



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA

**DINÁMICA DE LA ENFERMEDAD VIRAL PaV1 (*Panulirus argus* virus 1)  
EN HÁBITATS CON REFUGIOS ARTIFICIALES ('CASITAS') PARA  
JUVENILES DE LANGOSTA *Panulirus argus***

TESIS  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**DOCTORA EN CIENCIAS**

PRESENTA:  
**M. EN C. REBECA ILIANA CANDIA ZULBARÁN**

DIRECTORA DE TESIS  
**DRA. PATRICIA DOLORES BRIONES FOURZÁN**  
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA  
UNIDAD ACADÉMICA DE SISTEMAS ARRECIFALES, UNAM, PUERTO MORELOS

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTORAL  
**DR. ERIC JORDÁN DAHLGREN**  
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA  
UNIDAD ACADÉMICA DE SISTEMAS ARRECIFALES, UNAM, PUERTO MORELOS

**DRA. MAITE MASCARÓ MIQUELAJÁUREGUI**  
FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIDAD MULTIDISCIPLINARIA DE DOCENCIA E INVESTIGACIÓN, UNAM, SISAL

**DRA. SILVIA GÓMEZ JIMÉNEZ**  
LABORATORIO DE FISIOLÓGIA DE INVERTEBRADOS MARINOS  
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO, UNIDAD HERMOSILLO

**DRA. ROSSANNA DEL PILAR RODRÍGUEZ CANUL**  
CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL  
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL, UNIDAD MÉRIDA

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., AGOSTO DE 2020.



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.



Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología



Universidad Nacional Autónoma de México

**Dinámica de la enfermedad viral PaV1 (*Panulirus argus* virus 1)  
en hábitats con refugios artificiales ('casitas') para juveniles de  
langosta *Panulirus argus*)**

**T E S I S**

que para obtener el grado académico de

Doctora en Ciencias  
(Biología Marina)

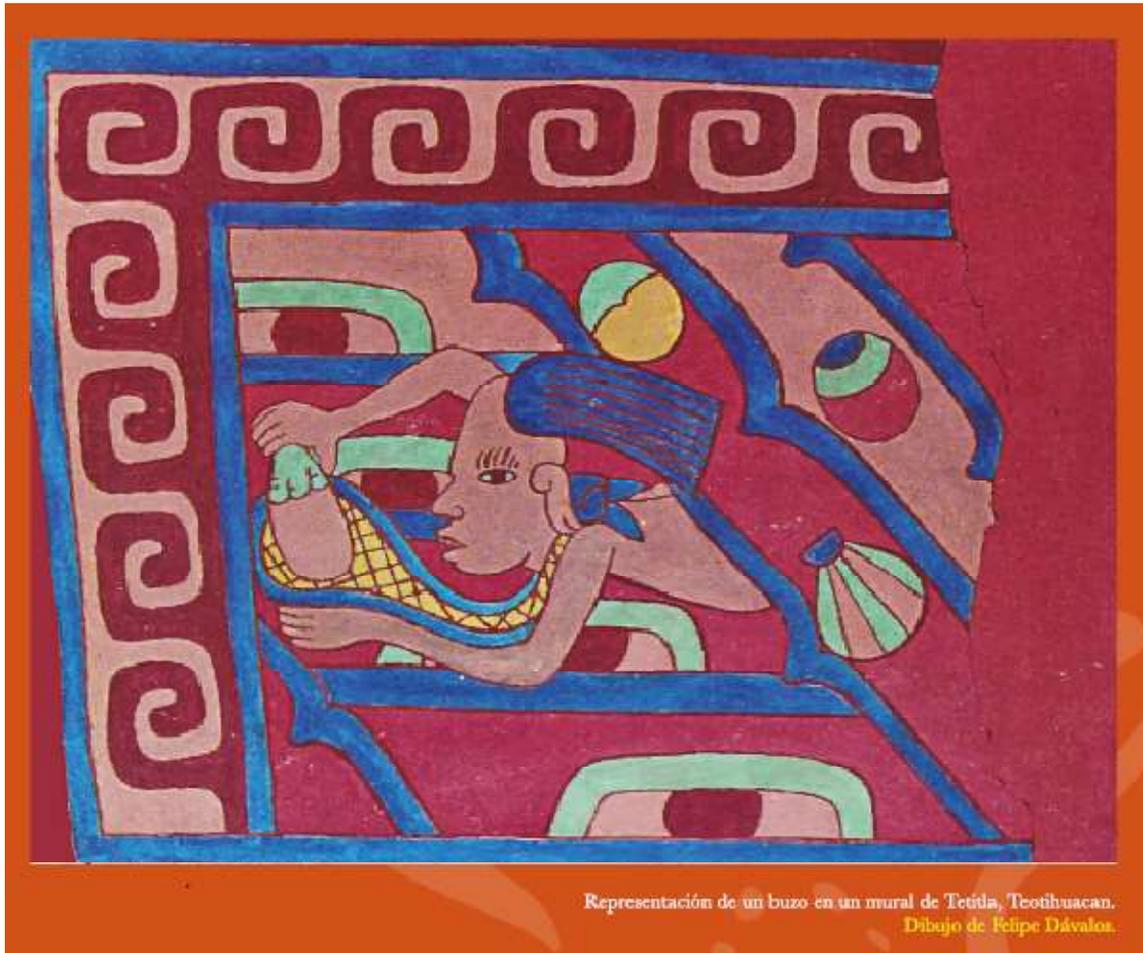
p r e s e n t a

M. en C. Rebeca Iliana Candia Zulbarán

Directora de Tesis: Dra. Patricia Dolores Briones Fourzán

Comité tutorial: Dr. Eric Jordán Dahlgren  
Dra. Maite Mascaró Miquelajáuregui  
Dra. Silvia Gómez Jiménez  
Dra. Rossanna del Pilar Rodríguez Canul

Puerto Morelos, Quintana Roo, agosto de 2020.



Representación de un buzo en un mural de Tetitla, Teotihuacan.  
Dibujo de Felipe Dávalos.

(Tomado de Zúñiga-Arellano et al., 2019)

## Contenido

	Pág.
Agradecimientos.....	7
Índice de Figuras.....	9
Índice de Tablas.....	11
Resumen.....	13
Abstract.....	15
<b>Capítulo 1: Introducción General.....</b>	<b>17</b>
Las langostas espinosas.....	17
Historia de vida de <i>Panulirus argus</i> .....	18
Importancia del refugio para <i>P. argus</i> .....	20
Los refugios artificiales y las “casitas”.....	21
Las enfermedades y el sistema inmune en los crustáceos.....	23
Enfermedades de langostas.....	25
La enfermedad viral <i>Panulirus argus</i> virus 1 (PaV1).....	25
Descubrimiento de la enfermedad viral PaV1.....	26
Influencia de PaV1 en el comportamiento gregario de <i>P. argus</i> .....	28
Planteamiento del tema y estructura de la tesis.....	31
<b>Capítulo 2: Influencia de señales químicas emitidas por langostas enfermas con PaV1 en la elección de refugios por co-específicos sanos.....</b>	<b>33</b>
Introducción.....	33
Materiales y métodos.....	34
Colecta de langostas.....	36
Diseño experimental.....	37
Detección del ADN de PaV1 por PCR.....	38
Tratamientos experimentales.....	40
Resultados.....	42
Discusión.....	43
<b>Capítulo 3: Efecto del uso de refugios artificiales ‘casitas’ en la prevalencia de la enfermedad PaV1 en juveniles de <i>Panulirus argus</i>.....</b>	<b>49</b>

Introducción.....	49
Área de Estudio.....	53
<b>Etapa 1:</b> Efecto de las casitas en la densidad de juveniles de <i>P. argus</i> y prevalencia de individuos clínicamente infectados con PaV1.....	55
Objetivos e Hipótesis.....	55
Material y Métodos.....	56
Diseño experimental y muestreo de langostas.....	56
Análisis estadísticos.....	58
Resultados.....	58
Densidad.....	58
Talla Media.....	59
Prevalencia.....	60
Relación entre densidad y prevalencia clínica de PaV1.....	62
<b>Etapa 2:</b> Efecto de la remoción de individuos enfermos en los niveles de prevalencia de la enfermedad PaV1.....	63
Hipótesis.....	64
Material y Métodos.....	64
Análisis estadístico.....	65
Resultados.....	65
Discusión.....	67
<b>Capítulo 4. Distribución de langostas sanas y enfermas en casitas y refugios naturales.....</b>	<b>72</b>
Introducción.....	72
Objetivo e Hipótesis.....	74
Materiales y Métodos.....	75
Patrones de ocupación de casitas vs refugios naturales.....	75
Análisis estadísticos.....	76
Uso del espacio interior de las casitas cohabitadas por langostas sanas y enfermas.....	79
Resultados.....	80
Patrones de ocupación de casitas vs refugios naturales.....	80
Ocupación de casitas y de refugios grandes por langostas sanas y enfermas.....	80
Distribución de langostas en casitas y en refugios grandes (sitios con	82

casitas).....	
Distribución de langostas en refugios grandes (sitios sin casitas).....	83
Selección y promediado de modelos.....	83
Uso del espacio interior de las casitas cohabitadas por langostas sanas y enfermas.....	86
Discusión.....	89
<b>Capítulo 5. Confirmación de las medidas de validez de la evaluación visual de signos clínicos de la infección por PaV1 en juveniles de langosta <i>Panulirus argus</i> en la laguna arrecifal de Puerto Morelos.....</b>	<b>95</b>
Introducción.....	95
Objetivos.....	98
Materiales y Métodos.....	99
Captura de langostas y obtención de las muestras.....	99
Análisis de datos.....	100
Sensibilidad y especificidad de la observación clínica de la enfermedad PaV1.....	100
Valores predictivos de la prueba.....	101
Resultados.....	102
Discusión.....	104
<b>Capítulo 6: Discusión General y Conclusiones.....</b>	<b>109</b>
Principales aportaciones de este trabajo.....	110
Limitaciones del trabajo y recomendaciones.....	115
Conclusiones.....	118
<b>Referencias.....</b>	<b>120</b>
Anexo I.....	138
Anexo II.....	144

## **Agradecimientos**

Al Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología, de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por el otorgamiento de la Beca (No. de Beca: 322026) para la realización de estudios de Doctorado durante el período de 2011-2015, y por el financiamiento al proyecto 101200 otorgado a P.B.F.

A la Unidad Académica de Sistemas Arrecifales – Puerto Morelos del ICMYL-UNAM, por el apoyo y facilidades otorgadas para la realización de este trabajo. Así mismo por el apoyo de hospedaje en la Unidad Habitacional durante el período de 2011-2013.

Al Laboratorio de Ecología de Crustáceos de la UASA, por la Beca Crustáceos como apoyo para la graduación.

A la Doctora Patricia Briones Fourzán, por su paciente y constructiva dirección y conducción de este trabajo, por impulsarme a mejorar académicamente y por creer en mi potencial.

A los miembros del Comité Tutoral y a los miembros del Jurado de Examen Dra. Maité Mascaró Miquelajáuregui y Dr. Eric Jordán Dalhgren; Dra. Rossanna Rodríguez Canul y Dra. Silvia Gómez por las críticas, observaciones y recomendaciones oportunas y constructivas a este trabajo de Tesis.

Al Dr. Enrique Lozano Álvarez por el apoyo académico y las observaciones constructivas a este trabajo.

A los técnicos académicos, M. en C. Cecilia Barradas Ortiz por su invaluable apoyo durante el trabajo de campo y en la elaboración, mantenimiento y manejo de las bases de datos; M. en C. Fernando Negrete Soto, por su apoyo en la logística de los muestreos y trabajo de campo, así como también por la instrucción para ser más independiente durante las planeaciones de los muestreos y durante los buceos. En cuanto COVID-19 nos dé chance de hacer sociales, les pagaré las chelas que les debo desde la maestría.

A Juan Pablo Huchin Mian y la Dra. Iris Segura García por su apoyo paciente durante el aprendizaje del protocolo de PCR y también en el trabajo de campo; a Alí Espinosa Magaña, Rogelio Martínez Calderón, Rubén Muñoz de Cote Hernández, Leslie Cid González, Nelia Luviano Aparicio, Roberto González Gómez, Dra. Piedad Sánchez-Morillo Velarde, todos ellos excelentes compañeros de laboratorio, por su invaluable apoyo con los muestreos y los experimentos en los estanques.

A la Dra. Tania Islas Flores y a Mario Fernando Ortiz Matamoros, por las asesorías con los experimentos moleculares.

Al M. en C. Edgar Escalante Mancera y al M. en C. Miguel Ángel Gómez Reali que varias veces me ayudaron a rescatar a la computadora y me salvaron de quedarme sin nada.

Al Sr. Rafael y a la M. en C. Laura Celis Gutiérrez, responsables de la biblioteca, por su apoyo con material de consulta, pero sobre todo con el libro de estadística que casi casi estaba por adoptar.

A Leslie por ser la mejor compañera de cubículo y amiga de picaditas de colación. Cada vez que podamos seguiremos bailando "La Rebelión".

Al club de baile de la UASA, de los viernes en Las Miches, esa época fue excelente con Óscar, Leslie, Mary, Gabi, Nancy Pérez, Nancy Escandón, Yis, Ale, Lalo, Parme, Raúl, Lili, Vero y Jaime.

A todos los amigos y familiares, por su contribución a la recuperación integral de mi salud. Así mismo, también agradezco a los amigos y compañeros de la UASA, por aquella inesperada kermés, Gracias Gabi Pecas y Esme por la organización.

A mi familia, mis padres Angélica y Gustavo y mi hermana Adriana Isabel, mi Bichita Hermosa, por ser mi soporte vital durante mi tratamiento contra el cáncer de mama, por su amorosa paciencia, por confiar en que sí podría terminar este ciclo y aquí está este otro nuevo logro, es para ustedes.

A las psicooncólogas del Instituto Nacional de Cancerología, la Psic. Yoatzin Vega, la Dra. en Psic. Nancy Ariadna Acosta Santos y la Psic. Jazmín Edith Hernández Marín, por las horas de intervención y acompañamiento y sus valiosísimos y oportunos consejos que me permitieron manejar mi temor a la incertidumbre favoreciendo a que me encaminara de nuevo en lo que me gusta.

