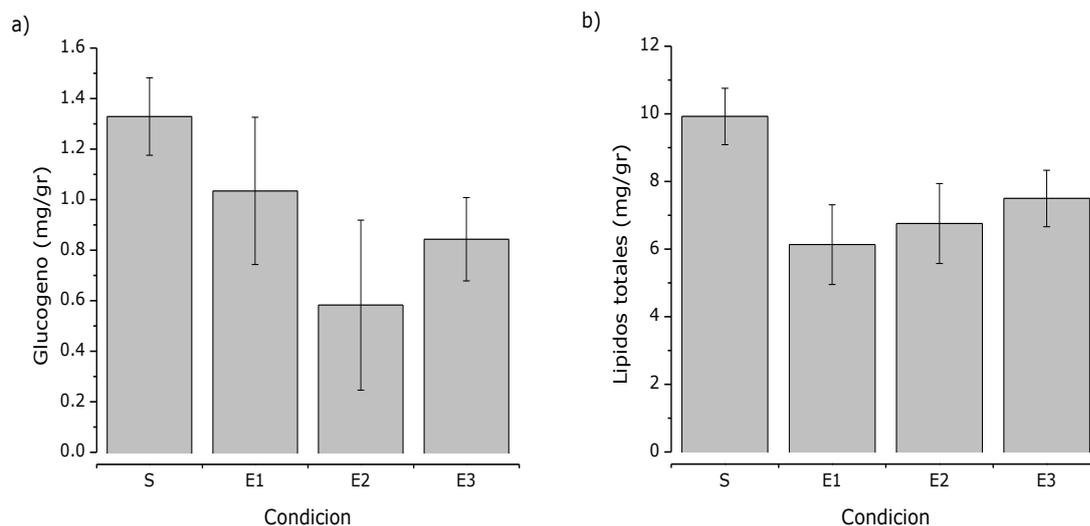


Fig. 14 Concentración de a) Glucógeno y b) Lípidos totales (mg/gr) en músculo de juveniles de langosta *Panulirus argus* de langostas sanas, infectadas y enfermas de Puerto Morelos. Se muestran medias \pm error estándar. No existen diferencias significativas en la ANOVA de una vía, $p < 0.05$.

En el caso de las evaluaciones en el músculo de la langosta, todos los niveles de infección los tenemos representados pero sólo contamos con muestras para una de las dos localidades. Tanto las concentraciones de glucógeno como de lípidos se ven afectadas por la infección de PaV1, en el glucógeno dicha disminución es gradual conforme avanza la enfermedad, mientras que en lípidos el decaimiento de esta reserva se observa en langostas en E1 con una concentración 50% menor que las sanas, sin embargo las amplias dispersiones de nuestros datos no nos permiten observar ninguna diferencia estadística (Fig. 14).

DISCUSIÓN

Este trabajo presenta un panorama más completo para el estudio de la infección por PaV1 en juveniles de langosta *Panulirus argus*, es el primer trabajo en presentar una caracterización fisiológica e inmunológica a lo largo del desarrollo de la enfermedad causada por este virus, debido a ello se realizaron una serie de adaptaciones metodológicas específicas para *Panulirus argus*, que servirán para estudios posteriores en esta especie.

En este trabajo se utilizaron evaluaciones en hemolinfa, tanto en plasma como en degranulado de hemocitos para tratar de entender la respuesta del sistema inmunológico de los juveniles de langosta ante la infección por PaV1. La evaluación de la condición inmunológica de *P. argus* reportada ante este virus se han limitado a la valoración de daño causado por este virus a los hemocitos circulatorios. El conteo total y diferencial de hemocitos que se realizó en el presente trabajo mostró una disminución progresiva de los hemocitos totales, así como de los hialinocitos y semigranulocitos (ver Fig 5a). Los resultados concuerdan con lo reportado por Li *et al.* en el 2007 quienes desarrollaron el cultivo primario de hemocitos para el análisis *in vitro* de la infección por *P. argus* virus 1 (PaV1); estos autores reportaron la susceptibilidad de los hialinocitos y semigranulocitos dentro de las primeras horas de exposición al virus, la rápida infección y mortalidad de los hemocitos resultó sumamente interesante dado que en los organismos la infección tarda entre 30 y 80 días antes de mostrar síntomas. Sin embargo, ellos no pudieron realizar un estudio cuantitativo del virus, además de no poder seguir en el tiempo el cultivo de los hemocitos ya que los hemocitos de su cultivo no entraron en mitosis.

Cabe mencionar que los resultados obtenidos *in vitro* no incluyeron la dinámica dentro del huésped, ya que las pruebas *in vitro* están limitadas en cuanto a la interacción de elemento inmunológicos y fisiológicos que pudieran participar en la respuesta compensatoria de diversos tejidos, como el tejido hematopoyético, la glándula digestiva, la hemocianina, entre otros. En este trabajo se observó que la concentración de las células granulares no disminuyeron, y en los estados avanzados de la infección se presentan niveles más altos que el de langostas sanas y aquellas con infección inicial, lo cual indica un mecanismo compensatorio que permite un aumento del 40%. Una respuesta similar ha sido observada en infecciones virales

con WSSV en langostinos de agua dulce, *Pacifastacus leniusculus*, que demuestran una mayor susceptibilidad de células semigranulares ante este virus, mientras que las células granulares aumentan su concentración y su proporción total ante este virus, sin embargo los mecanismos de este fenómeno no han sido dilucidados (Jiravanichpaisal, *et al.*, 2006). Considerando que las células circulatorias presentan una vida media, y que en camarón esto ha sido estimado en periodos de 10 a 15 días siguiendo la concentración total en la hemolinfa (Pascual, 2000), el aumento de un subtipo celular puede señalar mecanismos de proliferación celular específica, asociada a una repuesta de defensa compensatoria. En crustáceos este tipo de mecanismo ha sido poco estudiado, y la infección por PaV1 representa una importante oportunidad para profundizar en ellos y para vincular la concentración específica de los hemocitos con otros elementos del sistema inmunológico como el sistema fenoxidasa o moléculas de reconocimiento como las lectinas.

Uno de los síntomas más importantes de esta infección es que la hemolinfa de langostas infectadas con PaV1 no coagula (Shield *et al.*, 2004; Montgomery-Fullerton *et al.*, 2007; Lozano-Álvarez *et al.*, 2008; Briones-Fourzán *et al.*, 2009; Huchin-Mian *et al.*, 2009). Tomando en cuenta lo reportado por Aono y Mori (1996) quienes describen la secuencia de la coagulación en la langosta espinosa *Panulirus japonicus* donde: primero, el plasma induce la citólisis en células hialinas y semigranulares (H/SG) segundo, la enzima de la coagulación la transglutaminasa, cuya actividad fue encontrada en hemocitos, y cuya actividad en células H/SG es cuatro veces mayor que en células granulares, es liberada con la lisis de estos hemocitos y por último, la enzima cataliza la gelificación del plasma. La disminución de estos subtipos celulares disminuye significativa en cuanto se incrementa el grado de severidad disminuyendo la reacción en cascada necesaria para el proceso de coagulación. Paralelamente la infección por PaV1 afecta los tejidos donde ha sido reportado la enzima de coagulación, en camarones ha sido reportada en la epidermis cuticular y en el corazón, órganos que también son afectados por la infección de PaV1 (Shield and Beringer 2004, Li *et al.* 2008). El daño en el tejido de síntesis y en los hemocitos que degranulan la enzima que desencadena la reacción explican la anulación de una mecanismo de vital importancia en los animales ya que evita desangrarse ante una lesión y también atrapa a material extraño que se introduce con el agua de mar. La falta de coagulación posiblemente demarca un grado de severidad que puede resultar irreversible durante el proceso infeccioso por PaV1.

Una de las propiedades fundamentales de la respuesta inmune es el reconocimiento de lo propio y lo extraño. Se sabe que las lectinas de crustáceos reconocen de manera específica y se unen a carbohidratos, un componente importante de la superficie de las bacterias Gram-negativas, e inducen aglutinación (Carnick and Stewart, 1978). Las lectinas con especificidad a los ácidos siálicos han sido considerados moléculas potencialmente implicadas en el reconocimiento inmunológico y fagocitosis a través de la opsonización, también se ha postulado que las hemaglutininas o lectinas de invertebrados pueden representar moléculas como anticuerpos primitivos o precursores que finalmente dieron lugar a las inmunoglobulinas de vertebrados; sin embargo, no hay suficientes estudios para corroborar esta hipótesis (Marques and Barraco, 2000; País et al., 2007).

Los resultados obtenidos en este trabajo mostraron una diferencia significativa de la actividad hemaglutinante respecto a la condición que presentan los organismos sanos. Las langostas infectadas (enfermas nivel 1) poseen una actividad hemaglutinante significativamente elevada; sin embargo, esa respuesta decae conforme progresa la enfermedad (Fig. 5, 15), lo que podría estar relacionada con la disminución en la concentración de hemocitos, no solo por la interacción entre estos elementos en la respuesta inmune sino también porque a pesar de que la síntesis de las lectinas en la hemolinfa no está totalmente determinada, se han identificado a la membrana de los hemocitos, así como en gránulos citoplasmáticos y/o hepatopáncreas como las fuentes potenciales de hemaglutininas (País et al., 2007), siendo estos mismos órganos los principalmente dañados por la infección con PaV1.

En la inmunidad humoral de los crustáceos, la activación del sistema pro-fenoloxidasa ha sido considerado como un componente inmune involucrado tanto en el reconocimiento de lo propio y lo extraño como en la destrucción de patógenos. La activación de este sistema pueda darse por componentes microbianos como los lipopolisacáridos (LPS), por β -glucanos o peptidoglicanos, provocando la exocitosis de las células granulares y la formación de fenoloxidasa, enzima que inicia la melanización (Hernández-López, et al., 2003). La medición de esta enzima ha sido ampliamente utilizada en crustáceos para la evaluación del efecto del alimento o inmunoaditivos en la dietas y en condiciones de inanición (Pascual et al. 2006), ante

condiciones ambientales adversas como contaminantes químicos (Le Moullac and Haffner, 2000), o por estrés ante el transporte de organismos vivos (Gomez-Jimenez *et al.* 2000) y por supuesto ante infecciones bacterianas en langostas o virales como WSSV en camarones (Battison *et al.* 2003; Shinn-Pyng *et al.* 2009) por lo que la medición de esta enzima es muy importante para conocer la respuesta de la langosta ante la infección de PaV1.

Hernández-López *et al.*, en el 2003 reportaron que la mayor parte de la actividad de la profenoloxidasa de *Panulirus interruptus* se encuentra en el plasma y Perdomo-Morales *et al.*, en el 2007 reporta la presencia de esta enzima en los hemocitos, en donde también se encuentra tanto la enzima activadora de la profenoloxidasa, como un inhibidor. Lo cual concuerda con lo encontrado en este trabajo, donde se reporta una mayor actividad de esta enzima en el plasma que en el degranulado de hemocitos. Sin embargo los resultados de este trabajo en el degranulado ponen en evidencia que a pesar de que la fenoloxidasa total se mantiene elevada, la activación de esta no se está llevando a cabo (Fig. 7b), se sabe que la cascada de activación del sistema profenoloxidasa es un sistema altamente regulado y que a menudo diversos patógenos son capaces de suprimir la melanización en su hospedero por diversos mecanismos moleculares, como por ejemplo el bracovirus de *Microplitis demolitos* (MdBV) produce una proteína con similitudes a los inhibidores tipo tripsina que inhibe la cascada de la fenoloxidasa, inhibiendo proteinasas activadoras de profenoloxidasa (Beck and Strand, 2007).