A mis amigas del INCan, compañeras de lucha rosa, que cuando les platico sobre las langostas y el fondo del mar, me han servido de audiencia para practicar para el examen de grado.

## Índice de Figuras

<b>FIGURA</b>	<b>Pág.</b>
<b>Fig. 1.1.</b> Distribución de la langosta espinosa del Caribe <i>Panulirus argus</i> .....	17
<b>Fig. 1.2.</b> Casita experimental (más pequeña que las utilizadas para la pesca) para juveniles de <i>Panulirus argus</i> a) sobre un pastizal y b) detalle de la estructura.....	23
<b>Fig. 1.3.</b> Signos macroscópicos de la enfermedad viral PaV1 en langostas <i>Panulirus argus</i> : a) hemolinfa lechosa, b) hemolinfa que no coagula, c) decoloración rojiza del exoesqueleto y d) supresión de la muda evidente por colonización de epibiontes.....	27
<b>Fig. 2.1.</b> Representación esquemática de los laberintos en Y experimentales utilizados para probar la respuesta de langostas <i>Panulirus argus</i> no infectadas a refugios que emanaban señales químicas de co-específicos en cuatro condiciones diferentes.....	39
<b>Fig. 2.2.</b> Resultados del experimento con laberintos en Y para investigar los efectos de señales químicas sobre <i>Panulirus argus</i> en cuatro condiciones diferentes en la elección de refugio por co-específicos no infectados. La línea horizontal punteada indica la elección del refugio al azar (50%).....	43
<b>Fig. 3.1.</b> (A) Ubicación de Puerto Morelos en México y el Caribe. (B) Esquema de la laguna arrecifal de Puerto Morelos mostrando los sitios de muestreo. Los cuadros blancos representan los 5 sitios sin casitas y los cuadros negros representan los 5 sitios con casitas.....	55
<b>Fig. 3.2.</b> Densidad de langostas ( $\ln(N + 1)$ ) por tiempo de muestreo para cada uno de tratamientos ( <u>Sin</u> casitas, n = 5 sitios de 1 ha cada uno; <u>Con</u> casitas, n = 5 sitios de 1 ha cada uno). Las barras de error representan el IC 95%.....	59
<b>Fig. 3.3.</b> Talla media de langostas por tiempo de muestreo, para cada uno de los tratamientos ( <u>Sin</u> casitas, n = 5 sitios de 1 ha cada uno; <u>Con</u> casitas, n = 5 sitios de 1 ha cada uno). Las barras de error indican el IC 95%.....	60
<b>Fig. 3.4.</b> Prevalencia de la enfermedad PaV1 (% langostas con signos clínicos de la enfermedad) por periodo de muestreo en el conjunto de sitios de cada Tratamiento ( <u>Sin</u> casitas, n = 5 sitios de 1 ha cada uno; <u>Con</u> casitas, n = 5 sitios de 1 ha cada uno). Las barras de error indican el IC 95%.....	62
<b>Fig. 3.5.</b> Relación entre la densidad de langostas (No. de langostas ha <sup>-1</sup> ) y la prevalencia de la enfermedad PaV1 (porcentaje de langostas con signos clínicos) en sitios con casitas	

(círculos) y sitios sin casitas (triángulos). No se incluyen los datos en los que la densidad fue menor a 5 langostas por sitio por censo (correspondientes a sitios sin casitas en todos los casos).....	63
<b>Fig. 3.6.</b> Prevalencia media de la enfermedad por Pav1 en cada uno de los 5 sitios con casitas durante la etapa 1 (10 censos) y la etapa 2 (8 censos) de muestreo. Las barras de error muestran el IC 95%.....	67
<b>Fig. 4.1.</b> Sitios con casitas. Distribución de langostas entre A) casitas y B) refugios grandes que contenían langostas sanas (muestra 1, columnas negras) o langostas sanas + enfermas (muestra 2, columnas grises). Para reducir la extensión de la gráfica, para cada tipo de muestra se agruparon las casitas que contenían más de 30 langostas. En la leyenda, n = número de casitas para cada muestra.....	82
<b>Fig. 4.2.</b> Sitios sin casitas. Distribución de langostas entre refugios naturales grandes que contenían sólo langostas sanas (muestra 1, columnas negras) o langostas sanas + enfermas (muestra 2, columnas grises). En la leyenda, n = número de refugios grandes para cada muestra.....	83
<b>Fig. 4.3.</b> Comparación de los parámetros $m$ (media: número de langostas por casita) y $k$ (índice de agregación) con sus respectivos intervalos de confianza al 95% obtenidos por promediado de modelos, para casitas y refugios grandes en los sitios con casitas, y refugios grandes en los sitios sin casitas ocupados sólo por langostas sanas y por langostas sanas con enfermas.....	86
<b>Fig. 4.4.</b> Número de casitas co-ocupadas por langostas <i>Panulirus argus</i> sanas y enfermas de PaV1 de acuerdo al número de langostas por casita (Dos, 3 a 6, 7 a 10 y más de 10)...	87
<b>Fig. 4.5.</b> Distribución de langostas entre 148 casitas co-ocupadas por langostas sanas y enfermas en las que las langostas enfermas se encontraban separadas de (n = 69 casitas) o junto a (n = 79 casitas) co-específicos sanos. Separadas, barras en color gris; Juntas, barras en color blanco). Los números dentro de los paréntesis representan el tamaño de muestra (número de casitas). Las barras de error muestran el IC 95%.....	88
<b>Fig. 5.1.</b> Distribución de tallas (en mm de longitud cefalotorácica) de langostas <i>Panulirus argus</i> que habitaban casitas experimentales en la laguna arrecifal de Puerto Morelos. Las columnas en color negro representan la fracción correspondiente a las langostas visiblemente enfermas de PaV1; las columnas en gris oscuro representan a la fracción correspondiente a las langostas sub-clínicamente infectadas con PaV1 y las columnas en blanco representan la fracción correspondiente a las langostas sanas. Los números entre paréntesis indican el tamaño de muestra.....	103

## Índice de Tablas

<b>TABLA</b>	<b>Pág.</b>
<p><b>Tabla 2.1.</b> Resumen de los cuatro tratamientos para evaluar la influencia de señales químicas emanadas por langostas en diferentes condiciones (“estímulos”) sobre la elección de refugio de langostas focales <i>Panulirus argus</i>. “No infectadas” son langostas que dieron negativo a PaV1 por PCR. “Sub-clínicamente infectadas” son langostas que dieron positivo a PaV1 por PCR pero que no mostraban signos macroscópicos de la enfermedad. “Clínicamente infectadas” eran langostas que mostraban signos clínicos de la enfermedad. Muertas y cortadas: era la mitad de una langosta recién muerta, cortada longitudinalmente.....</p>	41
<p><b>Tabla 3.1.</b> Resultados del ANOVA de medidas repetidas para la variable Densidad (No. de langostas por hectárea).....</p>	59
<p><b>Tabla 3.2.</b> Resumen del ANOVA de medidas repetidas para Talla media de langostas (LC, mm).....</p>	60
<p><b>Tabla 3.3.</b> Resumen del análisis de regresión logística para los efectos de los factores Muestreo (con 10 niveles, NOV09 a ABR12) y Tratamiento (con 2 niveles, Con casitas y Sin casitas) sobre la probabilidad de encontrar langostas enfermas (clínicamente infectadas con PaV1) en los sitios experimentales de la Laguna Arrecifal de Puerto Morelos. Ninguno de estos factores, ni su interacción, fueron significativos.....</p>	61
<p><b>Tabla 3.4.</b> Resumen del análisis de regresión logística para los efectos de los factores Etapa experimental (con 2 niveles, antes y después de remover a las langostas enfermas de cada sitio) y Sitio (con 5 niveles correspondientes a cada uno de los 5 sitios con casitas) sobre la probabilidad de encontrar langostas enfermas (clínicamente infectadas con PaV1). Solo el efecto de Sitio fue significativo.....</p>	66
<p><b>Tabla 3.5.</b> Parámetros estimados en el análisis de regresión logística para probar el efecto de la Etapa (1: antes y 2: después de remover las langostas enfermas; nivel de referencia: Etapa 2) y el Sitio (los 5 sitios con casitas: 2, 4, 5, 7 y 8; nivel de referencia: Sitio 8) en la probabilidad de encontrar langostas enfermas.....</p>	66
<p><b>Tabla 4.1.</b> Número de casitas y refugios grandes que se encontraron ocupados por tres categorías de langostas de acuerdo con la condición de salud, tanto en el conjunto de sitios con casitas como en el conjunto de sitios sin casitas.....</p>	81
<p><b>Tabla 4.2.</b> Resultados de la selección de modelos. Para cada modelo, se presenta el número de parámetros estimado, los valores de máxima verosimilitud, el criterio de Akaike</p>	

corregido para el tamaño de la muestra ( $AIC_c$ ), y el peso normalizado de Akaike ( $w_i$ ).....	84
<b>Tabla 4.3.</b> Resultados del promediado de modelos. Parámetros $m$ y $k$ para la distribución de langostas en casitas y refugios grandes de los sitios con casitas, y en refugios grandes de los sitios sin casitas, según la condición de las langostas: sólo sanas y sanas + enfermas (SE: error estándar; Lim C: límite de confianza al 95%).....	85
<b>Tabla 4.4.</b> Resumen del análisis de regresión logística para el efecto del número de langostas por casita (“categoría”, con 4 niveles: 2 langostas, 3 a 6, 7 a 10, >10 langostas) sobre la probabilidad de encontrar langostas sanas y enfermas de PaV1 de manera separada dentro de una casita.....	88
<b>Tabla 4.5.</b> Parámetros estimados en el análisis de regresión logística para probar el efecto del número de langostas por casita, con 4 niveles o “categorías”: Dos, 3 a 6, 7 a 10, >10; nivel de referencia: 7 a 10, en la probabilidad de encontrar a las langostas enfermas separadas de (vs junto a) las sanas. El nivel de referencia fue la categoría de 7a10 langostas.....	89
<b>Tabla 5.1.</b> Relación entre el resultado de una prueba diagnóstica y la presencia o ausencia de una enfermedad.....	96
<b>Tabla 5.2.</b> Resultados de la observación clínica y el análisis por PCR de langostas <i>Panulirus argus</i> para la detección de la infección por PaV1, donde VN son los Verdaderos Negativos, FN los Falsos Negativos, FP los Falsos Positivos y VP los Verdaderos Positivos.....	104

## Resumen

La langosta espinosa *Panulirus argus*, un importante recurso pesquero en la región del gran Caribe, está siendo afectada por la enfermedad causada por el *Panulirus argus* virus 1 (PaV1), que ataca principalmente a las langostas juveniles y se transmite por contacto y a través del agua. Puesto que *P. argus* es una especie altamente gregaria, el PaV1 ha causado alarma en lugares donde las langostas son pescadas utilizando *casitas*, refugios artificiales de amplias dimensiones que pueden albergar múltiples langostas. En el presente estudio se evaluaron diversos aspectos ecológicos de la enfermedad PaV1 en la población de langostas de la laguna arrecifal de Puerto Morelos, Quintana Roo. Esta laguna es rica en hábitats para asentamiento de postlarvas de *P. argus* y crecimiento de juveniles pequeños, pero pobre en refugios estructurados tipo grieta para juveniles grandes y sub-adultos, lo que aumenta el riesgo de depredación y reduce la abundancia local de langosta.

Dado que el comportamiento social de *P. argus* es mediado por señales químicas, se realizó un experimento en laboratorio para examinar la respuesta de langostas sanas a refugios de los que emanaban señales químicas de langostas sanas, sub-clínicamente infectadas, clínicamente infectadas (enfermas), o muertas. La respuesta de las langostas focales a refugios con olores de co-específicos sanos o sub-clínicamente infectados no difirió del azar. En cambio, evitaron significativamente tanto los refugios con olores de langostas enfermas como aquellos con olores de alarma de langostas muertas (80% y 85% de evitación, respectivamente), lo que sugiere que una vez que las langostas infectadas con PaV1 desarrollan los signos clínicos, su olor tiene un efecto tan repelente para sus co-específicos como el olor que emana de langostas muertas.

En el campo, se establecieron 10 sitios en la laguna arrecifal de 1 ha cada uno, en 5 de los cuales se colocaron 10 casitas de 1 m<sup>2</sup> de área cada una, mientras que los otros 5 no tenían casitas. Primero se exploró el efecto de la presencia de casitas en los niveles de prevalencia de la enfermedad, estimada con base en signos clínicos (etapa 1), y más adelante el efecto de remover regularmente a todos los individuos enfermos de las casitas en los niveles de prevalencia (etapa 2). En la etapa 1, a lo largo de 10 muestreos trimestrales, la densidad de langostas fue en promedio 8 veces más alta en los sitios con casitas que en aquellos sin casitas, pero no mostró una relación con la prevalencia clínica de PaV1. En la etapa 2, la extracción de langostas enfermas no impactó los niveles de prevalencia a lo largo de 8 muestreos adicionales, pero la probabilidad de encontrar langostas enfermas difirió entre los 5 sitios con casitas, lo que sugiere que otros factores,

tales como la presencia de reservorios potenciales del virus, podrían estar influenciando dichos niveles.

Ya que la escasez de refugios adecuados aumenta el riesgo de depredación, las langostas juveniles enfrentan la disyuntiva entre evitar compartir refugios con co-específicos enfermos y evitar el riesgo de depredación. Al comparar la ocupación por langostas entre casitas y refugios naturales grandes, se encontró una distribución de langostas más agregada en los refugios naturales, pero una mayor densidad de langostas en las casitas, donde también hubo más cohabitación entre langostas enfermas y sanas. Esto último parece ser facilitado por la amplia área de refugio que provee una casita. Sin embargo, las langostas sanas tendieron a estar separadas de las enfermas dentro de las casitas, aunque la separación disminuyó al aumentar el número de langostas en una misma casita.