El sistema inmunológico también posee otros factores celulares participantes de la respuesta inmune para remover o eliminar partículas extrañas, que están asociados a la activación del sistema de la profenoloxidasa, ya que este funciona como amplificador de la respuesta inmune y mediador de la comunicación celular, en realidad existe una superposición entre la defensa humoral y celular, ya que muchos factores humorales afectan la función de hemocitos y estos son una importante fuente de moléculas de la respuesta humoral (Jiravanichpaisal *et al.*, 2006; Cerenius *et al.*, 2008). La fagocitosis es uno de los principales mecanismos celulares, dicha respuesta ha sido reportado desde hace muchos años para langostas *in vivo* e *in vitro* en células del corazón y hepatopáncreas (Paterson *et al.*, 1976).

En el presente trabajo para evaluar la actividad fagocítica de las células, se utilizó un método indirecto de la capacidad fagocítica a través de la producción intracelular del anión superóxido de los hemocitos, cuantificando la reducción de NBT a formazán. La disminución del estallido respiratorio en otros crustáceos como el camarón *Litopenaeus vannamei* ha sido relacionada a factores como el nutricional. Organismos con dietas bajas en su contenido proteico y/ o periodos de ayuno prolongado, muestran una reducción significativa del estallido respiratorio en su actividad basal y activada (Pascual *et al.*, 2006), esta respuesta no es observada ante un estrés ambiental como la hipoxia por ejemplo, en *Panaeus stylirostris* sólo encontraron una disminución del 7% del estallido respiratorio, correlacionado a la disminución del 10% en la concentración total de hemocitos (Le Moullac and Haffner, 2000). Sin embargo, ante infecciones como el síndrome de la mancha blanca y el virus de necrosis hematopoyético, *Litopenaeus vannamei* presenta un aumento de secreción de radicales de oxígeno, en relación a la concentración total de hemocitos (Yeh *et al.*, 2009).

En este trabajo encontramos que el estallido respiratorio disminuye significativamente en langostas fuertemente infectadas (Fig. 8), muy probablemente debido a la afectación que sufren los hemocitos por este virus, o bien este factor puede estar aunado a la baja condición nutricional que presentan estos organismos cuando llegan a este nivel más avanzado de la infección.

Las primeras etapas de la infección ponen de manifiesto la activación de la respuesta inmune, hay un incremento de la actividad hemaglutinante, un aumento en la producción de la profenoloxidasa en los hemocitos, un mantenimiento de la actividad de esta enzima en el plasma, todo ello a pesar de la disminución de las células en la hemolinfa, lo que podría implicar una posible resistencia del organismo ante la infección con PaV1 (Fig. 15 flecha amarilla), Mathew and Maxwell en el 2007 reportan la presencia de PaV1 en langostas cultivadas, en este trabajo muchas langostas fueron confinadas con langostas infectadas por más de un año sin presentar los síntomas visibles de la infección por PaV1, y a demás sobrevivieron los 4 años que duro el proyecto, este reporte indica la posibilidad de que las langostas pueden presentar un tipo de inmunidad a la infección por PaV1. Posiblemente los mecanismos celulares y humorales observados en las langostas con una infección ligera en el presente estudio indican una compensación de parte del

hospedero reflejando la plasticidad inmunológica de los juveniles de *Panulirus argus*. No obstante, se requiere de experimentos del seguimiento de la infección y de la respuesta ante el virus en experimentos controlados para contestar si la activación de diversos componentes del sistema inmunológico pudieran conducir a arrestar la infección viral como se observa en *Macrobrachium rosenbergii* al ser infectado con el virus de la mancha blanca. Sahul-Hameed *et al.* (2000), utilizaron 3 tipos infección, por inmersión, vía oral e intramuscular, sin embargo *M. rosenbergii* no mostró síntomas clínicos ni mortalidad ante el virus.

Otro enfoque del estudio de la afectación que sufre la langosta ante la infección por PaV1 es el estudio de la condición nutricional, la cual también está estrechamente ligada a la condición inmunológica de los organismos. Por ejemplo en el cultivo de camarones se han modificado las dietas, precisando en los niveles de vitaminas, lípidos, carbohidratos, minerales, pigmentos y se han incluido diversos tipos de aditivos (β glucanos, macroalgas, antibióticos, etc.) en un intento por mejorar el estado nutricional de los camarones y así aumentar la tolerancia a las enfermedades (Rodríguez and LeMoullac, 2000) ya que se han observado disminuciones de la respuesta inmune ante dietas pobres en proteínas en camarones (Pascual *et al.*, 2006), vitaminas D, E, ácido ascórbico y pantoténico, etc. (Fenucci y Fernández-Jiménez, 2004).

Existe una estrecha relación entre la condición nutricional y la capacidad inmunológica, bajo esta perspectiva en el presente estudio se evaluó la capacidad digestiva y la condición nutricional de los juveniles de *Panulirus argus*. El estado nutricional fue evaluado a través de la actividad enzimática y de la concentración de los metabolitos en el plasma y la glándula digestiva. Se analizaron juveniles sanos y con diversos grados de la infección por PaV1, los juveniles fueron obtenidos de dos localidades del Caribe mexicano; Bahía de la Ascensión y Puerto Morelos. Los organismos sanos de Bahía de la Ascensión contenían concentraciones significativamente mayores de metabolitos lipídicos así como de proteínas en el hepatopáncreas en comparación a organismos sanos de Puerto Morelos. Trabajos realizados en camarones mencionan que la calidad proteica contenida en las dietas, está estrechamente relacionada con la actividad de las enzimas proteolíticas digestivas, así como en el aprovechamiento de los insumos del alimento, Kumlu y Jones (1995) señalan que una dieta de mala calidad puede generar una alta

actividad enzimática lo cual refleja un mayor esfuerzo digestivo para compensar la insuficiencias nutrimentales de las dietas, los resultados de este estudio concuerdan con esta hipótesis, los juveniles de langosta de Puerto Morelos poseen concentraciones menores de colesterol y acilglicéridos en el hepatopáncreas así como de proteínas. Estos resultados comparados con la actividad enzimática, conducen a pensar que la elevada actividad enzimática de las proteasas tripsina y quimotripsina, así como de la glucosidasa en organismos sanos de Puerto Morelos responden un mayor esfuerzo digestivo posiblemente relacionado con una condición nutricional más baja que la observada en los juveniles de Bahía de la Ascensión.

Sin embargo, no se evaluó el contenido estomacal, y por ello no es posible aseverar que las diferencias en la actividad digestiva y los metabolitos del hepatopancreas entre los juveniles sanos de las dos localidades obedecen a una alimentación deficiente o a otros factores que pudieran afectar la conducta de alimentación, los procesos digestivos o una inversión diferenciada de la energía metabólicamente útil para compensar alguna condición ambiental. Estudios realizados sobre la alimentación de esta especie en Puerto Morelos, en base a sus contenidos estomacales, muestran que *P. argus* posee una preferencia a alimentarse de crustáceos y moluscos, y en eventos ocasionales lo hace también de algas coralinas, esponjas y equinodermos (Colinas-Sánchez y Briones-Fourzán, 1990). También se ha reportado para esta misma población que de 1995 a 2005 se observa una disminución en la condición nutricional de los juveniles tempranos y tardíos de langosta, esto a través del uso de índices de la condición nutricional como son el peso relativo de la glándula digestiva (RWDG, por sus siglas en Inglés) y la proporción del peso y longitud del caparazón (peso/LC), siendo el primero de éstos el que presentó diferencias significativas en dicho estudio (Briones-Fourzán *et al.*, 2009), incluso se ha reportado que para *P. argus* la comida usualmente no es una limitante y que la condición nutricional tampoco es dependiente de la densidad (Butler *et al.*, 1997); análisis similares no fueron encontrados para esta especie en las langostas de Bahía de la Ascensión, pero sí se tiene reporte de altas tasas de crecimiento para juveniles de *P. argus* en el Banco Chinchorro (al sureste de Bahía de la Ascensión, en el Caribe mexicano), mayores a las reportadas en para esta especie en otras regiones del Caribe (Ramírez-Estévez *et al.*, 2010), lo cual podría ser una medida indirecta de una buena condición nutricional.

Lo anterior nos lleva a la interrogante de que si las diferencias en los indicadores de la condición nutricional y fisiología digestiva no estuvieran vinculadas con el alimento, entonces que otros factores están vinculados, ciertamente existe una evidente diferencia entre ambas localidades, el crecimiento demográfico. En lo última década Puerto Morelos se ha convertido en una zona de alto impacto turístico, llevando con sigilo a un aumento poblacional, de 1995 al 2000 la población aumentó de 829 a 892 habitantes, sin embargo para el 2005 INEGI reportó una población de 7726 habitantes y para el último censo del 2010 alcanzó los 9188 habitantes y aun que no ha sido reportado, seguramente este cambio demográfico está impactando en la ecología del lugar. Mientras Bahía de la Ascensión sigue siendo un lugar de bajo impacto antropogénico, básicamente un pueblo de pescadores, pero en el cual se desarrolla una pesquería con un alto grado artificiales o "casitas cubanas". Los pescadores reconocen a las langostas con los signos de la infección por PaV1 consistentes con un grado moderado a severo. Actualmente los pescadores conocen de la enfermedad y a las langostas con los signos las sacan y las entierran con el objetivo de evitar la diseminación de la enfermedad. En Puerto Morelos por el contrario, existen pocas concesiones para la pesca de la langosta, y no está organizada por parcelas ni se utilizan las casitas para la pesquería, no obstante, existe un importante desarrollo turístico, en 1980 se tenía registro de 60 habitaciones para el turismo en todo Puerto Morelos, para el 2000 ya existían arriba de las 2000 habitaciones, actualmente existen registradas más de 5500, lo cual pudiera estar generando algún impacto en el arrecife, reflejándose en la condición nutricional de los depredadores topes, como lo es la langosta espinosa del Caribe, *Panulirus argus*.

Aun que aun existen muchos otros parámetros que tomar en cuenta, estudios actuales realizados en diferentes zonas y en diferentes épocas (primavera e invierno) en Bahía de la Ascensión, mostraron diferencias en la prevalencia de esta enfermedad entre zonas de la Bahía en todas las tallas muestreadas, sin embargo no mostraron diferencias con respecto a la temporada de muestreo sugiriendo que la dinámica de esta enfermedad en las poblaciones de langosta está dada mas por factores ambientales u otros factores extrínsecos e intrínsecos propios de cada zona (Huchin-Mian, *et al.* 2011^a y b; Candia-Zulbarán, *et al.* 2011). Lozano-Álvarez *et al.* (2011) sugieren que la tasa de transmisión a través del agua puede ser menor en

hábitats más expuestos a la radiación ultravioleta, la cual puede dañar las partículas virales.

El análisis enzimático del hepatopáncreas en respuesta a la infección por PaV1, mostró una disminución de la actividad enzimática de este órgano ante el progreso de la enfermedad (Fig. 12,15), dicha disminución no es proporcional para ambas localidades, las langostas de Puerto Morelos poseen una actividad enzimática mayor, y su afectación por este virus es mucho más notoria ante el avance de la enfermedad, mientras que en las de Bahía de la Ascensión la disminución de la actividad enzimática se da en menores proporciones, sin embargo, cuando están fuertemente infectadas (E3) ya no muestra diferencias entre las langostas procedentes de las dos localidades poblaciones. Esta respuesta es similar en la disminución de los metabolitos del hepatopáncreas, si bien las proteínas no mostraron una diferencia significativa, la disminución de la glucosa, colesterol y acilglicéridos es evidente ante el progreso de la enfermedad.

Si se compara lo encontrado en el hepatopáncreas y en el plasma de la hemolinfa, podemos encontrar una correlación; Li *et al.*, en el 2008 reportan alteraciones significativas en la glucosa, triglicéridos y fósforo en suero de hemolinfa de langostas sanas e infectadas experimentalmente con PaV1 y en este trabajo se reporta que los lípidos se encuentran elevados en la hemolinfa, la concentración de los acilglicéridos se duplica para los moderadamente infectados y es 4 veces mayor respecto de las sanas para los enfermos nivel 3, estas diferencias son aun más marcadas en el caso del colesterol, donde las enfermas nivel 2 son 6 veces mayores a las sanas, mientras que los organismos en E3 son 8 veces mayores a los sanos, evidenciando el daño tisular generado por la infección; tanto el colesterol como los triglicéridos disminuyen progresivamente en el hepatopáncreas, así como aumentan progresivamente en la hemolinfa. Este incremento de los lípidos en el plasma podría ser la causa de la consistencia lechosa que se observa en organismos enfermos (Fig. 15, flecha morada), langostas enfermas poseen hemolinfa con coloraciones rosadas e incluso anaranjadas posiblemente causadas por astaxantinas y carotenos liberadas que formaban parte de las lipoproteínas y del tejido graso de los crustáceos (Yehezkel *et al.* (2000).

Este mismo comportamiento lo encontramos en las concentraciones de la glucosa que presentan una marcada diferencia, su concentración en el hepatopáncreas disminuye con el avance de la enfermedad por PaV1, mientras en la hemolinfa aumenta. Li *et al.*, (2008) encontraron una disminución de este metabolito en el suero de las langostas enfermas, mientras que en este trabajo se encontró un aumento en la concentración plasmática entre las langostas sanas y las enfermas nivel 3. La evaluación en plasma, en vez de suero evita la interferencia que causa los componentes citoplasmáticos de los hemocitos lisados que se encuentran en el suero, ya que los hemocitos de crustáceos contienen altos niveles de glucosa, aminoácidos y proteínas (Johnston & Spencer, 1972; Dall 1974). El aumento de la glucosa en la hemolinfa se ha visto en otras infecciones virales en crustáceos como en el caso de *Panaeus indicus* en infecciones con WSSV (white spot syndrome virus), por lo general, aumenta el nivel de glucosa en los animales infectados o estresado como un sistema de protección. Los altos niveles de glucosa y los hidratos de carbono en la hemolinfa pueden deberse al transporte de glucosa y carbohidratos del hepatopáncreas y del músculo a la hemolinfa (Yoganandhan *et al.*, 2003).

La concentración de proteínas totales analizadas no mostró una diferencia significativa, contrario a lo que reportaron Behringer *et al.*, en el 2008 quienes encontraron una disminución en los niveles de proteínas en la hemolinfa, la cual se calculó a través del índice de refracción de la hemolinfa. En camarones infectados con WSSV se ha reportado el mantenimiento e incluso el incremento en la concentración de proteínas en la hemolinfa, Yoganandha *et al.* (2003) sugiere que este fenómeno puede ser el resultado de la cuantificación de las proteínas del virus junto a las del camarón, por lo cual, la separación de las proteínas del organismo y las virales por métodos moleculares permitiría tener una idea real de la respuesta de las proteínas del organismo ante la infección de PaV1.

Por otro lado la pérdida de las reservas nutricionales por la infección por PaV1 en el hepatopáncreas ha sido descrita a través de estudios histológicos. Li *et al* (2008), observaron una disminución en las células de reservas (RI). Los resultados presentados en este trabajo muestran como en ambas poblaciones las reservas de glucógeno y lípidos totales de hepatopáncreas disminuyen significativamente a partir de la condición E2, donde el daño tisular comienza a ser evidente y va de ligero a moderado (Tabla 1), de la misma manera las reservas encontradas en el tejido

muscular empiezan a ser movilizadas, los lípidos disminuyen un 50% para langostas infectadas, aunque dicha disminución no es significativa estadísticamente. La reducción de las reservas es un evento ampliamente evaluado en crustáceos ante periodos de inanición; la disminución de estas reservas, tanto en hemolinfa como en tejido, ha sido usado como un indicador de cómo los nutrientes son metabolizados (Pascual *et al.*, 2006). Se ha visto que en los cangrejos *Chasmagnathus granulata* mantenidos con una dieta alta en proteínas, las reservas de carbohidratos y lípidos en la glándula digestiva mermaron casi al punto del agotamiento ante un periodo de 8 semanas de inanición, indicando que las reservas de lípidos son agotadas antes que las de las proteínas (Vinagre and Da Silva, 1992).

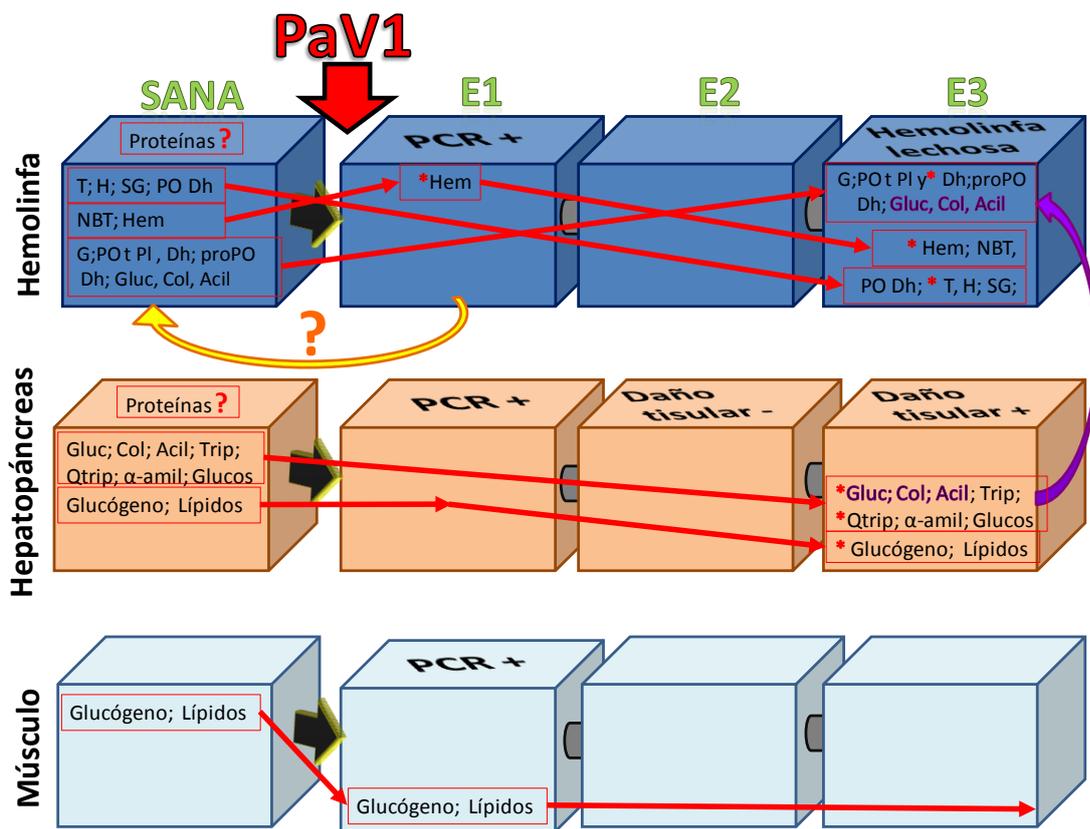


Fig. 15 Esquema de todas las variables medidas inmunológicas y nutricionales en diferentes tejidos ante la infección con PaV1 en juveniles de langosta *P. argus*. La dirección de las flechas indica el incremento, decremento de la respuesta o concentración de dicha variable. Las variables posteriores a * son significativas para esa condición hemolinfa. T= Concentración total de hemocitos; H= Cel. Hialinas; SG= Cel. Semigranulares; G= Cel. Granulares; PO t PI y Dh= Fenoloxidasa total en Plasma y Degranulado; PO Dh= Fenoloxidasa en Degranulado; proPO Dh= pro-fenoloxidasa en Degranulado; Hem= Actividad Hemaglutinante; NBT= Fagocitosis medida a través de NBT; Gluc= Glucosa; Col= Colesterol; Acil= Acilgliceridos; Trip= Tripsina; Qtrip= Quimotripsina; α-amil= α-amilasa; Glucos= Glucosidasa.

Si bien Bheringer *et al*, (2008) a través de una infección experimental, basándose en síntomas visibles de la enfermedad y sin diagnóstico histológico o molecular reportaron que una pobre condición nutricional no incrementa la susceptibilidad de *P. argus* a la infección por PaV1, los resultados de este trabajo, (resumen de variables Fig. 15) muestran que la condición nutricional, sí afecta la respuesta del organismo ante la infección. Cabe recordar que los estudios realizados al respecto han sido bajo infecciones experimentales y este es el primer trabajo que describe la condición fisiológica durante el progreso de la enfermedad en organismos silvestres donde la infección y el desarrollo de la afectación por la infección se da en condiciones naturales.

También se comprobó que este virus compromete fisiológica y estructuralmente al hepatopáncreas y que la disfunción de éste órgano vital puede ser la causa de la muerte de *P. argus* ante la infección (Shields y Behringer, 2004), al implicar el consumo de las reservas metabólicas y la incapacidad de mantener los requerimientos energéticos para mantener la actividad metabólica vinculada a una infección que desarrolla en un periodo largo y que conlleva a un desequilibrio sistémico al afectar los procesos digestivos y homeostáticos.

Este trabajo también pone de manifiesto que es indispensable la realización de más estudios de investigación en cuanto a la respuesta fisiológica e inmunológica del organismo ante la infección con PaV1, si bien este es el primer acercamiento al conocimiento de la respuesta inmunológica ante un proceso de infección viral por PaV1, aún quedan muchos aspectos que explorar, como la especificidad de este virus por un tipo de células circulatorias, los mecanismos de reconocimiento y tomar muy en cuenta que se requieren más estudios de la relación de la condición nutricional y el desarrollo de esta enfermedad. Y será de vital importancia el seguimiento que se le ha dado a esta enfermedad en términos de su prevalencia y sus implicaciones en las poblaciones de langosta, *P. argus* es de las especies más importantes comercialmente hablando en todo el Caribe, lo que añade relevancia el estudio de esta infección viral.