Los signos clínicos de PaV1 sólo son evidentes en etapas avanzadas de la infección. Por tanto, se estimaron las medidas de validación (sensibilidad y especificidad) de dichos signos como método para estimar la prevalencia de PaV1 en la población de juveniles de la laguna arrecifal, utilizando como estándar de oro la prueba de la reacción en cadena de la polimerasa. La sensibilidad fue de 0.48 y la especificidad de 1, lo que indica que por cada langosta enferma de PaV1 hay otra langosta con infección sub-clínica y confirma la validez de aplicar un factor 2x a las estimaciones de prevalencia basadas en signos clínicos.

Los resultados del presente estudio sugieren que es posible que las langostas resuelvan el conflicto entre evitar el riesgo de depredación y evitar la enfermedad con base en la evaluación del entorno inmediato, su experiencia previa con depredadores (y enfermedades), y los costos y beneficios asociados a estas opciones conductuales, lo que podría determinar, en un momento dado, los patrones de cohabitación de langostas sanas y enfermas en el contexto de las casitas. Estos patrones, en conjunto con la posible existencia de reservorios naturales del PaV1 así como las condiciones inmunológicas de langostas, podrían estar modulando los niveles locales de prevalencia de la enfermedad.

## Abstract

The spiny lobster *Panulirus argus*, an important fishing resource throughout the wider Caribbean region, is being affected by a disease caused by *Panulirus argus* virus 1 (PaV1), which mainly attacks juvenile lobsters and is transmitted by contact and through water. Because *P. argus* is a highly gregarious species, PaV1 has raised alarm in locations where lobsters are fished with *casitas*, large artificial shelters that can harbor multiple lobsters. In the present study, several ecological aspects of the PaV1 disease were evaluated in the lobster population of the reef lagoon at Puerto Morelos, Quintana Roo. This reef lagoon is rich in habitats for postlarval settlement of *P. argus* and growth of small juveniles, but is poor in structured, crevice-type shelters for large juveniles and subadults, which increases the risk of predation and reduces the local abundance of lobsters.

As the social behavior of *P. argus* is mediated by chemical cues, a laboratory experiment was conducted to examine the response of healthy lobsters to shelters emanating chemical cues of healthy lobsters and of lobsters that were subclinically infected, clinically infected (diseased), or dead. The response of focal lobsters to shelters with chemical cues of healthy or subclinically infected conspecifics did not differ from random. In contrast, focal lobsters significantly avoided both the shelters with chemical cues of diseased and of dead lobsters (80% and 85% of avoidance, respectively), suggesting that once lobsters infected with PaV1 develop the clinical signs, their chemical cues are as repellent to conspecifics as are those emanating from dead lobsters.

In the field, 10 sites (of 1 ha each) were delimited in the reef lagoon and 10 *casitas* (1 m<sup>2</sup> in surface area each) were deployed in 5 of these sites, leaving the other 5 without *casitas*. First, the effect of the presence of *casitas* on the levels of disease prevalence, estimated based on clinical signs, was explored (stage 1), followed by the effect of the regular removal of all diseased lobsters from *casitas* on prevalence level (stage 2). In stage 1, throughout 10 samplings conducted every 3 months, lobster density was on average 8 times higher on sites with *casitas* than on sites with no *casitas*, but showed no relationship with disease prevalence levels. In stage 2, removal of diseased lobsters did not impact prevalence levels throughout 8 additional samplings, but the probability of finding diseased lobsters differed among the 5 *casita* sites, suggesting that other factors, such as the presence of potential viral reservoirs, might be influencing such levels.

Because the scarcity of adequate shelters increases the risk of predation, juvenile lobsters have to make a trade-off between sharing shelters with diseased conspecifics and avoiding predation risk. Upon comparing the occupancy by lobsters between casitas and natural large shelters, it was found that the distribution of lobsters was more aggregated in natural shelters, but the density of lobsters was higher in casitas, which also exhibited higher levels of cohabitation of healthy and diseased lobsters. The latter appears to be facilitated by the wide refuge area provided by casitas. However, healthy lobsters tended to be segregated from diseased lobsters in casitas, although the segregation decreased as the number of lobsters increased in a given casita.

Clinical signs of PaV1 are only evident when the infection is in an advanced stage. Therefore, an assessment of the validation measures (sensitivity and specificity) of clinical signs as a method to estimate PaV1 prevalence in the population of juvenile lobsters in the reef lagoon was performed, using the polymerase chain reaction assay as the golden standard. Sensitivity was 0.48 and specificity was 1, indicating that for every visibly diseased lobster there is another subclinically infected lobster and confirming the validity of applying a factor of 2x to prevalence estimates based on clinical signs.

Results of the present study suggest that lobsters possibly resolve the conflict between avoiding the risk of predation and avoiding disease based on the assessment of their surroundings, their previous experience with predators (and disease), and the costs and benefits associated with these behavioral options, which could determine, on any given time, the patterns of cohabitation of healthy and diseased lobsters in the context of casitas. These patterns, in conjunction with the potential existence of natural reservoirs of PaV1 and the immunological condition of lobsters, could be modulating the local levels of the PaV1 disease prevalence.

## Capítulo 1. Introducción general

### Las langostas espinosas

Las langostas palinúridas o langostas espinosas (Crustacea: Decapoda: Achelata: Palinuridae) se encuentran ampliamente distribuidas en todos los mares tropicales y templados y suelen ser los decápodos más grandes y dominantes en los hábitats que ocupan. Chan (2010) reconoció 58 especies de langostas espinosas, la mayoría de las cuales tienen importancia pesquera (Holthuis, 1991). Sin embargo, cerca del 50% de la captura total mundial de langostas espinosas está constituida por *Panulirus argus* (Latreille, 1804), conocida como langosta del Caribe (Lipcius y Eggleston, 2000; Phillips et al., 2013). La distribución geográfica de *P. argus* abarca una extensa porción del Atlántico occidental, desde Carolina del Norte (EE.UU.) hasta Venezuela y todas las Antillas, las islas Bahamas y Bermuda (Holthuis, 1991) (Fig. 1.1). Hasta hace poco se consideraba que su distribución abarcaba hasta Río de Janeiro, Brasil, pero Giraldes y Smyth (2016) establecieron la presencia de otra especie, *P. meripurpuratus*, al sur de la pluma del Orinoco-Amazonas. En México, *P. argus* se encuentra distribuida principalmente en los estados de Quintana Roo y Yucatán (Briones-Fourzán y Lozano-Álvarez, 2000).

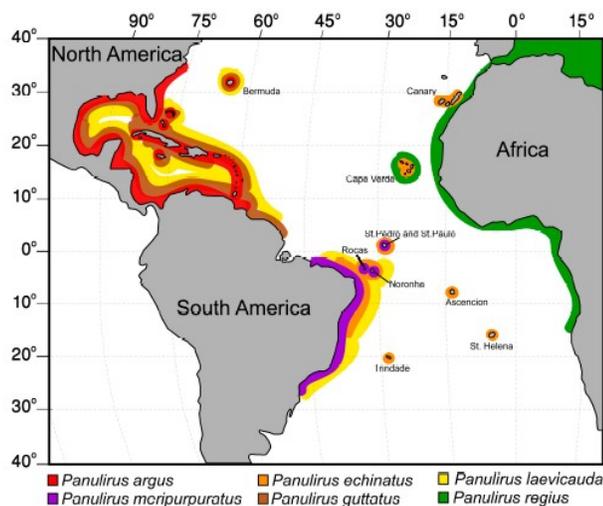


Figura 1.1. Distribución de la langosta espinosa del Caribe *Panulirus argus* (en rojo) y otras langostas del género *Panulirus* en el Océano Atlántico (Tomado de Giraldes y Smyth, 2016).

La langosta espinosa *Panulirus argus* es uno de los recursos pesqueros más valiosos en el Atlántico Noroccidental. Las capturas de *P. argus* han venido decayendo desde 2000, debido posiblemente a la combinación de la sobreexplotación, cambios en el medio ambiente y condiciones ecológicas que han impactado los hábitats de las langostas (Ehrhardt et al., 2011). Sin embargo, otra causa potencial de la disminución en las capturas de *P. argus* es la enfermedad causada por el virus patogénico *Panulirus argus* Virus 1 (PaV1) (Shields y Behringer, 2004), el cual desde su descubrimiento en 1999 se ha reconocido como una fuente importante de mortalidad de juveniles de *P. argus* (Moss et al., 2013). Un aspecto importante de la infección por PaV1 es que afecta principalmente a langostas juveniles y por tanto su persistencia puede pasar desapercibida en pesquerías que se enfocan a la captura del segmento poblacional constituido por adultos (Behringer et al., 2012; Huchin-Mian et al., 2013), los cuales pueden ocupar hábitats diferentes a los de los juveniles debido a movimientos a lo largo de su ciclo de vida.

### **Historia de vida de *Panulirus argus***

El ciclo de vida de *Panulirus argus* se divide en cinco fases: 1) embrión (dentro del huevo), 2) larva (“filosoma”), 3) postlarva (“puerulo”), 4) juvenil, y 5) adulto (Butler y Herrnkind, 1997). La fase larvaria de *P. argus* es planctónica y comprende 10 estadios larvarios con una duración total de entre 5 y 9 meses (Goldstein et al., 2008). En todos los palinúridos, tanto el desarrollo larvario como la metamorfosis a postlarva ocurren en aguas oceánicas (Phillips y McWilliam, 2009). Luego de la metamorfosis, las postlarvas nadan activamente hacia zonas costeras someras, donde se asientan entre la vegetación marina y adquieren hábitos bénticos.

Unos cuantos días después de asentarse, las postlarvas mudan e inicia la fase juvenil. En el caso de *P. argus*, la fase juvenil ha sido subdividida en tres “fases ecológicas” debido a que estas langostas presentan cambios ontogenéticos de hábitat y

de comportamiento antes de la maduración sexual. Dichas fases son: juvenil temprano (~6 mm a 15-25 mm de Longitud Cefalotorácica, LC), juvenil tardío (15-25 mm a 35-45 mm LC), y sub-adulto (35-45 mm a 75-80 mm LC) (Butler et al., 2006). Los juveniles tempranos se encuentran ampliamente dispersos en el hábitat de asentamiento y muestran un comportamiento asocial (solitario), pero unos meses después los juveniles tardíos emergen de la vegetación para buscar refugios estructurados tipo “grieta” dentro de o adyacentes al hábitat vegetal, donde se resguardan durante el día, y muestran hábitos gregarios que persisten durante el resto de su vida béntica (Childress y Herrkind, 1996; Butler y Herrkind, 2000). Los sub-adultos migran hacia los arrecifes coralinos, hábitat que comparten con los adultos, aunque estos últimos pueden moverse ampliamente y usar diversos tipos de hábitat hasta profundidades de ~100 m (Lozano-Álvarez et al., 1991a; Lipcius y Eggleston, 2000).

Todas las fases bénticas de *P. argus* son de hábitos nocturnos y su alimentación es omnívora, aunque principalmente consumen pequeños invertebrados tales como moluscos, crustáceos y equinodermos (Briones-Fourzán et al., 2003, 2019; Nizinski, 2007). Por otro lado, una gran variedad de animales, en particular peces arrecifales y pulpos, pueden consumir langostas. La depredación es la principal causa de mortalidad de los juveniles tempranos, pero la vulnerabilidad a la depredación de las langostas disminuye conforme aumenta su talla (Smith y Herrkind, 1992; Herrkind et al., 1999).

Muchas especies de langostas espinosas muestran un comportamiento gregario, el cual es mediado por señales químicas intraespecíficas (Zimmer-Faust et al., 1985; Ratchford y Eggleston, 1998; Nevitt et al., 2000; Horner et al., 2006; Aggio y Derby, 2011). Aunque se desconoce la identidad química de dichas señales, se ha determinado que son liberadas con la orina (Horner et al., 2006). Sin embargo, la atracción química *per se* no genera gregarismo, a menos que los beneficios funcionales de la agregación superen los costos (Loehle, 1995; Childress, 2007). Entre los beneficios que la agregación puede

otorgar se encuentran una mayor eficiencia en la explotación de refugios disponibles (Childress y Herrnkind, 2001), una reducción del riesgo de depredación (Dolan y Butler, 2006; Childress 2007), un incremento en la eficiencia del forrajeo (Lozano-Álvarez, 1995; Briones-Fourzán et al., 2007), y mayores oportunidades reproductivas (Childress, 2007). Por otro lado, los costos de la agregación incluyen un incremento potencial de endogamia (disminución de la diversidad genética), aumento en la competencia y la agresión intraespecífica, y en particular una mayor transmisión de parásitos y enfermedades (Loehle, 1995; Lafferty et al., 2004; Childress, 2007; Coulson et al., 2018). De esta manera, tanto los individuos que ya están ocupando un refugio como los que están en busca de refugio están sujetos a los riesgos y beneficios potenciales de compartir un refugio con co-específicos. En *P. argus*, la capacidad de producir y detectar señales químicas intraespecíficas ya existe en individuos de 15 mm LC, lo que coincide aproximadamente con el primer cambio de hábitat béntico (de la vegetación marina a los refugios estructurados tipo grieta) (Ratchford y Eggleston, 1998).

### **Importancia del refugio para *P. argus***

La depredación es la principal causa de mortalidad natural entre los juveniles de langosta y el refugio es uno de los principales recursos limitantes para estos organismos (Butler y Herrnkind, 1997). Si bien la vegetación marina puede conferir refugio a los juveniles tempranos de *P. argus* (Butler et al., 1997, Briones-Fourzán y Lozano-Álvarez, 2001a; Fuentes-Breña, 2010), su nivel de protección va disminuyendo conforme los individuos crecen. Cuando la vegetación deja de conferir protección, sobreviene el cambio de hábitat a los refugios tipo grieta (Childress y Herrnkind, 1996, 2001; Lipcius et al., 1998; Lozano-Álvarez et al., 2009). En particular, si las dimensiones del refugio permiten la agregación de individuos en un intervalo de tallas amplio, la mortalidad per cápita tiende a disminuir porque los individuos pequeños se benefician de las mayores habilidades

defensivas, tanto individuales como colectivas, de los individuos más grandes (Eggleston y Lipcius, 1992; Briones-Fourzán et al., 2007; Briones-Fourzán y Lozano-Álvarez, 2008). Esto se debe a que el comportamiento social gregario de *P. argus* incluye la defensa grupal del refugio (Herrnkind, 1980; Herrnkind et al., 1999; Dolan y Butler, 2006; Briones-Fourzán et al., 2006). Pero como las langostas espinosas no pueden construir ni modificar sus propios refugios, pueden producirse cuellos de botella en la demografía local en aquellos lugares donde la disponibilidad de refugios es limitada (Caddy, 2005). Por tanto, hay mucho interés en paliar esta limitación a través del uso de refugios artificiales (Eggleston et al., 1990; Briones-Fourzán y Lozano-Álvarez, 2001; Briones-Fourzán et al., 2007; Gittens y Butler, 2018).