CONCLUSIONES

La disminución en la concentración total de hemocitos, así como en hialinocitos y semigranulocitos en las langostas enfermas es un efecto de la infección viral por PaV1.

Los hemocitos granulares aumentan en organismos moderada y fuertemente infectados con PaV1.

El estallido respiratorio disminuye significativamente en juveniles fuertemente infectados con PaV1.

Los juveniles de langosta infectados con PaV1 mantienen la actividad del sistema fenoloxidasa tanto en la porción plasmática como en la celular como un esfuerzo inmunológico ante la infección por PaV1.

La actividad hemaglutinante de juveniles de langosta infectados naturalmente con PaV1 aumenta tras la infección de este virus, pero su actividad decae con el progreso de la infección.

Las langostas sanas de diferentes localidades, Puerto Morelos y Bahía de la Ascensión, poseen diferencias en su condición nutricional.

El proceso natural de infección por PaV1 en juveniles de langosta *P. argus* genera un daño progresivo de la glándula digestiva, que se ve reflejado en el trastorno paulatino de la actividad enzimática, la cual esta asociada a la condición nutricional inicial.

La disminución gradual de las concentraciones de glucosa, colesterol, acilglicéridos, glucógeno y lípidos en el hepatopáncreas son un efecto del progreso de la enfermedad y el daño tisular que genera.

El incremento de la glucosa, colesterol y acilglicéridos en el plasma de la hemolinfa son evidencia del daño tisular progresivo y el uso de las reservas metabólicas de los juveniles de langosta infectados con PaV1 por esta enfermedad.

LITERATURA CITADA

Battison, A., Richard, C. and Horney, B. 2003. Classification of *Homarus americanus* hemocytes and the use of differential hemocyte counts in lobster infected with *Aerococcus viridians* var. *homari* (Gaffkemia). *Journal of Invertebrates Pathology* 84: 177-197.

Beck, M.H and Strand, M.R. 2007. A novel polydnavirus protein inhibits the insect prophenoloxidase activation pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104 (49): 19267-19272.

Behringer, D., Butler, M. and Shields, J. 2006. Avoidance of disease by social lobster. *Nature*. 441(25): 421.

Behringer, D., Butler, M. and Shields, J. 2008. Ecological and physiological effects of PaV1 infection on the Caribbean spiny lobster (*Panulirus argus* Latreille). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 359: 26-33.

Behringer, D. and Butler, M. 2010. Disease avoidance influence shelter use and predation in Caribbean spiny lobster. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 64 (5): 747-755.

Behringer, D., Butler, M. Shields, J. and Moss J. 2011 Review of *Panulirus argus* virus 1 a decade after its discovery. *Diseases of Aquatic Organisms* 94: 153-160.

Bello, J., Ríos, V., Liceaga, M., Zetina, C., Cervera, K., Arceo, P. and Hernández, H. 2005. Incorporating spatial analysis of habitat into spiny lobster (*Panulirus argus*) stock assessment at alacranes reef, Yucatán, México. *Fisheries Research*. 73: 37-47.

Bernfel, P. 1955. Amylases α and β . *Methods in Enzymology*, 1:149-158

Biesiot, P.M. and McDowell Capuzzo, J. 1990. Changes in digestive enzyme activities during early development of the American lobster *Homarus americanus*. *Journal of Experimental of Experimental Marine Biology and Ecology*. 136: 107-122.

Briones, P., Lozano, E., Cabrera, M. y Arceo, P. 1997. Biología y ecología de las langostas (Crustácea: Decapoda: Palinurudae) In: Flores, D. Sánchez, P, Seijo, J. y Arreguín, F (Eds.) Análisis y diagnóstico de los recursos pesqueros críticos del Golfo de México. Universidad Autónoma de Campeche. EPOMEX Serie científica 7:496 p.

Briones-Fourzán, P. and Lozano-Álvarez, E. 2001. Effect of artificial shelters (casitas) on the abundance and biomass of juveniles spiny lobster *Panulirus argus* in a habitat-limited tropical reef lagoon. Marine Ecology Progress Series 221: 221-232.

Briones-Fourzán, P., Castañeda-Fernández de Lara, V., Lozano-Álvarez, E., and Estrada-Olivo, J. 2003. Feeding ecology of the three juvenile phases of the spiny lobster *Panulirus argus* in a tropical reef lagoon. Marine Biology 142: 855-865.

Butler, M. J., Behringer, D. and Shields, J. 2008. Transmission of *Panulirus argus* virus 1 (PaV1) and its effect on the survival of juvenile Caribbean spiny lobster. Diseases of Aquatic Organisms 79: 173-182.

Butler, M. J., Herrnkind, W.F. and Hunt, J.H. 1997. Factors affecting the recruitment of juveniles Caribbean spiny lobster dwelling in macroalgae. Bulletin of Marine Science 61: 3-19.

Candia-Zulbarán R.I. 2011. Prevalencia y ecología de la enfermedad viral PaV1 (*Panulirus argus* Virus 1) en la población de langostas de la Bahía de la Ascensión, Quintana Roo. Tesis de Maestría en Biología Marina. Posgrado de Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México.

Candia-Zulbarán, R.I., Briones-Fourzán, P., Negrete-Soto, F., Barradas-Ortiz, C. and Lozano-Álvarez, E. 2011. Variability in Prevalence of the PaV1 disease in Caribbean Spiny Lobsters Occupying Comercial "Casitas" over a Large Bay in Mexico. 64th Annual Meeting of the Gulf and Caribbean Fisheries Institute. Puerto Morelos, Quintana Roo, México.

Castañeda Xiu Adriel Enrique. 2009. Análisis bioeconómico de la pesquería de langosta espinosa, *Panulirus argus*, de Belice. Tesis de Maestría. El Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR) Chetumal, Quintana Roo.

Celis-Gerrero, L.E., García-Carreño, F.L., Navarrete del Toro, M.A. 2004. Characterization of proteases in the digestive system of spiny lobster (*Panulirus interruptus*). *Marine Biotechnology* 6: 262-269.

Cerenius, L., Luel Lee, B. and Söderhäll, K. 2009. Review. The proPO-system: pros and cons for its role in invertebrate immunity. *Trends in Immunology* 29(6): 263-271.

Chen, J.C., Cheng, S-Y and Chen, C-T. 1994 Changes of haemocyanin, protein and free amino acid levels in the haemolymph of *Panaeus japonicus* exposed to ambient ammonia. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* 109 (2): 339-347.

Cruz-Quintana, Y., Rodríguez-Canul, R. and Vidal-Martínez, V.M. 2011. First evidence of *Panulirus argus* virus 1 (PaV1) in spiny lobster from Cuba and clinical estimation of its prevalence. *Diseases of Aquatic Organisms* 93: 141-147.

Cruz, R., Baisre, J., Díaz, E., Brito, R., García, C., Blanco, W., y Carrodegas, C. 1987. Atlas-biológico pesquero de la langosta en el archipiélago cubano. Centro de Investigaciones Pesqueras. La Habana, Cuba. 125 pp.

Dall, W. 1974. Indices of nutritional status in the western rocklobster, *Panulirus longipes* (Milne Edwards). I. Blood and tissue constituents and water content. *J. Exp. Mar. Biol.* 2201. Vol.3 16, 167-180.

Decker, H. and Tucek, F. 2000. Tyrosinase/catecholase activity of hemocyanins: structural basis and molecular mechanism. *Trend biochemical Science* 25: 392-397.

Diggles, B.K. 2001. A mycosis of juveniles spiny rock lobster *Jasis edwardsii* (Hutton, 1875) caused by *Haliphthoros spp.*, and possible methods of chemical control. *Journal of Fisheries Disease* 24: 99-110.

Emerciano, M., Cuzon, G., Mascaro, M., Arévalo, M., Noreña, E., Gerónimo, G., Racotta, I., and Gaxiola, G. Reproductive performance, biochemical composition and

fatty acids profile of wild-caught and 2nd generation domesticated *Farfantepenaeus duorarum* (Burkenroad, 1939) broodstock. Datos sin publicar.

Féral, J.P. 2002. How useful are the genetic markers in attempts to understand and manage marine biodiversity? *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 268: 121-145.

Fenucci, J.L & Fernández-Jiménez A. 2004. Acción de las Vitaminas en la Dieta de Camarones Penaeoideos. *Avances de Nutrición Acuícola VII. Memorias del VII Simposium Internacional Acuícola. 16-19 Noviembre, 2004. Hermosillo, Sonora, Mexico.*

Förlin, L., Baden, S.P., Eriksson, S., Granmo, A., Lindesjö, E., Magnusson, K., Ekelund, R., Esselin, A. and Sturve, J. 1996. Effects of contaminants in Roundnose grenadier (*Coryphanoides rupestris*) and Norway lobster (*Nephrops norvegicus*) and contaminant levels in mussels (*Mytilus edulis*) in the Skagerrak and Kattegat compared to the faroe islands. *Journal of Sea Research* 35(1-3): 209-222.

Gallardo-Espinosa, P.P. 2005. Alimentos artificiales con hidrolizados proteicos de origen marino en la nutrición de larvas del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (Bone, 1931). Tesis de Doctorado. Posgrado de Ciencias del Mar y Limnología. Universidad Nacional Autónoma de México.

Geiger, R. 1988. Chymotrypsin. In: *Methods of Enzymatic Analysis*. (Bergemeyer, J. & Grab, M. eds), pp. 99–104, Verlag Chemie, Weinheim.

Geiger, R. and Fritz, H. 1988. Trypsin. In: *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergemeyer, J. & Grab, M. eds), pp. 104–110.

Hameed Sahul, A.S., Charles, M.X. and Anilkumar, M. 2000. Tolerance of *Macrobrachium rosenbergii* to white spot syndrome virus. *Aquaculture* 183: 207-213.

Hernández-López, J., Gollas-Galván, T. and Vargas-Albores, V. 1996. Activation of the porphenoloxidase system of the Brown shrimp *Panaeus californiensis*.

Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology. 113(1):61-66.

Hernández-López, J., Gollas-Galván, T., Gámez-Jiménez, S., Portillo-Clark, G and Vargas-Albores, V. 2003. In the spiny lobster (*Panulirus interruptus*) the prophenoloxidase is located in the plasma not in haemocytes. Fish & shellfish Immunology 14: 105-114,

Huchin-Mian, J.P. 2007. Diagnóstico y caracterización del efecto patogénico del virus PaV1 (*Panulirus argus* Virus1) en la langosta espinosa *Panulirus argus* de Puerto Morelos, Quintana Roo. Tesis de maestría. Centro de Investigaciones y de estudios avanzados del Instituto Politécnico Nacional, unidad Mérida. Departamento de Recursos del Mar.