### **Los refugios artificiales y las casitas**

A mediados del siglo XX, pescadores cubanos empezaron a utilizar estructuras artificiales para explotar el comportamiento gregario de *P. argus* y facilitar así su captura (Cruz y Phillips, 2000). Más adelante, hacia finales de la década de 1960, esta técnica fue adoptada por pescadores mexicanos en las Bahía de la Ascensión y Espíritu Santo, en Quintana Roo (Lozano-Álvarez et al., 1991b; Briones-Fourzán et al., 2000), y hacia la década de 1990 por pescadores de las Bahamas (Deleveaux y Bethel, 2002; Gittens y Butler, 2018). En la actualidad, dichas estructuras, llamadas “casitas”, “casitas cubanas”, “sombras” o incluso (indebidamente) “trampas”, consisten en una placa rígida —por lo general de alrededor de ~1.5 a 2 m<sup>2</sup> de superficie— elevada unos 10 a 15 cm por encima del fondo, generando una amplia “grieta” artificial que puede ser colonizada por múltiples langostas *P. argus* (Briones-Fourzán et al., 2000, 2007).

Si bien la adición de refugios artificiales ayuda a mitigar la escasez de refugios naturales, durante muchos años hubo una controversia sobre si las casitas solamente agregaban a las langostas dispersas en el hábitat haciéndolas más vulnerables a la

captura, lo que podría eventualmente provocar un colapso en la población, o si realmente aumentaban la biomasa, en cuyo caso era necesario determinar el mecanismo proximal (Butler y Herrnkind, 1997; Sosa-Cordero et al., 1998; Herrnkind et al., 1999). En la década de 1990, varios experimentos de campo de corta duración mostraron que las casitas aumentaban la abundancia y/o supervivencia de langostas debido a los beneficios funcionales de la agregación (Eggleston et al., 1990, 1992, 1997; Eggleston y Lipcius, 1992; Mintz et al., 1994; Arce et al., 1997; Sosa-Cordero et al., 1998). Pero para determinar si dichos efectos podrían producir un aumento en la biomasa, resultaba necesario hacer un experimento de campo más prolongado en el que se contrastaran diversos atributos poblacionales de las langostas entre sitios con y sin casitas.

Un experimento con dicha características tuvo lugar entre 1997 y 2002 en la laguna arrecifal de Puerto Morelos, un hábitat con escasez de refugios naturales para juveniles de *P. argus*. En ese estudio, se utilizaron casitas escaladas para juveniles (Fig. 1.2), menores a las casitas comerciales, que consistieron en un marco de  $0.9 \times 1.2$  m (=  $1.08$  m<sup>2</sup>), construido con tubos de PVC de 4 cm de diámetro (altura de entrada), y una placa de ferrocemento (techo) atornillada al marco. Los resultados demostraron que la instalación de casitas aumentó significativamente la densidad y la biomasa de juveniles de *P. argus* al brindarles refugios amplios que fomentaron su gregarismo y, por ende, su supervivencia (Briones-Fourzán y Lozano-Álvarez, 2001b; Briones-Fourzán et al., 2007). Si bien el efecto inmediato de las casitas en dichos atributos de las langostas estuvo en función de la complejidad vegetal local de los diferentes sitios con casitas, con el tiempo el efecto tendió a ser similar en dichos sitios independientemente de la complejidad vegetal (Lozano-Álvarez et al., 2009).



Fig. 1.2. Imagen de una casita experimental (más pequeña que las casitas utilizadas para la pesca) para juveniles de *Panulirus argus* a) sobre un pastizal y b) detalle de la estructura.

### Las enfermedades y el sistema inmune de los crustáceos

En las últimas décadas, las comunidades y ecosistemas marinos están siendo cada vez más impactados por enfermedades, con numerosos reportes de enfermedades (Lafferty et al., 2004; Burge et al., 2014; Lafferty, 2017). Los modelos epidemiológicos, que se empezaron a desarrollar principios del siglo XX para enfermedades humanas, se han adaptado también para el estudio de enfermedades de la fauna silvestre (Harvell et al., 2004). El análisis de enfermedades marinas es crucialmente importante y la adaptación de estos modelos con estos fines requiere de la valoración de las diferencias fundamentales entre los brotes en los sistemas marinos y terrestres, la disponibilidad de hospederos y la gran diversidad de patógenos en el océano; así como la consideración de que las dinámicas de transmisión y las tasas de propagación podrían ser mayores en los sistemas marinos que en los sistemas terrestres, ya que los hospederos en el océano son en su mayoría invertebrados de vida corta con dinámicas inmunológicas restringidas (McCallum et al., 2004; Lafferty, 2017).

La inmunidad confiere al organismo un proceso de defensa que se manifiesta por el reconocimiento de moléculas extrañas. En respuesta, se activan los mecanismos de defensa. Los crustáceos son afectados por patógenos, generalmente oportunistas. Los

mecanismos de defensa de los invertebrados son considerados más simples que la inmunidad de los vertebrados, ya que no sólo participan en la eliminación de la mayoría de los patógenos invasores, sino también en la conducción inicial de una respuesta inmune adaptativa (Robalino et al., 2004). Algunos factores presentes en la hemolinfa o en diversos grupos celulares poseen una alta especificidad de reconocimiento, semejante a la demostrada por los anticuerpos (revisión en Vázquez et al., 1998).

Los crustáceos, al igual que otros invertebrados, carecen de inmunidad adquirida; más bien poseen un sistema inmune innato con diversos mecanismos de defensa que se activan dependiendo de las características del patógeno (Vázquez et al., 1998). El sistema innato está conformado por dos tipos de respuestas: (1) respuestas celulares (mediada por los hemocitos), que incluyen fagocitosis, encapsulación del material extraño, melanización y apoptosis, y (2) respuestas humorales, que incluyen el sistema de la profenoloxidasa (*proPO*system, por sus siglas en inglés), procesos de coagulación, acción antimicrobiana y aglutinación celular, proteínas de reconocimiento, y péptidos antimicrobianos (Söderhäll y Cerenius, 1993; Cerenius et al., 2010). Estos mecanismos se han descrito como respuestas antibacteriales y antifúngicas (Rosas et al., 2004), pero no existe información acerca de los mecanismos de respuesta contra virus a nivel celular y molecular. Sin embargo, Robalino et al. (2004) reportaron la inducción de un estado antiviral dado por dsRNA no específico (ARN de doble cadena por sus siglas en inglés) en el camarón marino *Penaeus vannamei*, mostrando por primera vez que los invertebrados pueden desplegar inmunidad antiviral inducible en respuesta a una estructura molecular genuina asociada a virus. Esto abre la posibilidad de que la inmunidad antiviral innata en invertebrados comparte algunas de las características moleculares de las respuestas antivirales en vertebrados. Se ha propuesto que algunas respuestas inmunes normalmente inducidas por rutas ligadas a proteínas de bacterias y hongos también pueden ser inducidas por virus, o bien que las moléculas inducidas por aquellos pueden

también tener propiedades antivirales (Flegel y Sritunyalucksana, 2011), y más recientemente se ha encontrado cierto parecido funcional entre la reacción inmune de langostinos de agua dulce (*Pacifastacus leniusculus*, *Procambarus clarkii* y *Cherax quadricarinatus*) y la de los vertebrados (Cerenius y Söderhäll, 2018).

### **Enfermedades de langostas**

En general, las poblaciones de langostas silvestres son afectadas por pocas enfermedades, entre las que se encuentran algunas causadas por hongos, bacterias, protozoarios y helmintos (Evans et al., 2000; Shields, 2011), tales como la “gaffkemia”, infección de la hemolinfa causada por la bacteria Gram-positiva *Aerococcus viridans* que afecta a poblaciones de langostas con quelas *Homarus americanus* y *H. gammarus* (Lavallée et al., 2001). Asimismo, la “enfermedad del caparazón” causada por bacterias quitinolíticas Gram-negativas del tipo *Vibrio* se encuentra principalmente en langostas con quelas, aunque una variante conocida como “necrosis del abanico caudal” afecta también a langostas espinosas como *Panulirus argus*, *P. cygnus* y *Jasus edwardsii* (Shields, 2011). Las infecciones fúngicas generalmente se presentan en huevos, larvas y juveniles de langosta en condiciones de cultivo (Shields et al., 2006; Shields, 2011).

En poblaciones silvestres de *P. argus*, se han encontrado individuos infectados con bacterias patógenas (Porter et al. 2001) y microsporidios (Kiryu et al., 2009; Small et al. 2019), así como con metacercarias del tremátodo *Cymatocarpus solearis* (Gómez del Prado et al., 2003; Briones-Fourzán et al., 2016; Davies et al., 2019), y recientemente se reportó *Carcinonemertes conanobrieni* sp. nov., la primera especie de nemertino devorador de huevos de *P. argus* de los Cayos de Florida (Simpson et al., 2017). En general, la presencia de enfermedades en esta especie es rara, hecho que llama la atención debido a que se trata de un recurso sobre el cual se ejerce una fuerte presión pesquera (Shields et al., 2006). Sin embargo, la poca documentación de enfermedades en

langostas *P. argus* en condiciones naturales podría deberse a que las pesquerías están enfocadas a la captura de langostas sub-adultas y adultas, las cuales son más resistentes a las enfermedades, a diferencia de las postlarvas y juveniles, que se cree son más susceptibles a los patógenos (Shields, 2011; Behringer, 2012). En este contexto, el descubrimiento del PaV1 en juveniles de *P. argus* es el primer caso de una enfermedad viral en poblaciones silvestres de cualquier especie de langosta.

## **La enfermedad viral *Panulirus argus* Virus 1 (PaV1)**

### **Descubrimiento de PaV1**

En 1999-2000, se empezaron a encontrar juveniles de *P. argus* en poblaciones de langostas de Florida y México con signos de alguna enfermedad hasta entonces desconocida (Shields y Behringer, 2004; Lozano-Álvarez et al., 2008). Más adelante se descubrió que el agente causal de dicha enfermedad era un virus patogénico que fue denominado *Panulirus argus* Virus 1 (PaV1) (Shields y Behringer, 2004) porque al parecer es específico para *P. argus* (Butler et al., 2008). El virus permaneció sin clasificar hasta 2020, cuando se erigió la nueva familia Mininucleoviridae, que incluyó al PaV1 (Subramaniam et al. 2020).

La susceptibilidad al PaV1 está inversamente relacionada con la talla de las langostas (Shields y Behringer, 2004; Behringer et al., 2011; Behringer, 2012; Candia-Zulbarán et al., 2012). El virus ataca principalmente células del mesodermo (ciertas células de la hemolinfa, del tejido conectivo suave, y fagocitos fijos), pero con el tiempo la enfermedad se vuelve sistémica (Shields, 2011). Conforme la enfermedad progresa, las langostas desarrollan signos clínicos (macroscópicos) que incluyen una hemolinfa delgada y lechosa que no coagula, decoloración rojiza en las partes claras del exoesqueleto, letargo, morbidez, y supresión de la muda (Montgomery-Fullerton et al. 2007; Lozano-Álvarez et al. 2008) (Fig. 1.3). En su fase avanzada, la enfermedad es

irreversible y causa la muerte de las langostas debido a una deficiencia en la capacidad digestiva, disminución del estado nutricional y agotamiento de reservas energéticas (Shields y Behringer, 2004; Li et al., 2008; Pascual-Jiménez et al., 2012; Herrera-Salvatierra et al., 2019). En el estado de Quintana Roo se empezaron a detectar langostas juveniles con signos clínicos de la enfermedad PaV1 en la laguna arrecifal de Puerto Morelos en 2000 y en Banco Chinchorro en 2006 (Lozano-Álvarez et al., 2008). Huchin-Mian et al. (2008) confirmaron la presencia del virus en dichas langostas por medio de análisis histológicos y moleculares.

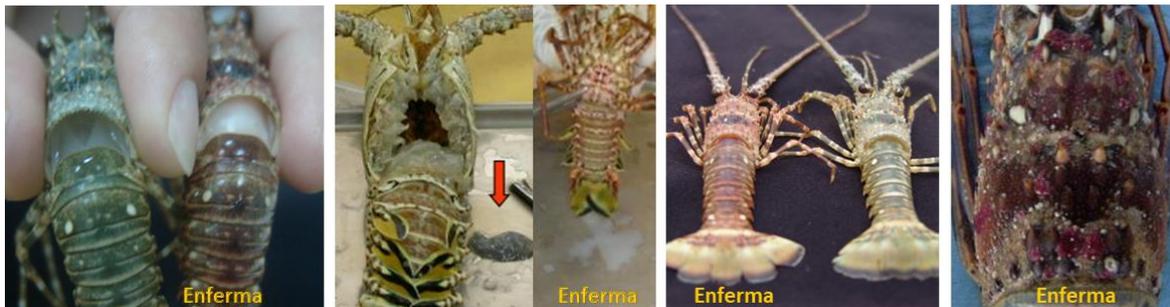


Figura 1.3. Signos macroscópicos de la enfermedad viral PaV1 en langostas *Panulirus argus*: a) hemolinfa lechosa, b) hemolinfa que no coagula, c) decoloración rojiza del exoesqueleto y d) supresión de la muda evidente por colonización de epibiontes.