Huchin-Mian, J.P., Rodríguez-Canul, R., Arias-Bañuelos, E., Simá-Alvarez, R., Pérez-Vega, J.A., Briones-Fourzán, P. and Lozano-Álvarez, E. 2008. Presence of *Panulirus argus* Virus 1 (PaV1) in juvenile spiny lobsters *Panulirus argus* from the Caribbean coast of Mexico. Diseases of Aquatic Organism 79(2):153-156.

Huchin-Mian, J.P., Briones-Fourzán, P., Simá-Álvarez, R., Cruz-Quintana, Y., Pérez-Vega, J.A., Lozano-Álvarez, E., Pascual-Jiménez, C. and Rodríguez-Canul, R. 2009. Detection of *Panulirus argus* Virus 1 (PaV1) in exported frozen tails of subadult-adult Caribbean spiny lobsters *Panulirus argus*. Diseases of Aquatic Organism. 86:159-162.

Huchin-Mian, J.P., Briones-Fourzán, P., Negrete-Soto, F., Barradas-Ortiz, C., Rodríguez-Canul R. and Lozano-Álvarez, E. 2011a. Prevalence of Clinical and Subclinical Infection by *Panulirus argus* Virus 1 (PaV1) in Caribbean Spiny Lobsters from a "Casita"-based Fishery in Mexico. 64th Annual Meeting of the Gulf and Caribbean Fisheries Institute. Puerto Morelos, Quintana Roo, México.

Huchin-Mian, J.P., Briones-Fourzán, P., Negrete-Soto, F., Barradas-Ortiz, C., Rodríguez-Canul R. and Lozano-Álvarez, E. 2011b. Prevalence of Clinical and Subclinical Infection by *Panulirus argus* Virus 1 (PaV1) in Caribbean Spiny Lobsters

from a "Casita"-based Fishery in Mexico. 64th Annual Meeting of the Gulf and Caribbean Fisheries Institute. Puerto Morelos, Quintana Roo, México.

Jiravanichpaisal, P., Luel Lee, B. and Söderhäll, K. 2006. Cell-mediated immunity in arthropods: Hematopoiesis, coagulation melanization and opsonization. *Immunobiology* 211: 213-236.

Johnston, D.J. 2003. Ontogenic changes in digestive enzyme activity of the spiny lobster *Jasus edwardsii* (Decapoda; Palinuridae). *Marine Biology* 143:1071-1082.

Johnston, M. A., Spencer Davies, P., 1972. Carbohydrates of the hepatopancreas and blood tissues of *Carcinus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 41B, 433 - 443.

Kittaka, J. and J. D. Booth. 2000. Prospects for Aquaculture. Pp. 465–473 *in* B. F. Phillips and J. Kittaka, eds. *Spiny Lobster Management*, Second Edition. Fishing News Books, Oxford.

Laganà, G., Giacobbe, S., Bellocco, E., Mannucci, C., Galtieri, A., Ficarra, S., Kotyk, A. and Leuzzi, U. 2007. Lactate and malate dehydrogenase in the fan-shell associated shrimp, *Pontonia pinnophylax* (Otto): Effects of temperature and urea. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 349(1): 27-34.

Lavallée, J., Hammell, L., Spangler, E., and Cawthorn, R. 2001. Estimated prevalence of *Aerococcus viridans* and *Anophryoides haemophila* in American lobsters *Homarus americanus* freshly captured in the waters of Prince Edward Island, Canada. *Disease of Aquatic Organisms*. 46: 231-236.

Lehninger A.L. 1995. *Bioquímica. Las bases moleculares de la estructura y función celular*. Segunda edición. Ediciones Omega, S.A. Barcelona España. 1117 pp.

Le Moullac, G., Klein, B., Sellos, D., Van Wormhoudt, A. 1997. Adaptation of trypsin, chymotrypsin and α -amylase to casein level and protein source in *Panaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 208(1,2,3): 107-125.

Le Moullac, G. and Haffner, P. 2000. Environmental factors affecting immune response in Crustacea. *Aquacultura* 191:121-131

Li, C., Shields, J.D., Small, H.J., Reece, K.S., Hartwing, C.L, Cooper, R.A. and Ratzaff, R.E. 2006. Detection of *Panulirus argus* virus 1 (PaV1) in the Caribbean spiny lobster using fluorescence in situ hybridization (FISH). *Diseases of Aquatic Organism* 72: 192:192.

Liu, H., Söderhäll, K., and Jiravanichpaisal, P. 2009. Review. Antiviral immunity in crustaceans. *Fish & Shellfish Immunology* 27: 79-88.

Lozano, E. y Negrete, F. 1991. Pesca exploratoria de la langosta *Panulirus argus* con nasas frente a la Bahía de la Ascensión en el Caribe mexicano. *Revista de Investigaciones Marinas*. 12(1-3):261-268.

Lozano-Álvarez, E., Briones-Fourzán, P. and Ramos-Aguilar, M. 2003. Distribution, shelter fidelity and movements of subadult spiny lobster (*Panulirus argus*) in areas with artificial shelters (casitas). *Journal of Shellfish Research*. 22(1):533-540.

Lozano-Álvarez, E., Briones-Fourzán, P., Ramírez-Estévez, A., Placencia-Sánchez, D., Huchin-Mian, J.P and Rodríguez-Canul R. 2008. Prevalence of *Panulirus argus* Virus 1 (PaV1) and habitation patterns of healthy and diseased Caribbean spiny lobsters in shelter-limited habitats. *Diseases of Aquatic Organism*. 80(2):95-104.

Lozano-Álvarez, E., Briones-Fourzán, P., Candia-Zulbarán, R.I., Negrete-Soto, F., Barradas-Ortiz, C., and Huchin-Mian, J.P. 2011b. Influence of Local Habitat Features on Avoidance of PaV1-diseased *Panulirus argus* Spiny Lobsters by Healthy Conspecifics in a "Casita"-enhanced Bay. 64th Annual Meeting of the Gulf and Caribbean Fisheries Institute. Puerto Morelos, Quintana Roo, México.

Lyle, W. and MacDonald, C. 1983. Molt stage determination in the Hawaiian spiny lobster *Panulirus marginatus*. *Journal of Crustacean Biology* 3(2): 208-216.

Marianne E., Cuff, Karen I., Miller, Kensal E. van Holde and Wayne A. Hendrickson. 1998. Crystal structure of a functional unit from *Octopus* hemocyanin. *Journal of Molecular Biology* 278(4): 855-870.

Mouche, F., Boisset, N., Lamy, J., Zal, F., and Lamy, J.N. 1999. Structural Comparison of Cephalopod Hemocyanins: Phylogenetic Significance. *Journal of Structural Biology*, 127(3):199-212.

Montgomery-Fullerton, M.M., Cooper, R.A., Kauffman, K.M., Shields, J.D. and Ratzlaff, R.E. 2007. Detection of *Panulirus argus* Virus 1 in Caribbean spiny lobsters. *Diseases of Aquatic Organisms* 76:1-6.

Nagai, T., Osaki, T. and Shun-Ichiro, K. 2001. Functional conversion of hemocyanin to phenoloxidase by horseshoe crab antimicrobial peptides. *Journal of Biological Chemistry*. 276(29): 27166-27170.

Ocampo, L., Patiño, D. and Ramírez, C. 2003. Effect of temperature on hemolymph lactate and glucose concentration in spiny lobster *Panulirus interruptus* during progressive hypoxia. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 296: 71-77.

Pascual, C., Sánchez, A., Zenteno, E., Cuzon, G., Gaxiola, G., Brito, R., Gelabert, R., Hidalgo, E. and Rosas, C. 2006 Biochemical, physiological and immunological changes during starvation in juveniles of *Litopenaeus vennemei*. *Aquaculture* 251: 416-429.

Pascual Jiménez C. 2000. Tesis de Maestría. Caracterización fisiológica e inmunológica de una población de machos del camarón blanco *Litopenaeus setiferus*: línea base y estrés térmico. Maestría en Ciencias (Biología), Facultad de Ciencias, UNAM.

Paterson, W.D., Stewart, J.E and Zwicker, B.M. 1976. Phagocytosis as a Cellular Immune Response Mechanisms in the American Lobster, *Homarus americanus*. *Journal of Invertebrate Pathology* 27: 95-104.

Perdomo-Morales, R., Montero-Alejo, V., Perera, E., Pardo-Ruiz, Z. y Alonso-Jiménez, E. 2007. Phenoloxidase activity in the hemolymph of the spiny lobster *Panulirus argus*. *Fish & Shellfish Immunology* 23: 1187-1195.

Perdomo-Morales, R., Montero-Alejo, V., Perera, E., Pardo-Ruiz, Z. y Alonso-Jiménez, E. 2008. Hemocyanin-derived phenoloxidase activity in the spiny lobster *Panulirus argus* (Latreille, 1804). *Biochimica et Biophysica Acta* 1780: 652-658.

Perera, E., Moyano, F.J., Díaz, M., Perdomo-Morales, R., Montero-Alejo, V., Rodríguez-Viera, L., Alonso, E., Carrillo, O. and Galich, G.S. 2008a. Changes in digestive enzymes through developmental and molt stages in the spiny lobster, *Panulirus argus*. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B.* 151: 250-256.

Perera, E., Moyano, F.J., Díaz, M., Perdomo-Morales, R., Montero-Alejo, V., Carrillo, O. and Galich, G.S. 2008b. Polymorphism and partial characterization of digestive enzymes in the spiny lobster *Panulirus argus*. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B.* 150: 247-254.

Porter, L. Butler, M., Reeves, R.H. 2001. Normal bacterial flora of the spiny lobster *Panulirus argus* and its possible role in shell disease. *Marine Freshwater Research* 52: 1401-1405.

Rainer, J. and Brouwer, M. 1993. Hemocyanin synthesis in the blue crab *Callinectes sapidus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology.* 104(1): 69-73.

Ríos-Lara G.V., Zetina-Moguel, C., Ramírez-Estevez, A., Aguilar-Cardoso, C. y Zetina-Ríos, K. 2011. Evaluación de los Stock de Langosta (*Panulirus argus*) en Diferentes Zonas de Pesca de la Costa de Yucatán y Quintana Roo, México. 64th Annual Meeting of the Gulf and Caribbean Fisheries Institute. Puerto Morelos, Quintana Roo, México.

Rodríguez, J., LeMoullac, G., 2000. State of the art of immunological tools and health control of penaeid shrimp. *Aquaculture* 191, 109-119.

Rosas, C., Cuzon, G., Taboada, G., Pascual, C., Gaxiola, G. and Van Wormhoudt, A. 2001. Effect of dietary protein and energy levels on growth, oxygen consumption, haemolymph and digestive gland carbohydrates, nitrogen excretion and osmotic pressure of *Litopenaeus vannamei* (Boone) and *L. setiferus* (Linne) juveniles (Crustacea, Decapoda; Penaeidae). *Aquaculture Research* 32(7): 531-547.

Rosas, C., Carrillo, C., Wilson, R. y Andreatta, E. Estado actual y perspectivas de la nutrición de los camarones peneidos cultivados en Iberoamérica. Subprograma II: Acuicultura. Red Temática II.C Cooperación Iberoamericana. Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED). México 2006. 322pp.