Actualmente, PaV1 está presente en una gran cantidad de localidades del Mar Caribe (Butler et al., 2008; Huchin-Mian et al., 2009; Behringer et al., 2011; Cruz-Quintana et al., 2011; Candia-Zulbarán et al., 2012), en particular la parte noroccidental (Moss et al., 2013; Kough et al., 2015). La prevalencia de la enfermedad se ha estimado en muy pocas poblaciones locales, en particular en los Cayos de Florida (EUA) (Shields y Behringer, 2004; Butler et al., 2015), Puerto Morelos, Banco Chinchorro y Bahía de la Ascensión (Quintana Roo, México) (Lozano-Álvarez et al., 2008; Ramírez-Estévez et al., 2010; Candia-Zulbarán, 2011; Candia-Zulbarán et al., 2012; Huchin-Mian et al., 2013) y el Golfo de Batabanó (Cuba) (Cruz-Quintana et al., 2011), pero se requiere hacer esfuerzos para monitorear la dinámica de la enfermedad, entendida como las variaciones temporales y

espaciales en la prevalencia de la enfermedad y el entendimiento de los factores que subyacen esas variaciones, así como cuáles son los individuos con mayor probabilidad de resultar infectados, (Shields 2011; Cooch et al., 2012) en diferentes lugares del Caribe (Lozano-Álvarez et al., 2008; Briones-Fourzán et al., 2009; Shields, 2011).

### **Influencia de PaV1 en el comportamiento gregario de *P. argus***

En todos los ambientes donde viven animales existe el riesgo de enfermedades. Las estrategias efectivas para evitar y combatir las enfermedades se convierten en parte del desarrollo de una selección genética y dentro de esta, se incluyen ciertos patrones de comportamiento y otros mecanismos propios del organismo, como su sistema inmune, que permiten al animal sobrevivir (Hart, 1990, 1992; Hart y Hart, 2018). Para reducir la posibilidad de enfermarse, los animales exhiben una serie de conductas que disminuyen el riesgo de adquisición del patógeno, pero estas estrategias no siempre tienen éxito (Loehle, 1995; Flores et al., 2005; Sarabian et al., 2018).

En hábitats naturales de la Bahía de Florida, EE.UU., Behringer et al. (2006), observaron que las langostas *P. argus* visiblemente sanas tendían a compartir refugios, mientras que las langostas con signos clínicos de la enfermedad PaV1 tendían a estar solitarias en sus refugios. Con base en dichas observaciones, estos autores realizaron experimentos de laboratorio para probar si las langostas sanas tendían a evitar refugios ocupados por langostas enfermas y viceversa. Los resultados sugirieron que las langostas sanas sí tendían a evitar ocupar refugios donde se encontraba una langosta enferma, pero que las langostas enfermas no mostraban esa tendencia. Se sugirió que esta modificación en el comportamiento normalmente gregario de los juveniles de *P. argus* podría deberse a un cambio cualitativo en las señales químicas de los individuos enfermos (Behringer et al., 2006). Más adelante se determinó, también por medio de experimentos en laboratorio, que las principales vías de transmisión del PaV1 eran por

contacto entre langostas enfermas y sanas, a través del agua, y por ingestión de tejidos infectados (las vías de transmisión no se han determinado en poblaciones silvestres) (Dahlgren y Staine, 2007; Butler et al., 2008).

Sin embargo, para una langosta, el compartir o no un refugio con un co-específico enfermo podría depender de diversos factores, entre ellos las dimensiones del refugio y la disponibilidad de refugios alternos. Por ejemplo, a diferencia de lo observado por Behringer et al. (2006) en la Bahía de Florida, Lozano-Álvarez et al. (2008), reportaron un alto nivel de cohabitación entre juveniles de *P. argus* sanos y enfermos en casitas experimentales presentes en la laguna arrecifal de Puerto Morelos (donde los refugios naturales son muy escasos, Briones-Fourzán et al. 2007). Lozano-Álvarez et al. (2008) plantearon dos hipótesis alternativas, no necesariamente excluyentes, para explicar este fenómeno: (1) que en hábitats donde hay pocos refugios disponibles, los juveniles sanos que están buscando refugio y encuentran una casita con un co-específico enfermo optan (*trade-off*) entre el riesgo de depredación y el riesgo de infección, o (2) que el área de refugio que ofrecen las casitas experimentales ( $\sim 1\text{m}^2$ ) es lo suficientemente grande como para permitir la segregación de langostas sanas y enfermas en su interior. Posteriormente, Candia-Zulbarán (2011) y Briones-Fourzán et al. (2012) también encontraron un nivel relativamente alto de cohabitación entre langostas sanas y enfermas en las casitas comerciales usadas en Bahía de la Ascensión.

En un experimento de laboratorio, Behringer y Butler (2010) encontraron que las langostas sanas prefirieron ocupar un refugio vacío a uno que contenía una langosta enferma en presencia de señales químicas de un depredador (pulpo), llegando a la conclusión de que las langostas sanas prefieren renunciar al beneficio de la defensa grupal antes que “arriesgarse a contraer el virus”. Sin embargo, estos resultados no confirman ni rechazan las hipótesis planteadas por Lozano-Álvarez et al. (2008) porque (a) las langostas focales en el experimento de Behringer y Butler (2010) tenían otro

refugio inmediatamente disponible, (b) el área de protección que brindaban los refugios utilizados en ese experimento era mucho menor ( $\sim 0.08 \text{ m}^2$ ) que el de las casitas usadas por Lozano-Álvarez et al. (2008) ( $\sim 1 \text{ m}^2$ ), y (c) el riesgo de depredación en dicho experimento era potencial y no inmediato.

Después de un evento de muerte masiva de esponjas marinas que resultó en la pérdida de muchos refugios para juveniles de *P. argus* en los cayos de Florida, EE. UU., Butler et al. (2015) encontraron que, a pesar de que las langostas se concentraron entre los refugios que quedaban, lo que presuntamente aumentaba su exposición al virus PaV1, la prevalencia de la enfermedad permaneció sin cambios incluso años después de la muerte de las esponjas. Pero en un experimento de campo, estos mismos autores introdujeron langostas sanas o enfermas de PaV1 en agregaciones de langostas en refugios naturales, obteniendo como resultado que al ser introducida la langosta enferma, las langostas sanas abandonaron el refugio a pesar de la escasez de refugios alternativos, mostrando inmunidad conductual (*behavioral immunity*) por sobre el riesgo de depredación al tener que buscar un nuevo refugio.

Sin embargo, en experimentos en los que se evaluó la elección de refugio por parte de langostas de *P. argus* en presencia de co-específicos enfermos de PaV1 y modulada por la disponibilidad de refugio alternativo y el riesgo de depredación por parte de peces ballesta (Balistidae), Lozano-Álvarez et al. (2018) encontraron que en presencia del depredador y con uno de los dos refugios disponibles ocupado por una langosta enferma, las langostas focales se agregaron en el refugio vacío alternativo, pero cuando los dos refugios estuvieron ocupados por langostas enfermas, algunas langostas focales fueron encontradas en el área abierta del estanque y otras compartiendo el refugio con langostas enfermas. Esto muestra que las langostas sanas pueden cohabitar con langostas enfermas incluso en ausencia del depredador, lo que sugiere que la evitación de la enfermedad depende de la interacción entre la disponibilidad de un refugio

alternativo y del riesgo inmediato de depredación. Además, en un estudio de campo en el que se usaron casitas como refugios artificiales que proporcionan mayor área de protección, estos mismos autores encontraron que la cohabitación entre langostas sanas y enfermas fue relativamente alta, pero la probabilidad de encontrar langostas enfermas separadas de las sanas fue menor cuando el número de langostas por casita fue mayor (ver capítulo 4).

### **Planteamiento del tema y estructura de la tesis**

El uso de casitas comerciales para la pesca de langosta en otros países del Caribe es de gran interés (Briones-Fourzán et al., 2000; Gittens y Butler, 2018), como también lo es utilizar casitas más pequeñas para incrementar la abundancia de juveniles de *P. argus* en áreas marinas protegidas, lo que podría eventualmente producir un derrame (*spillover*) de sub-adultos hacia áreas donde se permita la pesca (Briones-Fourzán et al., 2007; Salas et al., 2007). Sin embargo, a partir de la emergencia de la enfermedad PaV1 se ha hecho necesario evaluar la posibilidad de un aumento en la prevalencia de langostas enfermas con el uso de casitas, ya que el gregarismo y el aumento en la densidad poblacional pueden aumentar las tasas de contacto entre individuos enfermos y sanos (Loehle, 1995; Lafferty et al., 2004).

Por tanto, el objetivo general del presente estudio, llevado a cabo en Puerto Morelos, Quintana Roo, es determinar la influencia del uso de casitas en los niveles de prevalencia de la enfermedad PaV1 en juveniles de langosta *Panulirus argus* y analizar diversos aspectos de la dinámica de la enfermedad en relación con el uso de casitas por parte de las langostas juveniles.

La tesis está organizada en seis capítulos. Cada capítulo está preparado como un artículo independiente. Por lo tanto, resultó inevitable repetir alguna información en diferentes capítulos, en particular en la introducción y métodos, para no perder la

integridad de la investigación. El capítulo 1 lo constituye la presente introducción general y el planteamiento del problema. El capítulo 2 presenta los resultados de un experimento de laboratorio desarrollado para comparar la elección de refugios por parte de langostas libres de PaV1 sometidas a la influencia de señales químicas emitidas por langostas clínicamente infectadas con PaV1 (es decir, con signos visibles de la enfermedad), langostas sub-clínicamente infectadas (es decir, infectadas pero aún no enfermas), langostas no infectadas, y langostas recién sacrificadas. El capítulo 3 trata sobre un estudio manipulativo de campo realizado con el objeto de analizar el efecto del uso de casitas en los niveles y variación temporal de la prevalencia de la enfermedad PaV1. En el capítulo 4 se comparan los niveles de cohabitación de langostas sanas con enfermas en casitas *versus* refugios naturales pre-existentes, así como el patrón de ocupación de las casitas en presencia de langostas clínicamente infectadas con PaV1. El capítulo 5 trata sobre la determinación de la sensibilidad y especificidad de los signos clínicos para detectar la infección por PaV1 en la población de juveniles de *P. argus* de la laguna arrecifal de Puerto Morelos. Finalmente, en el capítulo 6 se presenta una discusión general y las conclusiones de la investigación en su conjunto, señalando los principales resultados y las limitaciones del estudio, y se brindan recomendaciones para futuros estudios.

## Capítulo 2. Influencia de señales químicas emitidas por langostas enfermas con PaV1 en la elección de refugios por co-específicos sanos

### Introducción

*Panulirus argus* tiene un ciclo de vida complejo con varios cambios de hábitat durante su vida béntica (Butler et al., 2006). Las postlarvas se asientan entre la vegetación marina donde los juveniles pequeños (de 6 a 15–25 mm de longitud cefalotorácica, LC) permanecen por unos meses y exhiben un comportamiento asocial. Eventualmente, los juveniles grandes (de 15–25 a 45–50 mm LC) dejan de vivir entre la vegetación para ocupar refugios estructurados tipo grieta, un cambio de hábitat que coincide con un cambio de comportamiento asocial a comportamiento social (Childress y Herrnkind, 1994, 1996). El más claro ejemplo del comportamiento social en *P. argus* y otras langostas espinosas es el gregarismo, el cual es mediado por señales químicas intraespecíficas liberadas en la orina (Ratchford y Eggleston, 1998; Horner et al., 2006, 2008) que son detectadas a través de las anténulas (Horner et al., 2008).

Para un individuo que está buscando un refugio, seguir las señales químicas de co-específicos hacia un refugio reduce su tiempo de exposición a los depredadores y le permite evaluar la calidad del refugio encontrado (Nevitt et al., 2000; Childress y Herrnkind, 2001a), mientras que congregarse dentro del refugio puede incrementar la sobrevivencia per cápita a través del llamado “efecto de dilución” o la “defensa grupal del refugio” (Eggleston et al., 1990; Childress y Herrnkind, 2001a, 2001b; Briones-Fourzán et al., 2007). Sin embargo, como se menciona en el Capítulo 1, el gregarismo no es generado por la atracción química *per se* a menos que los beneficios superen a los costos de la agregación (Loehle, 1995; Childress, 2007). Para *P. argus*, los beneficios de la agregación pueden incluir el uso eficiente de los refugios disponibles, disminución del riesgo de depredación e incremento de la sobrevivencia, persistencia en el hábitat, ámbito

de forrajeo, y aumento en las oportunidades reproductivas (Childress y Herrnkind, 2001a; Dolan y Butler, 2006; Briones-Fourzán et al., 2007; Childress, 2007). Los costos, por su lado, incluyen un incremento de la competencia y la agresión intraespecífica, así como de la transmisión de parásitos y enfermedades (Loehle, 1995; Lafferty et al., 2004; Childress, 2007).

En experimentos de laboratorio, se ha observado que la transmisión de PaV1 ocurre por contacto entre langostas sanas y enfermas a través del agua, por lo menos en distancias cortas (Butler et al., 2008). Aunque, en experimentos llevados a cabo por Behringer et al. (2006), las langostas sanas evitaban compartir refugios con co-específicos visiblemente enfermos y también evitaban a los co-específicos infectados experimentalmente incluso antes de ser infecciosos. Esta estrategia, podría ayudar a reducir las tasas de contacto y de transmisión de PaV1 y mantener los niveles de prevalencia relativamente bajos. Anderson y Behringer (2013) mostraron que la evitación era de naturaleza química, es decir, que las langostas sanas evitaron las señales químicas, no las señales visuales, de las langostas enfermas. Esto parecería ser similar a la evitación de los llamados “olores de alarma” co-específicos, es decir, las señales químicas transmitidas en la hemolinfa que emana de co-específicos heridos, un comportamiento que exhibe *P. argus* (Briones-Fourzán et al., 2008; Shabani et al., 2008).

Sin embargo, todos estos estudios de laboratorio utilizaron diferentes diseños y condiciones experimentales (mesocosmos circulares vs laberintos en Y o canales, o diferentes dimensiones; respuestas inmediatas vs respuestas posteriores a 48 h, langostas experimentalmente infectadas vs naturalmente infectadas), que podrían interactuar con el estímulo químico en diferentes formas (Aggio y Derby, 2011), haciendo difícil las comparaciones entre ellos. Por ejemplo, el comportamiento gregario es parcialmente mediado por señales químicas liberadas en la orina de co-específicos, las cuales además comunican su status social (Shabani et al., 2009), por lo que las señales

de origen urinario liberadas por *P. argus* a distancias cortas pueden producir un comportamiento evasivo en co-específicos (similar a la hemolinfa, Shabani et al., 2008), pero atraerlos cuando son liberadas a mayores distancias (Horner et al., 2006; Briones-Fourzán et al., 2008). Por lo tanto, la elección de un refugio dependerá en gran medida del contexto en el cual sean transmitidas las señales químicas de los co-específicos (Shabani et al., 2009).

Por otro lado, se sabe que el comportamiento de *P. argus* puede variar durante el ciclo de muda (Lipcius y Herrnkind, 1982), pero solamente en uno de todos los experimentos de laboratorio arriba mencionados se controló el efecto de confusión del ciclo de muda en las langostas focales (Briones-Fourzán et al., 2008). Además, la progresión de la enfermedad PaV1 afecta el comportamiento y la movilidad de las langostas, de tal manera que las langostas con infección severa se vuelven letárgicas (Shields y Behringer, 2004). Sin embargo no se ha evaluado el efecto potencial de la infección sub-clínica en el comportamiento de las langostas. Más aún, ninguno de los estudios arriba mencionados evaluó la presencia de PaV1 en langostas presuntamente sanas. Esto es importante ya que los signos macroscópicos (visibles) de la enfermedad no aparecen sino hasta después de 35 a 50 días de la infección (Li et al., 2008; Huchin-Mian, 2013). Por medio del ensayo de detección de PaV1 a través de PCR desarrollado por Montgomery-Fullerton *et al.* (2007), se ha encontrado que las langostas sub-clínicamente infectadas (detectadas positivas por PCR pero sin signos visibles producidos por PaV1) pueden ser tanto (Huchin-Mian et al., 2013) o más abundantes (Behringer et al., 2011) en los hábitats naturales que las langostas visiblemente enfermas

Por lo tanto, el objetivo del presente capítulo fue contrastar la respuesta de individuos de *P. argus* no infectados (sanos) a refugios de los cuales emanaban señales químicas producidas por conspecíficos en cuatro condiciones: (1) no infectados con PaV1, (2) sub-clínicamente infectados con PaV1, (3) clínicamente infectados con PaV1 (es decir,

visiblemente enfermos), y (4) muertos, controlando que las langostas focales se encontraran en estado de intermuda y carecieran de PaV1 mediante ensayos de PCR utilizando su hemolinfa. En estos experimentos se utilizó un conjunto de laberintos en Y de 2 m de largo, distancia hasta la cual se ha estimado que es probable que se expresen los comportamientos de langosta impulsados por quimiorrecepción de orina (Horner et al., 2006, 2008; Shabani et al., 2009). A diferencia de los estudios previos, en los que se utilizaron langostas experimentalmente infectadas (Behringer et al., 2006; Butler y Behringer, 2010, Anderson y Behringer, 2013), en el presente trabajo se utilizaron exclusivamente langostas que estaban infectadas por exposición al virus en condiciones naturales. Bajo este diseño experimental, se esperaba que las langostas focales mostraran atracción a co-específicos no infectados, evitaran tanto a sus co-específicos enfermos como muertos, y mostraran una respuesta neutral a los co-específicos sub-clínicamente infectados, ya que en observaciones de campo se han encontrado langostas sanas muy cerca de langostas sub-clínicamente infectadas (Huchin-Mian et al., 2013, ver capítulo 4).

## **Materiales y métodos**

### **Colecta de langostas**

Los experimentos se llevaron a cabo en la Unidad Académica de Sistemas Arrecifales, Universidad Nacional Autónoma de México, en Puerto Morelos, México (20° 54' N, 86° 54' W). Mediante buceo libre y SCUBA, se colectaron a mano langostas juveniles aparentemente sanas y enfermas con signos clínicos de PaV1 (hemolinfa de color lechoso, claramente visible a través de la membrana artrodial semitransparente entre el cefalotórax y el abdomen), en la laguna arrecifal de Puerto Morelos (Huchin-Mian et al., 2013). Las langostas fueron trasladadas al laboratorio entre 1 y 2 horas después de la captura. Las langostas “sanas” y enfermas se colocaron en estanques separados con

múltiples refugios en la forma de bloques de concreto. Durante el período de aclimatación ( $\leq 1$  semana), las langostas fueron alimentadas con mejillones cada tercer día. Los estanques de aclimatación y todas las unidades experimentales (ver abajo) recibían agua de mar a través de un sistema de flujo abierto y se encontraban en el exterior pero bajo sombra. El agua marina era bombeada de la laguna arrecifal de Puerto Morelos y tratada con ozono antes de pasar a un reservorio elevado para su distribución a los estanques y también después de ser utilizada en los estanques.

### **Diseño experimental**

Se usaron cuatro unidades experimentales. Cada unidad consistió en un laberinto en Y de 2 m de largo (Figura 2.1) con 2 estanques cabecera independientes (Briones-Fourzán et al., 2008). Todos los estanques fueron llenados de agua hasta una altura de 0.3 m. Cada estanque cabecera (0.6 m de largo  $\times$  0.5 m de ancho  $\times$  0.5 m de altura) contenía  $\sim 90$  l de agua de mar mientras que el laberinto en Y (2.0 m de largo  $\times$  0.8 m de ancho  $\times$  0.6 m de altura) contenía  $\sim 500$  l. El laberinto en Y estaba dividido en dos brazos iguales por un panel (1.0 m de largo  $\times$  0.6 m de altura). El agua de mar fluía hacia los estanques cabecera a una tasa de  $2 \text{ L min}^{-1}$  y de cada estanque cabecera hacia el extremo de cada uno de los brazos del estanque en Y. En el extremo de cada brazo, donde caía el agua proveniente de su respectivo estanque cabecera, se colocó un refugio. Ambos refugios eran idénticos y se encontraban en el “área de inicio”, es decir, el extremo opuesto del laberinto donde se mezclaba el agua proveniente de ambos brazos (Fig. 2.1). Uno de los refugios recibía agua que provenía de un estanque cabecera que contenía un estímulo (ver abajo), mientras que el otro recibía sólo agua de mar que no contenía estímulo (control). En el área de inicio se colocó una malla semicircular para evitar que las langostas se “refugiaran” en las esquinas. Todos los estanques eran completamente opacos para evitar el contacto visual entre las langostas y los estanques cabecera

estaban montados en una superficie diferente para eliminar la transferencia de vibraciones. Además, para prevenir la transmisión de señales acústicas producidas por el estímulo, el agua proveniente de los estanques cabecera caía desde una altura de 5 cm sobre la superficie del agua del laberinto. Previo al experimento, 16 langostas ( $50.0 \pm 15.4$  mm CL, media  $\pm$  desviación estándar, DE) fueron individualmente probadas en los laberintos en Y sin ningún estímulo químico (los dos refugios recibían solo agua de mar proveniente de los estanques cabecera), con el objeto de evaluar errores potenciales en el diseño o en la orientación de los laberintos que pudieran sesgar la elección de las langostas focales en varias repeticiones. Cada refugio fue elegido por el 50% de estas langostas, lo que sugiere que no existían factores de confusión potenciales por la orientación o el diseño del dispositivo.

#### **Detección del ADN de PaV1 por PCR**

Se analizó la hemolinfa de todas las langostas aparentemente sanas para detectar la presencia de ADN de PaV1 mediante PCR. Después de desinfectar el exoesqueleto con etanol al 70%, se extrajo un volumen de aproximadamente 300  $\mu$ L de hemolinfa de la base del quinto par de pereiópodos usando una jeringa estéril desechable de 1 ml. La hemolinfa se fijó inmediatamente en etanol al 96% y se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$ . La extracción de ADN de cada una de las muestras de hemolinfa se llevó a cabo siguiendo un protocolo de precipitación de sales similar al descrito por Aljanabi y Martínez (1997). La precipitación del ADN se logró tras añadir 200 $\mu$ L de acetato de sodio 3M, pH 5.2, en lugar de NaCl. La integridad del ADN fue caracterizada por electroforesis en un gel de agarosa al 1%.

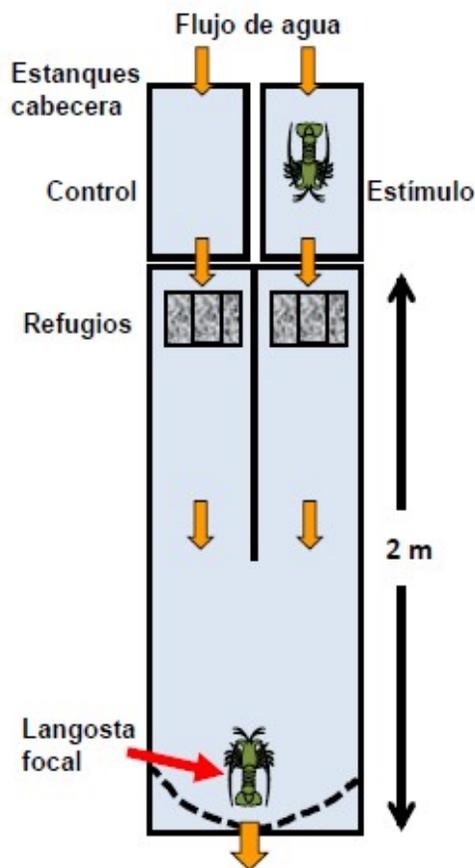


Fig. 2.1. Representación esquemática de los laberintos en Y experimentales utilizados para probar la respuesta de langostas *Panulirus argus* no infectadas a refugios que emanaban señales químicas de co-específicos en cuatro condiciones diferentes.

El ADN de PaV1 fue amplificado por PCR en una reacción de 25  $\mu$ L conteniendo 1  $\mu$ L de ADN extraído, 0.33  $\mu$ M de cada primer 45aF y 543aR (Montgomery-Fullerton et al., 2007), 2.5 mM de  $MgCl_2$  (Promega), 0.6X de búfer de reacción (Promega), 0.4 mM de mezcla de dNTPs (Promega), y 0.75 U de Taq DNA polimerasa (Promega). Las condiciones de termociclaje fueron: 1 ciclo a 94°C por 10 min seguido por 30 ciclos de 94°C por 30 s, 63°C por 30 s, 72°C por 1 min; seguidos de 72°C 10 min. La presencia del amplicón esperado de 499 pb de PaV1 se determinó mediante la resolución de 5  $\mu$ L del producto de PCR y 3  $\mu$ L de búfer de carga en un gel de agarosa al 2% que contenía 0.1% de bromuro de etidio, y la visualización del ADN se hizo utilizando iluminación UV (MiniBis Pro®). Se utilizó agua ultrapura y ADN de hemocitos extraídos de langostas severamente

infectadas con PaV1 como controles negativo y positivo, respectivamente (Huchin-Mian et al., 2013). El protocolo se describe de manera detallada en el Apéndice 1.

### **Tratamientos experimentales**

Sobre la base de los resultados de la PCR, las langostas aparentemente sanas se categorizaron en langostas no infectadas (negativas a PaV1 por PCR) y langostas sub-clínicamente infectadas (positivas a PaV1 por PCR pero sin signos visibles de la enfermedad). El experimento consistió en cuatro tratamientos que difirieron en la condición de las langostas usadas como fuentes de estímulo químico. Estas langostas fueron denominadas “estímulos”. En los tratamientos 1,2 y 3, el estímulo consistió en langostas no infectadas, sub-clínicamente y clínicamente infectadas, respectivamente, mientras que en el tratamiento 4 el estímulo consistió en la mitad de una langosta recién muerta (ver tabla 2.1). Se utilizó solo una mitad de langosta por repetición para minimizar el sacrificio de animales. Se utilizaron exclusivamente langostas negativas a PaV1 por PCR como langostas focales, y todas las langostas focales fueron utilizadas una sola vez.

Las repeticiones se llevaron a cabo durante la noche. En cada repetición, 30 min antes de oscurecer el estímulo fue colocado al azar en uno de los estanques cabecera de cada laberinto. Posteriormente, se colocó una langosta focal en el área de inicio del laberinto dentro de un cilindro de malla (0.45 m de diámetro, 0.40 m de altura) durante 2 h para su aclimatación. El cilindro fue removido y la langosta focal quedó libre de deambular por el laberinto durante toda la noche. Entre las 9:00 y 10:00 h del día siguiente, se registró la posición de la langosta focal y se revisaron los flujos de los estanques cabecera. Luego, la langosta focal fue extraída del laberinto para medirla con un vernier (longitud cefalotorácica, LC, desde entre los cuernos rostrales hasta el margen posterior del caparazón,  $\pm 0.1$  mm) y determinar su estado de muda mediante la observación al microscopio de la punta de uno de los pleópodos (ver Lyle y MacDonald, 1983). Para

asegurar que las señales químicas no permanecieran en las unidades experimentales después de cada repetición, tanto los estanques cabecera como los laberintos fueron drenados y cepillados y se permitió que el agua fluyera a una tasa elevada, abriendo completamente la llave de alimentación, hasta la siguiente repetición.

Tabla 2.1. Resumen de los cuatro tratamientos para evaluar la influencia de señales químicas emanadas por langostas en diferentes condiciones (“estímulos”) sobre la elección de refugio de langostas focales *Panulirus argus*. “No infectadas” son langostas que dieron negativo a PaV1 por PCR. “Sub-clínicamente infectadas” son langostas que dieron positivo a PaV1 por PCR pero que no mostraban signos macroscópicos de la enfermedad. “Clínicamente infectadas” eran langostas que mostraban signos clínicos de la enfermedad. Muertas y cortadas: era la mitad de una langosta recién muerta, cortada longitudinalmente.