Rodríguez, J., LeMoullac, G., 2000. State of the art of immunological tools and health control of penaeid shrimp. *Aquaculture* 191: 109-119.

Salas, S., Bello, J., Ríos, G., Solís, R., Cabrera, M y Santa María, A. 2005. Programa maestro del sistema producto de la pesquería de la langosta en Yucatán. Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca (CONAPESCA). 1-12pp.

Sejio J. C. 2007. Considerations for management of metapopulations in small-scale fisheries of the Mesoamerican barrier reef ecosystem. *Fisheries Research* 87: 86-91.

SEMARNAP 2000. Programa de Manejo Parque Nacional Arrecife de Puerto Morelos. 222p.

Shields, J. and Behringer, D. 2004. A new pathogenic virus in the Caribbean spiny lobster *Panulirus argus* from the Florida Keys. *Diseases of Aquatic Organism* 59:109-118.

Shields, J.D. 2011. Diseases of spiny lobsters: A review. *Journal of Invertebrate Pathology* 106: 79-91.

Shinn-Pyng Y., Ying-Nan C., Shu-Ling H., Winton, C. and Chun-Hung L. 2009. Immune response of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, after a concurrent infection with white spot syndrome virus and infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus. *Fish & Shellfish Immunology* 26: 582-288.

Simon, C.J. 2009. Digestive enzyme response to natural and formulated diets in cultured juvenile spiny lobster *Jasus edwardsii*. *Aquaculture* 294: 271-281.

Song, Y.L and Hsieh, Y.T. 1994. Immunostimulation of tiger shrimp (*Penaeus monodon*) hemocytes for generation of microbicidal substances: Analysis of reactive oxygen species. *Developmental and Comparative Immunology* 18(3): 201-209.

Stewart, J.E. 1975 Gaffkemia, the fatal infection of lobster (genus *Homarus*) caused by *Aerococcus viridians* (var.) homari: a review. *Marine Fisheries Review*. 37: 20-24.

Technical resource. 2005. Protein stability and storage. TR0043.1; Pierce Biotechnology, Inc.

Todd, E.W. 1949. Quantitative studies on the total plasmin and trypsin inhibitor of human blood serum, *Journal. Experimental Medicine* 89:295-308

Van Bruggen, E.F.J. 1980. Hemocyanin: the mystery of blue blood. *Trends in biochemical Sciences* 5(7):185-188.

Van Holde, K.E., Miller, K.I. and Lang, W.H. 1991. Hemocyanins: Structure and evolution. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 43(2-3):166

Verri, T., Mandal, A., Zilli, L., Bossa, D., Mandal, P.K., Ingrosso, L., Zonno, V., Vilella, S., Ahearn, G.A. and Storello, C. 2001. d-Glucose transport in decapods crustacean hepatopancreas. Review. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 130: 585-606.

Von Storch H. & Zwiers, F.W. (2001) *Statistical Analysis in Climate Research*. Cambridge University Press, Cambridge.

Wang, Y.-C., Lo, C.-F., Chang, P.-S. and Kou, G.-H. 1998. Experimental infection of white spot baculovirus in some cultured and wild decapods in Taiwan. *Aquaculture* 164: 221-231.

Wells, R.M.G., Lu, J., Hickey, A.J.R. and Jeffs, A.G. 2001. Ontogenetic changes in enzyme activities associated with energy production in the spiny lobster *Jasus edwardsii*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 130: 339-247.

Yehezkel, G., Chayoth, R., Abdu, U., Khalaila, I. and Sagi, A. 2000. High-density lipoprotein associated with secondary vitellogenesis in the hemolymph of the crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B.* 127: 411-421

Yoganandhan, K., thirupathi, S. and Hameed, S. (2003) Biochemical, physiological and hematological changes in white spot syndrome virus-infected shrimp, *Panaeus indicus*. *Aquaculture* 221: 1-11.

ANEXO 1

Estandarización de las técnicas de actividad enzimática de la glándula digestiva (pH, temperatura, concentración de la enzima y concentración de sustrato).

En las evaluaciones realizadas en el hepatopáncreas de una langosta sana, con el fin de encontrar el mejor método de preservación de las muestras, se verificó que la concentración de metabolitos al ser congelados no muestran una diferencia significativa con respecto al tiempo de preservación ($p= 0.078$). Por otro lado en las muestras liofilizadas si mostraron una diferencia significativa con el tiempo ($p= 0.0007$) en el sexto mes de muestreo, el cual fue el último muestreo realizado para este tipo de preservación.

De la misma manera se comprobó en cada una de las enzimas cual era el mejor método de preservación del tejido. Se realizó una ANOVA para determinar si existía una diferencia con el tiempo y si el tratamiento de conservación influye a lo largo de un año de preservación de la muestra, se comprobó la homogeneidad de varianza. En el caso de las enzimas de tipo proteasas, tripsina y quimotripsina, no encontramos diferencias significativas a lo largo de un año cuando estas fueron congeladas y mantenidas a -40°C ; sin embargo en el caso de las carbohidrasas, la glucosidasa si mostró una diferencia significativa entre las muestras tomadas en fresco el día cero y las evaluadas tras un año de preservación en congelación. La amilasa no mostró diferencias a lo largo del año de preservación.

Para las muestras liofilizadas, la prueba de estabilidad sólo fue llevada hasta los seis meses, sin embargo a lo largo de esta prueba, las enzimas mostraron ser muy poco estables ante este tipo de preservación. En el caso de las proteasas obtuvimos resultados contrastantes, la tripsina fue estadísticamente diferente respecto a las muestras tomadas el día cero para casi todas las evaluaciones posteriores, a los 15 días, 3 meses y 6 meses, a diferencia de la quimotripsina la cual no presentó alteración alguna ante los seis meses de preservación por este método, lo cual también fue observado en la glucosidasa, mientras que en la amilasa fue diferente respecto al día cero en todas las evaluaciones posteriores.

Es evidente que la congelación es la mejor manera de preservar las muestras, sin embargo, independientemente al tipo de preservación, la actividad enzimática de las glucosidasas se ve afectada significativamente si se mantienen por un año, por lo cual las evaluaciones de las langostas se realizaron antes de cumplir este plazo. Así mismo los resultados nos señalan que es conveniente darle el mismo tiempo de preservación a las muestras que serán comparadas ya que podríamos encontrar diferencias relacionadas con el tiempo de preservación más que a la condición de salud de las langostas. Por esta razón ambos lotes de muestras fueron evaluadas al mismo tiempo.

Determinación de pH y temperatura óptimo.

Se determinó para cada enzima la temperatura y pH óptimos (Fig. 15). Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 2 del apartado de resultados.

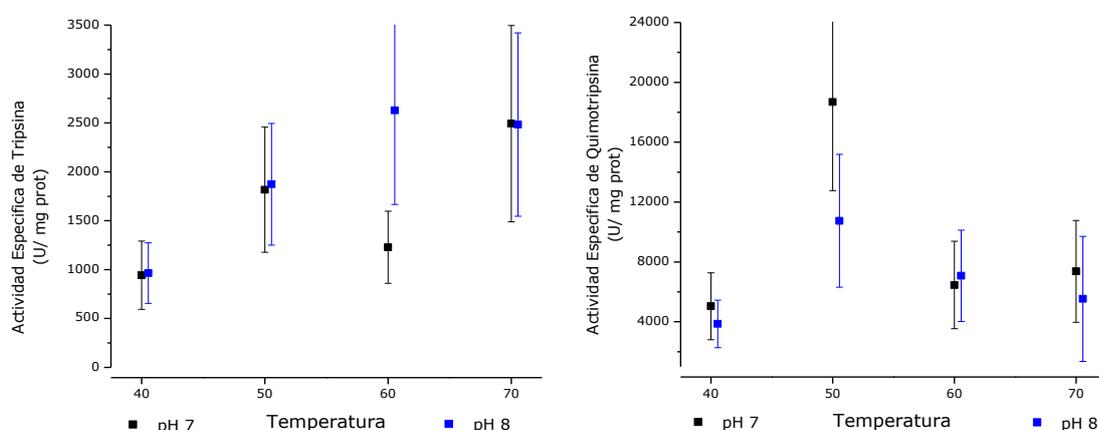


Fig. 15. Actividad Específica de tripsina y quimotripsina probada a 4 temperaturas y dos pH en hepatopáncreas de juveniles de langosta. Se muestran medias \pm error estándar n=3 con tres repeticiones.

Los pH y temperaturas óptimas encontradas en este trabajo concuerdan con lo encontrado por Perera *et al.*, en el 2008 en donde registran pH de neutros a alcalinos para las proteasas y ácidos para las carbohidrasas, así como temperaturas entre los 50 y 60°C.

Concentración de enzima

Las diluciones del extracto utilizadas se determinaron en incrementos o decrementos del 15% a partir de una concentración 6X (por cada gramo de tejido se utilizó 5 de

agua libre de pirógenos), concentración utilizada inicialmente (2.4; 3.3; 4.2; 5.1; 6; 6.9; 7.8; 8.7 y 9.6 X). Encontramos diferentes rangos en los que la reacción no se ve afectada por la concentración de enzima, siendo el de tripsina el más reducido (4.2-7.8 X). La concentración inicial (6X) se encuentra dentro del rango aceptable para todas las enzimas realizadas, por lo que fue utilizada en todos los análisis posteriores (Fig. 16).

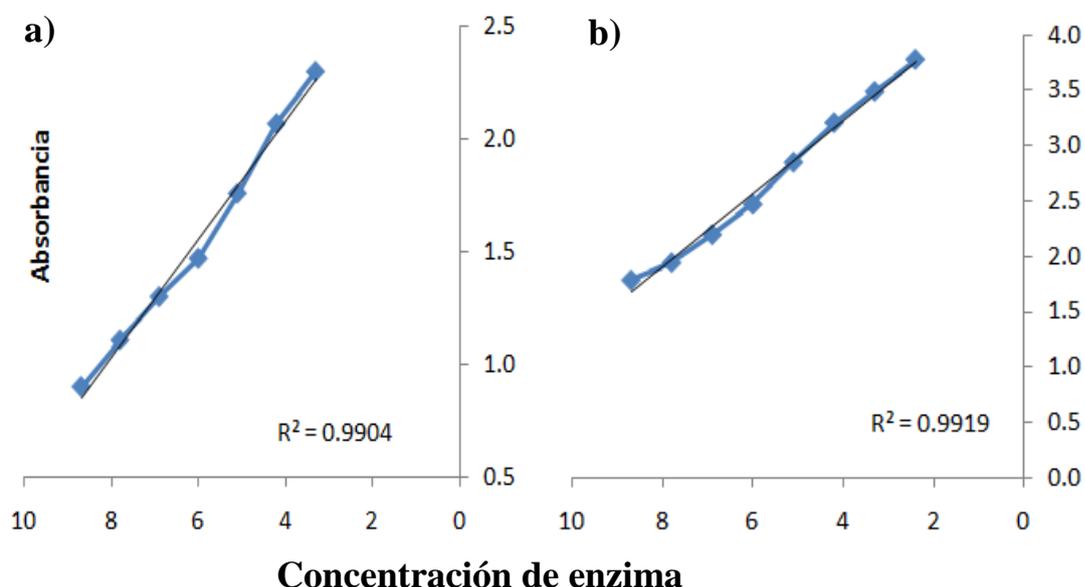


Fig. 16. Densidades ópticas para a) quimotripsina y b) glucosidasa a diferentes concentraciones de extracto de hepatopáncreas de juveniles de langosta (n=3 con tres repeticiones).