Tratamiento	Langostas estímulo	Respuesta esperada	n
1	No infectadas	Atracción	19
2	Sub-clínicamente infectadas	Neutral	18
3	Clínicamente infectadas	Evitación	20
4	Muertas y cortadas	Evitación	20

Se hicieron por lo menos 20 repeticiones de cada tratamiento, pero fueron descartadas aquellas en las que el flujo difirió por más de  $\pm 0.50$  L/min entre estanques cabecera (Briones-Fourzán et al., 2008) o aquellas en las que la langosta focal no estuvo en intermuda (debido a que el comportamiento de las langostas puede cambiar durante la premuda y la postmuda) (Lipcius y Herrnkind, 1982). En el tratamiento 3, se descartaron además cuatro repeticiones en las cuales el estímulo (langosta clínicamente infectada) murió durante la noche. Para evitar un posible efecto de confusión por la estacionalidad, las repeticiones de los cuatro tratamientos fueron intercaladas a lo largo del periodo experimental.

Independientemente del estímulo, el resultado de una repetición fue denominada “atracción” cuando la langosta focal eligió el refugio sujeto a señales químicas

provenientes del estímulo o “evitación” cuando la langosta focal eligió el refugio que recibía sólo agua marina. De esta manera, los resultados se expresan como los porcentajes de langostas que exhibieron atracción vs evitación. Se utilizó el método de puntuación con corrección para continuidad (Newcombe, 1998) para computar los intervalos de confianza al 95% de los porcentajes. Los resultados de cada tratamiento fueron sometidos a una prueba binomial de dos colas, en la que la probabilidad de escoger cualquiera de los dos refugios era del 50% (es decir, la proporción  $p = 0.5$ ). Posteriormente, los resultados de los cuatro tratamientos fueron contrastados en una tabla contingencia de  $2 \times 4$ . En todos los casos, el nivel de significancia fue  $\alpha = 0.05$ .

### **Resultados**

Para todas las repeticiones válidas, la talla media ( $\pm$  DE) de las langostas focales fue  $49.2 \pm 13.6$  mm LC ( $n = 94$ ). La talla media de las langostas focales no varió significativamente entre tratamientos (ANOVA de una vía,  $F = 1.072$ ,  $gl = 4$ ,  $89$ ;  $p = 0.375$ ).

Las langostas focales no fueron significativamente atraídas a los refugios con señales químicas emanadas por co-específicos no infectados ( $p = 0.359$ ) y no evitaron significativamente los refugios de los que emanaban señales químicas de co-específicos sub-clínicamente infectados ( $p = 0.814$ ) (Figura 2.2). En cambio, las langostas focales evitaron significativamente los refugios de los cuales emanaban señales químicas de co-específicos clínicamente infectados con PaV1 (80% de evitación,  $p = 0.0118$ ) y los refugios de los cuales emanaban señales químicas de co-específicos muertos (85% de evitación,  $p = 0.0026$ ). (Figura 3).

El análisis de la tabla de contingencia contrastando los cuatro tratamientos arrojó un resultado significativo ( $\chi^2 = 12.881$ ,  $gl = 3$ ,  $p = 0.005$ ). Un análisis subdividido de  $\chi^2$  (Zar, 1999) mostró que los resultados de los tratamientos 1 y 2 no difirieron

significativamente entre sí ( $\chi^2 = 0.029$ ,  $gl = 1$ ,  $p = 0.884$ ), y que los resultados de los tratamientos 3 y 4 tampoco difirieron significativamente entre sí ( $\chi^2 = 0$ ,  $gl = 1$ ,  $p = 1.0$ ).

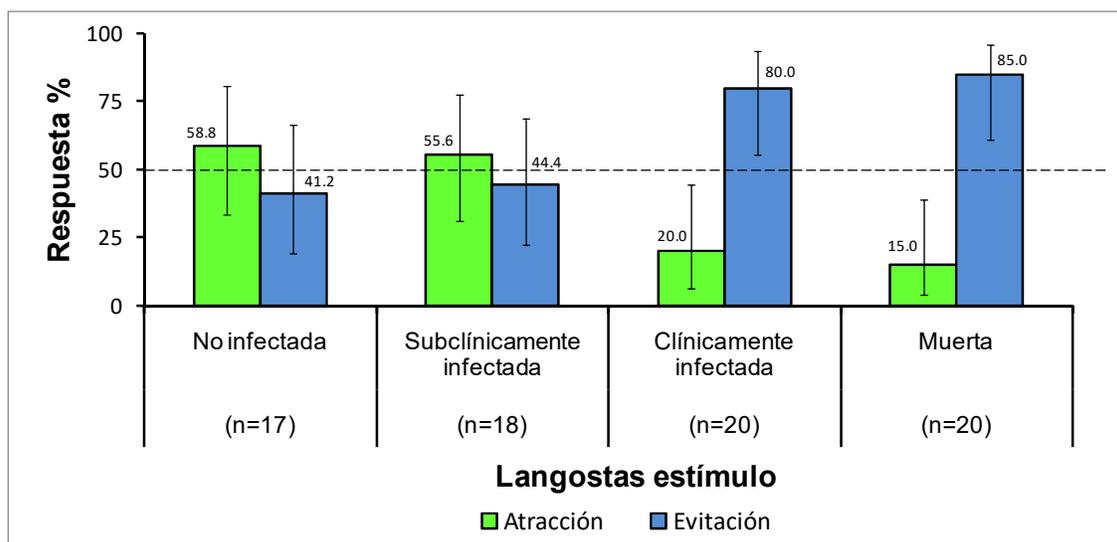


Fig. 2.2. Resultados del experimento con laberintos en Y para investigar los efectos de señales químicas sobre *Panulirus argus* en cuatro condiciones diferentes en la elección de refugio por co-específicos no infectados. La línea horizontal punteada indica la elección del refugio al azar (50%).

## Discusión

En el presente trabajo se contrastaron, en un solo experimento, las respuestas de langostas focales *P. argus* no infectadas con PaV1 a señales químicas emanadas por co-específicos no infectados, sub-clínicamente infectados (infectados pero no enfermos), clínicamente infectados (infectados y enfermos, e infecciosos), y muertos. Este trabajo difiere de estudios previos en que (a) se evaluó la presencia de ADN del virus PaV1 en todas las langostas aparentemente sanas y (b) todas las langostas que estaban visiblemente enfermas y aquellas que fueron positivas a PaV1 por PCR se infectaron debido a la exposición al virus bajo condiciones naturales.

Las langostas focales evitaron significativamente los refugios con señales químicas provenientes de co-específicos tanto infectados como muertos, resultados que son consistentes con los de Anderson y Behringer (2013) y Briones-Fourzán et al. (2008), respectivamente, pero las respuestas de las langostas focales a los refugios con señales químicas provenientes tanto de langostas sub-clínicamente infectadas como de langostas no infectadas no difirieron del azar. Este último resultado era inesperado, ya que en experimentos previos con laberintos en Y, las langostas *P. argus* mostraron una atracción significativa a refugios con señales química provenientes de co-específicos no enfermos (Ratchford y Eggleston, 1998; Briones-Fourzán et al., 2008). Sin embargo, Anderson y Behringer (2013) también obtuvieron un resultado que no difirió del azar al evaluar la atracción hacia señales químicas de langostas sanas. Más recientemente, Childress et al. (2015) hicieron un meta-análisis de seis experimentos con laberintos en Y realizados entre 1996 y 2012 (incluyendo los de Ratchford y Eggleston, 1998; Briones-Fourzán et al., 2008, y Anderson y Behringer, 2013), con el objeto de probar la hipótesis de que los juveniles de *P. argus* se están volviendo menos sociales. Sus resultados mostraron que la atracción co-específica en *P. argus* en experimentos de este tipo ha disminuido desde 2010, con un valor significativamente menor en 2012. Childress et al. (2015) interpretan sus resultados como una disminución en la socialización de *P. argus* cuyas causas se desconocen, pero sugieren que una de ellas podría ser la amplia presencia de PaV1 en las poblaciones de *P. argus* del Gran Caribe.

Las langostas espinosas han sido extensamente estudiadas en relación a los mecanismos de agregación y evitación, mostrando que, en general, la agregación es mediada por químicos que se expelen en la orina y que la evitación es mediada por químicos que se encuentran en la hemolinfa (Horner et al., 2006,2008; Shabani et al., 2008, 2009; Aggio y Derby, 2011). Sin embargo, los resultados de Anderson y Behringer (2013) y del presente trabajo claramente muestran que la evitación de langostas

visiblemente enfermas con PaV1 por co-específicos sanos es mediada por quimiorrecepción de señales químicas en la orina. La evitación de olores de langostas enfermas fue similar en magnitud a la evitación de olores de alarma en la hemolinfa de co-específicos letalmente heridos, la cual representa una estrategia anti-depredación efectiva en especies gregarias (Dicke y Grostal, 2001; Briones-Fourzán et al., 2008). Por otro lado, los olores de alarma acarreados en la hemolinfa producen aversión solo por un periodo de tiempo limitado debido a que se degradan con el tiempo. Por ejemplo, los olores de alarma de la jaiba *Callinectes sapidus* pierden efectividad en un plazo de 18 h (Ferner et al., 2005). Por lo tanto, en el caso de experimentos que duran toda la noche en los que se utilizan especímenes muertos como estímulo (tal como en el tratamiento 4), el estímulo real puede cambiar con el tiempo (Aggio y Derby, 2011). Yao et al. (2009) sugieren que algunos trabajos que se refieren a la evitación de olores de alarma de co-específicos muertos o heridos pueden involucrar “necromonas”, que son sustancias bioquímicas generadas por la descomposición del organismo y asociadas con la muerte, con fuentes potenciales de infecciones, o con otras patologías. A diferencia de los olores de alarma, que se degradan relativamente rápido y tienen cierto grado de especificidad, las necromonas pueden persistir por días y son altamente conservadas. Por ejemplo, ciertos ácidos grasos insaturados, tales como el ácido oleico y el ácido linoléico, están asociados con la muerte y se ha demostrado que repelen animales en muchos taxa, incluyendo crustáceos (Yao et al., 2009). Los ácidos oleico y linoléico están ausentes en cadáveres recién muertos, pero son liberados por hidrólisis enzimática de triglicéridos dentro de las 24 h post mortem y permanecen estables hasta por 6 días después de la muerte (Diez et al., 2013). Sin embargo, dada la naturaleza conservada de las necromonas, el reconocimiento de la muerte está generalmente acoplado a señales adicionales que indican especificidad (Yao et al., 2009).

Por tanto, es posible que las langostas focales en el tratamiento 4 hayan evitado necromonas de los co-específicos muertos en lugar de los olores de alarma transmitidos en la hemolinfa. El resultado similar obtenido en el tratamiento 3 podría indicar que una vez que las langostas infectadas con PaV1 desarrollan los signos clínicos de la enfermedad, su olor tiene un efecto repelente sobre otras langostas similares al que tiene el olor de los co-específicos muertos. En el inicio de la infección por PaV1, los principales sitios de infección son los fagocitos fijos del hepatopáncreas, pero cuando la infección progresa, esta se vuelve sistémica y se disemina hacia todo el hepatopáncreas, las branquias, el corazón y la epidermis cuticular del intestino (Li et al., 2008). En langostas severamente infectadas, el hepatopáncreas se aprecia isquémico, atrofiado, y con necrosis local, lo que provoca desgaste metabólico y letargo (Shields y Behringer, 2004; Briones-Fourzán et al., 2009). Los cambios que ocurren en los constituyentes de la hemolinfa de langostas infectadas con PaV1 tanto experimentalmente (Li et al., 2008) como naturalmente (Pascual- Jiménez et al., 2012; Herrera-Salvatierra et al., 2019) se reflejan en el incremento de la degradación del tejido y catabolismo del hepatopáncreas; por lo tanto, es posible que las langostas visiblemente enfermas exuden químicos asociados con la descomposición, dando como resultado un “olor a muerte”.

Con respecto a la evitación de co-específicos enfermos, Aggio y Derby (2011) consideraron interesante determinar si las señales de aversión se originan en el hospedero o en el patógeno. Por ejemplo, el pez *Fundulus diaphanus* detecta y discrimina a co-específicos infectados con quistes de un tremátodo parásito. En este caso la detección de peces infectados es a través de señales visuales (Krause et al., 1999), aunque las señales químicas no pueden ser desestimadas (Wisenden et al., 2009). Sin embargo, puesto que el pez es hospedero intermediario de los tremátodos, la transmisión de pez a pez es imposible. Esto indica que el pez solo puede discriminar a co-específicos “enfermos”, no a un parásito específico (Wisenden et al., 2009). De manera similar, los

resultados del tratamiento 3 sugieren que las señales de aversión provienen del hospedero más que del virus, lo que sugiere que las langostas pueden estar simplemente evitando a los co-específicos enfermos y no al patógeno. Esto también parece ser apoyado por los resultados del tratamiento 2, en el cual la respuesta de las langostas a las señales químicas de las langostas sub-clínicamente infectadas no difirió del azar, lo que sugiere que las langostas sub-clínicamente infectadas no emiten el olor repelente o bien lo emiten a niveles sub-umbral. Este resultado parecería contradecir los resultados de Behringer et al. (2006), quienes encontraron que los individuos enfermos son evitados antes de ser infecciosos. Sin embargo, aunque los ensayos de PCR que se realizaron en este trabajo permiten detectar el ADN de PaV1 en la hemolinfa de las langostas, no permiten determinar la carga viral o la progresión de la enfermedad en estas langostas.