2.3 Concentración de sustrato

En el cálculo de la concentración de sustrato indicado para cada enzima, partimos del cálculo de la Km de cada sustrato. Como ejemplo, en la figura 6 podemos observar los valores de delta en las densidades obtenidas para quimotripsina, ya que esta no es una reacción de punto final, utilizamos el delta de 1 minuto menos 30 segundos y a través de su inverso obtuvimos la ecuación de la recta para poder determinar la Km, para cada ensayo se utilizó extracto de hepatopáncreas preparado en una dilución 6X.

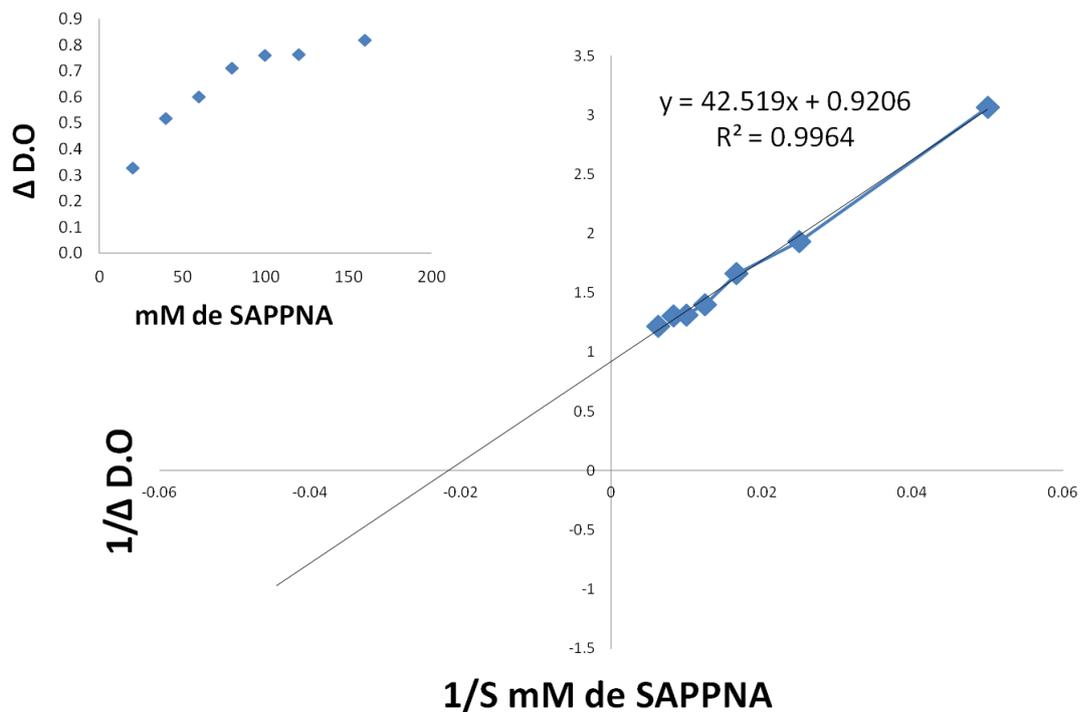


Fig. 17. Gráficas utilizadas para el cálculo de la K_m del sustrato de la quimotripsina, SAPPNA. En la gráfica de la izquierda tenemos el delta de sus densidades ópticas cuando utilizamos 7 concentraciones de sustrato y en la gráfica de la derecha el valor inverso para obtener la ecuación de la recta ajustada.

Este procedimiento se utilizó para determinar la K_m de cada uno de los sustratos a utilizar para cada enzima digestiva, se determinó usar de tres a cinco veces la K_m de cada sustrato, dependiendo de la solubilidad de cada uno, para la determinación de la actividad enzimática del hepatopáncreas de la langosta sana, infectada y enferma.

ColacMarCuba2009



Efecto de la infección viral natural (PaV1) en la actividad enzimática de la langosta espinosa *Panulirus argus*



Frescal C. Sánchez A¹, Huarán Mian J^{1*}, Rodríguez Canal R², Irozano Álvarez E³, Siles Gouzman P⁴, Cruz López H⁵, Herrera Subaliente N⁶

so.votid@unam.mx

¹ Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Ciencias, Químico de Aragón s/n, 5508, Tlalmanolcá, Yucatán, México; ² Laboratorio de Inmunología y Biología Molecular, CINVESTAV del IPN, Unidad Mérida, Km. 6 Antigua Carretera a Progreso, Mérida, Yucatán, México; ³ Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Unidad Académica Puerto Morelos, Carriñana Río, México; ⁴ Universidad Nacional Autónoma de México, Programa de Ciencias del Mar y Limnología, Circuito Exterior s/n, Ciudad Universitaria México, DF, México

Introducción

PaV1 es la primera infección viral reportada para *Panulirus argus*. Primero fue detectada en Rojo de Úva y después en el Caribe Mexicano. Algunos aspectos de la infección han sido descritos a través de inyecciones experimentales, pero aún se desconocen muchos aspectos fisiológicos e inmunológicos vinculados con la enfermedad en organismos silvestres. El ánimo de este estudio fue determinar el efecto de la infección PaV1 sobre la actividad enzimática de los juveniles de *P. argus*.

Métodos



45 langostas de 17.9 - 72.3 mm CL (24 sanas y 18 infectadas) fueron capturadas y transportadas al laboratorio de la UNAM para ser pesadas, medidas, determinadas del estado de salud y para la obtención de tejido. El hepatopancreas fue pesado y congelado en nitrógeno líquido su análisis. A través del análisis histológico y diagnóstico con PCR se corroboró la infección por PaV1. En el hepatopancreas se evaluó la actividad de enzimas totales, glucosidasa, amilasa, lipasa y quimotripsina. Así como la concentración de melanosomas. Se aplicó una t-student a cada variable (p < 0.05). En el caso de posturas y análisis de datos se empleó una prueba no paramétrica (Mann-Whitney).

Resultados

Tabla 1.- Mediciones realizadas en el hepatopancreas de juveniles de *Panulirus argus* agrupados en sanos y enfermos con PaV1 (p < 0.05).

Variable	Sanos	Enfermos	p
Peso (mg)	10,130 ± 3,782	17,047 ± 5,839	0,032
Glucosasa	7,710 ± 7,126	4,284 ± 6,079	0,173
Amilasa	0,735 ± 1,666	5,977 ± 0,085	0,288
Lipasa	10,048 ± 7,766	11,818 ± 11,384	0,735

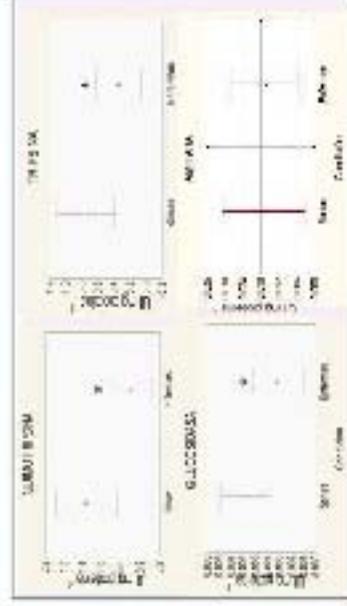


Figura 1.- Actividad enzimática en el hepatopancreas de juveniles de *Panulirus argus* en patrones sanos y enfermos con PaV1. Diferencias significativas * (p < 0.05).

CONCLUSIONES

Las langostas enfermas presentaron una alteración significativa en la actividad enzimática del hepatopancreas (excepto en la amilasa), mejorando el daño hepático y la depresión de la capacidad digestiva asociados al proceso infeccioso con PaV1.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecemos a Tzucir Arana, Jairo Córdova y Yelitza Mendieta por sus comentarios respecto a los datos. El primer autor desea agradecer a través de mensajes de Facebook a: @votid y @colacmar.

Efecto de la infección natural con PaV1 sobre la concentración de hemocitos de juveniles de langosta espinosa *Panilirus argus* en dos poblaciones del Caribe mexicano

Herrera-Salvatierra N; Pascual-Jiménez C

Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Ciencias, Puerto de Abrigo s/n. Sisal, Hunucmá, Yucatán, México

No se conocía la presencia de enfermedades virales en ninguna especie de langosta, hasta el 2003 cuando se descubrió el primer virus patógeno que infecta a langostas espinosas *P. argus*, virus denominado PaV1. Es poca la información disponible sobre el virus PaV1 y sus efectos patológicos en las langostas *P. argus*, se han hecho estudios relacionados a su prevalencia, daños histopatológicos, vías de transmisión, sin embargo no se conoce las adaptaciones inmunológicas asociadas a dicha enfermedad en organismos silvestres.

El análisis de la hemolinfa es comúnmente usado como una herramienta de diagnóstico, el conteo total y diferencial de células circulatorias puede ser usado para monitorear respuestas fisiológicas, enfermedades, factores de estrés ambientales, etc. Los hemocitos se consideran la primera línea de defensa, ya que participan directamente en los procesos de reconocimiento, procesamiento y amplificación de la respuesta inmunitaria

Por ello, nos dimos a la tarea de determinar el efecto de la infección por PaV1 sobre la concentración de hemocitos circulatorios de juveniles de langosta espinosa.

Se capturaron juveniles de *P. argus* con y sin síntomas de la infección en dos localidades del Caribe mexicano, el parque nacional arrecife de Puerto Morelos (64 organismos) y en Bahía de la Ascensión (51 organismos), la cual forma parte de la reserva de la Biósfera "Sian Ka'an", se tomaron muestras de hemolinfa fijadas en Al sever- Formol para posteriormente determinar la concentración de hemocitos circulatorios. Se realizaron pruebas de T para contrastar las concentraciones de hemocitos entre sanas e infectadas en las dos localidades, así como una ANOVA de dos vías para determinar las diferencias entre las localidades.

Las langostas enfermas presentaron una disminución importante en la concentración de hemocitos circulatorios respecto de las sanas, a pesar de ello para las langostas de Puerto Morelos no se encontró que dicha diferencia fuera significativa en el conteo total ni en las células granulares, mientras que si fue significativa para las células semigranulares y las hialinas ($p < 0.05$). Mientras que para las Langostas de Bahía de la Ascensión la concentración total, los hemocitos semigranulares así como los hialinos fueron significativos y solo los hemocitos granulares no presentaron diferencia significativa, lo cual es congruente con trabajos anteriores que han reportado que este tipo celular no es atacado por el virus.

Al comparar las dos localidades encontramos que los subtipos celulares granulares y semigranulares no presentan diferencias entre los diferentes lugares de muestreo, solo por la condición (sana- infectada); sin embargo en el caso de las hialinas y la concentración total la localidad también aporta una diferencia significativa ($p < 0.05$)



BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF THE DIGESTIVE GLAND OF THE SPINY LOBSTER, *Panulirus argus*, INFECTED BY PaV1



Hemera-Salvatierra N¹, Huchin-Mian JP², Rodríguez-Carull R³, Briones-Louzan P⁴, Lozano Álvarez L⁵, Pascual C⁶
salvatierra_n@hotmail.com

¹ Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Ciencias, Puerto de Arroyo s/n, Guay, Hunucmá, Yucatán, México
² Laboratorio de Inmunología y Biología Molecular, CINVESTAV-IPN, Unidad Mérida, Km. 6 Antigua Carretera a Progreso, Mérida, Yucatán, México
³ Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Unidad Académica Puerto Morelos, Cárdenas 300, Mérida
⁴ Universidad Nacional Autónoma de México, Programa de Ciencias del Mar y Limnología, Circuito Exterior s/n Ciudad Universitaria México, DF, México

Introduction

Aquaculture of spiny lobsters has been attempted many times over the last 60 years. To day, Vietnam is the major producer of farmed lobsters, and is completely dependent on wild caught juveniles for stocking and trash fish for feeding. Both of these practices offer major challenges to the sustainability of the lobster farming. *Panulirus argus* has been affected by a highly pathogenic virus known as *Panulirus argus Virus 1* (PaV1). PaV1 appears to be widespread in the Caribbean, and present a high level of pathogenicity. Despite the important information obtained through experimental infections, little is known about the physiological responses in naturally infected *P. argus*. In this study, we evaluated the effect of the infection on enzymatic activity and metabolites of the digestive gland of lobsters naturally infected with PaV1.



Results

Table 1. Specific activity of the digestive enzymes and metabolites of *Panulirus argus* healthy and infected by PaV1

Unit of Pmt.	Healthy (N,15)	Infected (N,17)	p
	Mean ± S. D.	Mean ± S. D.	
Trypsin	8507 ± 7056	7010.93 ± 3471	<0.05
Chytrypsin	12250 ± 12525	3664 ± 4356	<0.05
Amylase	0.01 ± 0.01	0.006 ± 0.003	0.18
Glucosidase	0.02 ± 0.01	0.14 ± 0.032	0.19
Protease	1270 ± 1447	560 ± 644	<0.01
mg / dl			
Glucose	2.61 ± 2.1	1.33 ± 2.045	<0.01
Acetylcholin	1.47 ± 0.76	0.716 ± 0.599	<0.01
Cholesterol	5.17 ± 7.13	1.795 ± 1.311	<0.01
Protein	51.06 ± 12.74	70.14 ± 11.03	0.65

Methods



PaV1 infection was confirmed by PCR. Grade of infection was determined by histology. Grade 1 Lightly infected. Grade 2 Moderately infected. Grade 3 Heavily infected.

32 lobsters, healthy (15) and with signs of the disease (17), were caught by scuba in Bahía de la Ascensión, Quintana Roo, México. Digestive gland was obtained and analyzed the activity of total proteases, glucosidase, amylase, trypsin and chymotrypsin, for each enzyme was determine optimal pH and temperature. The levels of proteins, glucose, cholesterol and acylglycerols were determined using commercial kits. A ANOVA test was done to identify differences among "healthy" and "infected" animals.

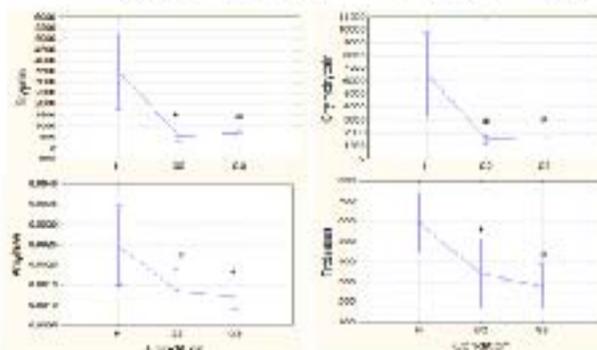


Fig. 1 Enzymatic activity (U/mg Pmt) in the digestive gland of juveniles *Panulirus argus*; healthy, moderately and heavily infected with PaV1. Significant differences * (p < 0.05).

Conclusion

The infected lobsters displayed a significant alteration in the enzymatic activity, reflecting the tissue damage, and the depression of digestive capacity associated with the process of the infection with PaV1.

Thanks to

The authors thank Fernando Negrón Solo, Cecilia Barahona Ortiz and Juan Antonio Pérez Vega for their invaluable technical support. This study was funded by PAPIIT-DINAM project



Efecto de la infección viral (PaV1) sobre los metabolitos de la langosta espinosa del Caribe, *Panulirus argus*.

H Herrera-Salvatierra N^{1,4}; Briones-Fourzan P², Lozano-Álvarez E², Huachin-Mian J³, Rodríguez-Canul R³, Pascual Jiménez C¹

1 Facultad de Ciencias, Unidad Sisal, UNAM

2 Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Unidad Puerto Morelos, UNAM

3 Laboratorio de Biología Molecular e Inmunología, Unidad Mérida, CINVESTAP

4 Posgrado de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM

Palabras clave: *Panulirus argus*, infección viral, hepatopancreas

INTRODUCCIÓN.

PaV1 es la primera infección viral reportada para la langosta espinosa, *Panulirus argus*. Primero fue detectada en Florida, USA (Shields and Behringer, 2004) y después en el Caribe Mexicano (Huchin-Mian et al., 2008). Algunos aspectos de la infección han sido descritos a través de infecciones experimentales, pero aun se desconocen muchos aspectos fisiológicos e inmunológicos vinculados con la enfermedad en organismos infectados naturalmente. El objetivo de este estudio fue determinar el efecto de la infección PaV1 sobre los metabolitos plasmáticos y de la glándula digestiva de los juveniles de *P. argus*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Treinta y tres langostas sanas y veintitrés con signos de la infección (hemolinfa lechosa, coloración rojiza y letargia), fueron capturadas en el arrecife de Puerto Morelos, Quintana Roo, México en julio de 2009. Los organismos fueron transportados al laboratorio y sacrificados para la obtención de tejido. Se confirmó la infección y el nivel de severidad (ligero, moderado y avanzado) por análisis histológico (número de inclusiones virales y alteraciones en el tejido) y por PCR. Se utilizaron pruebas de diagnóstico clínico para determinar la concentración de proteínas, glucosa, colesterol y acilglicéridos en el plasma y en la glándula digestiva. Se aplicó una ANOVA para determinar las diferencias entre los grados de infección para cada variable. Se consideró significativa una $p \leq 0.05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

La concentración de los metabolitos se vio afectada por el proceso infeccioso de PaV1. En el plasma aumentó significativamente la glucosa, el colesterol y los acilglicéridos de acuerdo al grado de severidad de la infección, indicando daño tisular en la glándula digestiva. La concentración de proteínas no varió de manera significativa, pero se observa una

disminución en el grupo de langostas con infección moderada. En la glándula digestiva se registró una disminución significativa ($p \leq 0.05$) en la concentración de glucosa de las langostas con mayor grado de severidad. Este patrón puede estar señalando el desgaste metabólico y la afectación en la conducta alimenticia debido a la baja actividad que acompaña los niveles avanzados de la enfermedad. En el caso de las proteínas y los lípidos en la glándula digestiva no se observaron cambios significativos con el nivel de severidad, lo cual puede estar relacionado a que las evaluaciones detectan metabolitos solubles, y posiblemente los lípidos y proteínas estructurales señalen más adecuadamente los efectos dañinos de la infección sobre este órgano.

CONCLUSIONES.

La infección por PaV1 afecta considerablemente la concentración de los metabolitos plasmáticos y presenta una relación con el avance de la enfermedad. Los altos niveles de colesterol, acilglicéridos y glucosa denotan el daño en la glándula digestiva conforme avanza el proceso de infección.

LITERATURA CITADA.

Shields JD, Behringer DC Jr (2004) A new pathogenic virus in the Caribbean spiny lobster *Panulirus argus* from the Florida Keys. *Dis Aquat Org* 59:109-118

Huchin-Mian, J. P., Briones-Fourzán, P., Simá-Álvarez, R., Cruz-Quintana, Y., Pérez-Vega, J. A., Lozano-Álvarez, E., Pascual-Jiménez, C., Rodríguez-Canul, R., 2009. Detection of *Panulirus argus* Virus 1 (PaV1) in exported frozen tails of subadult-adult Caribbean spiny lobster *Panulirus argus*. *Dis. Aquat. Org.* 86, 159-162.

Physiological characterization of juveniles of spiny lobster, *Panulirus argus*, infected naturally by virus (PaV1)

Herrera-Salvatierra N^{1,2}, Huchin-Mian JP³, Briones-Fourzán P⁴, Lozano-Álvarez E⁴, Rodríguez-Canul R³, Pascual Jiménez C¹.

¹Facultad de Ciencias, Unidad Sisal, Universidad Nacional Autónoma de México. Puerto de Abrigo s/n, Sisal, Yucatán, 92303 México.

²Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México. Puerto de Abrigo s/n, Sisal, Yucatán, 92303 México.

³Centro de Investigación y de Estudios Avanzados–Unidad Mérida, Instituto Politécnico Nacional. Km 6 Carretera Antigua a Progreso, Cordemex, Mérida, Yuc., 97310 México.

⁴Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Unidad Académica Puerto Morelos, Universidad Nacional Autónoma de México. Prol. Av. Niños Héroes s/n, Puerto Morelos, Q. R., 77580 México.

The spiny lobster *Panulirus argus*, has been affected by a highly pathogenic virus known as *Panulirus argus* Virus 1 (PaV1). PaV1 appears to be widespread throughout the Caribbean region. Macroscopic signs of PaV1 infection are milky hemolymph that lacks the ability to clot, reddish carapace and lethargy. Despite the important information obtained through experimental infections, little is known about the physiological responses in naturally infected *P. argus*. The aim of this study was to evaluate with immunological parameters and plasmatic metabolites the effect of PaV1 on natural infections. Sixty-seven lobsters; 36 healthy and 31 with signs of PaV1 infection were caught by scuba diving in Puerto Morelos, Mexico (20°51' N, 86°53' W) and transported alive to the laboratory. PaV1 infection was confirmed through histological observations and PCR. The variables: total hemocyte count, hemagglutination, phenoloxidase activity, respiratory burst and plasmatic metabolites (proteins, glucose, cholesterol and acylglycerol) were analyzed with an ANOVA to identify differences between healthy and infected lobsters (grades of infection: lightly (1), moderately (2) and heavily infected (3) were assessed by histology). Significant alterations ($p < 0.05$) of total hemocytes counts, phenoloxidase activity, hemagglutination, and respiratory burst, and high levels of cholesterol, glucose and acylglycerols were among the most reliable effects observed in the infected lobsters suggesting metabolic alterations and presumed immunosuppression. Understanding the process of infection is extremely important to understand the development of infection in natural conditions and also to assess epidemiological studies of PaV1.