En resumen, en condiciones de laboratorio, las langostas sanas evitan a co-específicos visiblemente enfermos durante la noche y su respuesta es similar a la que exhiben hacia co-específicos muertos. Sin embargo, esto no implica que en el medio natural las langostas sanas invariablemente evitarán compartir refugios con co-específicos enfermos. Por ejemplo, las langostas sanas a menudo cohabitan con co-específicos enfermos en “casitas”, grandes refugios artificiales que se colocan en hábitats con refugios escasos y que se utilizan para incrementar la biomasa of *P. argus* en algunos países del Caribe (Lozano-Álvarez et al., 2008; Briones-Fourzán et al., 2012; Candia-Zulbarán et al., 2012; ver Capítulo 4), un fenómeno para el cual Lozano-Álvarez et al. (2008) ofrecieron dos explicaciones posibles. Una explicación es que la gran área de refugio que proveen las casitas (hasta 2 m<sup>2</sup>) permite a las langostas sanas y enfermas compartir estos refugios sin contacto físico. Sin embargo, esta explicación no es apoyada por los resultados de nuestro tratamiento 3, en el que 16 de las 20 langostas focales evitaron los olores de langostas enfermas a una distancia de hasta 2 m (la longitud de los laberintos en Y). De manera similar, en un experimento de campo realizado para evaluar

la distribución de juveniles de langosta en un arreglo radial de refugios ubicados a 0.5, 1 y 2 m de un co-específico enfermo localizado en el centro, las langostas se movieron un promedio de 1 m de distancia de la langosta enferma después de un tiempo (Anderson y Behringer, 2013).

La otra explicación es que en hábitats con refugios escasos, el riesgo de depredación de juveniles de langosta es más alto que en hábitats con refugios abundantes, por lo que las langostas sanas enfrentan una disyuntiva (*trade-off*) entre evitar compartir refugios con co-específicos enfermos y evitar el riesgo de depredación (Lozano-Álvarez et al., 2008; 2018). De hecho, en la naturaleza, los comportamientos de evitación pueden ser costosos, tanto energéticamente como debido a disyuntivas entre demandas conflictivas (Loehle, 1995; Wisenden et al., 2009) y, como lo señalaron Shabani et al. (2009), la elección de refugio es un asunto complejo que va a depender en gran medida del contexto en el que las señales químicas son transmitidas por los co-específicos. Se necesitan más experimentos para examinar la disyuntiva entre evitar una enfermedad y evitar la depredación en diferentes contextos ecológicos.

### **Capítulo 3. Efecto del uso de refugios artificiales ‘casitas’ en la prevalencia de la enfermedad PaV1 en juveniles de *Panulirus argus*.**

#### **Introducción**

La langosta del Caribe *Panulirus argus* es la especie de langosta espinosa que más se pesca en el mundo (FAO, 2016) debido a la gran talla que alcanza, su rápido crecimiento y su presencia en hábitats que abarcan bahías y lagunas arrecifales someras, arrecifes coralinos y fondos hasta profundidades de ~70 m y (Phillips et al., 2013). En su área de distribución, esta especie se captura con muy variados artes y métodos de pesca que incluyen trampas de diversos materiales y tipos, redes de enmalle y redes agalleras en fondos relativamente profundos, así como ganchos, lazos, redes de mano o simplemente a mano, usando buceo libre, semiautónomo (“hookah”) o autónomo (SCUBA) (Briones-Fourzán y Lozano-Álvarez, 2013).

Sin embargo, desde mediados del siglo XX, pescadores cubanos empezaron a utilizar estructuras artificiales para explotar el comportamiento gregario de *P. argus* y facilitar así su captura (Cruz y Phillips, 2000). Más adelante, esta técnica fue adoptada por pescadores mexicanos en las Bahía de la Ascensión y Espíritu Santo, en Quintana Roo (Lozano-Álvarez et al., 1991b; Briones-Fourzán et al., 2000), y por pescadores de las Bahamas (Deleveaux y Bethel, 2002; Gittens et al., 2018). Dichas estructuras, llamadas “pesqueros” en Cuba, “condos” en Bahamas, y “casitas” en México y el resto del Caribe, consisten en una placa rígida —por lo general de alrededor de ~2 m<sup>2</sup> de superficie— elevada unos cuantos centímetros por encima del fondo, generando una amplia “grieta” artificial (Briones-Fourzán et al., 2000, 2007).

Si bien la adición de refugios artificiales ayuda a mitigar la escasez de refugios naturales, durante muchos años se ha mantenido una controversia sobre si las casitas solamente agregan a las langostas dispersas en el hábitat haciéndolas más vulnerables a

la captura, lo que podría eventualmente provocar un colapso en la población, o si realmente aumentan la biomasa, en cuyo caso es necesario determinar el mecanismo proximal (Butler y Herrnkind, 1997; Sosa-Cordero et al., 1998; Herrnkind et al., 1999). En la década de 1990, varios experimentos de corta duración mostraron que las casitas aumentaban la abundancia de juveniles y/o la supervivencia de langostas debido a los beneficios funcionales de la agregación (Eggleston et al., 1990, 1992, 1997; Eggleston y Lipcius, 1992; Arce et al., 1997; Sosa-Cordero et al., 1998). Pero con el objeto de determinar si esto se podría reflejar en un aumento en la biomasa, era necesario hacer un experimento de campo más prolongado en el que se contrastaran diversos atributos poblacionales de las langostas entre sitios con y sin casitas. Un experimento con dichas características tuvo lugar entre 1997 y 2002 en la laguna arrecifal de Puerto Morelos, un hábitat con escasos refugios naturales. Los resultados demostraron que en los sitios con casitas aumentó significativamente la densidad y la biomasa de juveniles de *P. argus* al brindarles refugios amplios que fomentaron su gregarismo y, por ende, su supervivencia (Briones-Fourzán y Lozano-Álvarez, 2001; Briones-Fourzán et al., 2007).

Independientemente de la complejidad vegetal, el efecto de las casitas sobre dichos atributos de las langostas tendió a ser similar en todos los sitios con casitas con en el tiempo, pero dicho efecto fue más inmediato en aquellos sitios que tenían vegetación marina más compleja (Lozano-Álvarez et al., 2009).

En Puerto Morelos, el primer brote de la enfermedad PaV1 se dio en el año 2000, y los sitios experimentales de 1 ha de superficie que contenían 10 casitas c/u (de 1m<sup>2</sup> de área y 4 cm de altura de entrada) mostraron un aumento en la prevalencia anual de langostas enfermas de 2001 (2.1%) a 2005 (7%) y a 2006 (10.9%) (Lozano-Álvarez et al., 2008; Briones-Fourzán et al., 2009), lo que podría reflejar el alto nivel de cohabitación entre langostas sanas y enfermas registrado en las casitas (Lozano-Álvarez et al., 2008). Con base en estos resultados, se plantearon dos posibles hipótesis: 1) que en hábitats

donde los refugios para langostas son escasos, las langostas hacen una compensación (*trade-off*) entre evitar el riesgo de depredación y evitar el riesgo de enfermarse, y 2) que el amplio refugio que brindan las casitas permitan a langostas sanas y enfermas cohabitar sin tener contacto físico. Sin embargo, estos niveles de prevalencia fueron similares a los encontrados en juveniles en la bahía de Florida, donde nunca se han utilizado casitas (6-8%) (Behringer et al., 2006). Por otro lado, en casitas experimentales instaladas en Banco Chinchorro en 2006, la prevalencia de langostas enfermas (7.4%) fue muy similar a la de Puerto Morelos en el 2005, a pesar de que en Banco Chinchorro se encontró un menor nivel de cohabitación entre langostas sanas y enfermas que en Puerto Morelos (Lozano-Álvarez et al., 2008). En posteriores muestreos en Banco Chinchorro, Ramírez-Estévez et al. (2010) encontraron una prevalencia de 2.2%, más baja que en muestreos anteriores, indicando variaciones temporales en los niveles de prevalencia.

En la Bahía de la Ascensión, donde la captura de langostas se basa en el uso extensivo de casitas comerciales (1.5 a 2 m<sup>2</sup> de área y 12 a 15 cm de altura de entrada), la prevalencia de langostas enfermas en la captura comercial (langostas sub-adultas y adultas), muestreada en el sitio de desembarque, fue de 0.96–3.2% en diferentes años (Candia-Zulbarán, 2011; Candia-Zulbarán et al., 2012). Por otra parte, en langostas (juveniles a adultas) muestreadas directamente en casitas distribuidas en tres zonas de la bahía durante cuatro períodos de muestreo diferentes, la prevalencia global no difirió entre periodos (4.1-5.1%) pero sí entre zonas. Estos resultados generan nuevas interrogantes sobre los efectos potenciales de diversos factores ambientales locales en la ecología de esta enfermedad en poblaciones de *P. argus* (Candia-Zulbarán, 2011; Briones-Fourzán et al., 2012). En ese mismo estudio, el 86% de las langostas enfermas se encontraron compartiendo casitas con langostas sanas, pero las casitas que sólo contenían langostas sanas tuvieron en promedio más langostas que las casitas co-ocupadas por langostas sanas y enfermas. Sin embargo, del total de casitas

muestreadas, una alta proporción albergaba langostas sanas con enfermas y una baja proporción sólo albergaba langostas enfermas, lo que parecería apoyar la segunda hipótesis planteada por Lozano-Álvarez et al. (2008) de que el área de refugio que proveen estas casitas (~2 m<sup>2</sup>) podría limitar el contacto entre langostas sanas y enfermas.

En el Golfo de Batabanó, Cuba, Cruz-Quintana et al. (2011) muestrearon langostas tanto en casitas comerciales como en “condominios” (otro tipo de refugios artificiales diseñados para monitorear cambios en la abundancia de juveniles tardíos) en diferentes zonas y períodos. La prevalencia promedio global fue de 4.48% pero varió entre zonas, similar a lo encontrado en Bahía de la Ascensión (Candia-Zulbarán, 2011; Candia-Zulbarán et al., 2012) aunque, a diferencia de Bahía de la Ascensión, la prevalencia en el Golfo de Batabanó también difirió entre períodos (Cruz-Quintana et al., 2011). Estos mismos autores mencionan de manera anecdótica que las langostas enfermas tendían a estar solitarias en casitas, aunque no brindaron datos cuantitativos.

Briones-Fourzán et al. (2012) analizaron el efecto de diversos factores sobre la prevalencia de langostas enfermas en los sitios de Bahía de la Ascensión muestreados por Candia Zulbarán (2011) y Candia-Zulbarán et al. (2012), encontrando que los sitios con mayor prevalencia de langostas enfermas tenían una vegetación marina más densa y compleja y eran comparativamente menos someros que donde la prevalencia era menor. Dichos autores plantearon la posibilidad de que la vegetación marina sea un reservorio ambiental de viriones de PaV1 y prolongue su persistencia al protegerlos con su sombra de los efectos dañinos de la luz ultravioleta.

En el presente capítulo, se presentan resultados de un estudio de campo manipulativo llevado a cabo en la laguna arrecifal de Puerto Morelos con el objeto de examinar (1) si la presencia de casitas se reflejaba con el tiempo en mayores niveles de prevalencia de langostas enfermas con PaV1 y (2) si posteriormente la extracción sistemática de langostas visiblemente enfermas alteraba los niveles de prevalencia en los

sitios con casitas. Para tratar de contestar estas preguntas, el estudio se dividió en dos etapas, cuyos diseño y resultados se presentan por separado.

### **Área de Estudio**

La laguna arrecifal de Puerto Morelos (20°52'07.3" N, 86°51'40.0" W) está ubicada en la porción norte de la costa de Quintana Roo (Caribe Mexicano) (Fig. 3.1). La laguna se extiende desde la línea de costa hasta un arrecife coralino que corre ligeramente en diagonal a una distancia de ~ 500 a 2000 m de la costa. La profundidad en la laguna arrecifal es  $\leq 5$  m. El sistema arrecifal coralino de Puerto Morelos fue declarado área marina protegida en 1998 (Instituto Nacional de Ecología, 2000) y la pesca de langosta quedó restringida a unas cuantas partes de la zona frontal del arrecife; por tanto, no hay pesca de langostas en la laguna arrecifal. Además, debido a la escasez de langostas de talla comercial en el hábitat arrecifal frente a Puerto Morelos (Lozano-Álvarez et al., 2007), los pescadores locales prefieren capturar langostas en lugares situados a varios kilómetros al norte y sur de Puerto Morelos (Lozano-Álvarez et al., 1991a, Padilla-Ramos y Briones-Fourzán, 1997).

El fondo de la laguna arrecifal está compuesto principalmente por arena calcárea estabilizada por amplias praderas de pastos marinos, aunque en algunas partes aflora el pavimento calcáreo. A partir de la línea de costa, la laguna arrecifal puede dividirse en 3 zonas sobre la base de la vegetación: (1) Laguna costera: una estrecha franja costera de 20–50 m de ancho dominada por pastos marinos (*Thalassia testudinum* o bien *Syringodium filiforme*) con escasas algas rizofíticas, (2) Laguna media: una amplia zona de 400–1000 m de ancho donde la vegetación es muy variable pero abundan los pastos marinos *T. testudinum* y *S. filiforme* en niveles moderados de densidad y altura de hoja, pero con mayor abundancia de algas rizofíticas y también de algas de deriva como

*Lobophora variegata*, y (3) Laguna posterior: una zona adyacente a la parte posterior (protegida) del arrecife, de 100–400 m de ancho donde domina el pasto *T. testudinum* con niveles bajos de densidad y altura de hojas, el pasto *S. filiforme* es relativamente escaso, y hay una abundancia variable de algas rizofíticas (Ruiz-Rentería et al., 1998). De esta manera, en comparación con la laguna media, la zona de la laguna cercana al arrecife posterior tiene un capa de sedimento significativamente más delgada y mayores áreas con vegetación baja y poco densa, así como una biomasa mucho menor de algas de deriva (Briones-Fourzán y Lozano-Álvarez, 2001b; Lozano-Álvarez et al., 2009). La temperatura del agua es típicamente más alta en julio-septiembre, y más baja durante enero-marzo (Ruiz-Rentería et al., 1998; Rodríguez-Martínez et al., 2010). En la laguna arrecifal de Puerto Morelos, los refugios naturales tipo grieta que utilizan los juveniles de langosta son escasos y muchos son de naturaleza efímera (Briones-Fourzán y Lozano-Álvarez, 2001a; Lozano-Álvarez et al., 2009). Es decir, el refugio es un factor limitante para la población local de juveniles de *P. argus* ya que su falta o escasez aumenta el riesgo de depredación y reduce la abundancia local de langosta (Briones-Fourzán et al., 2007).

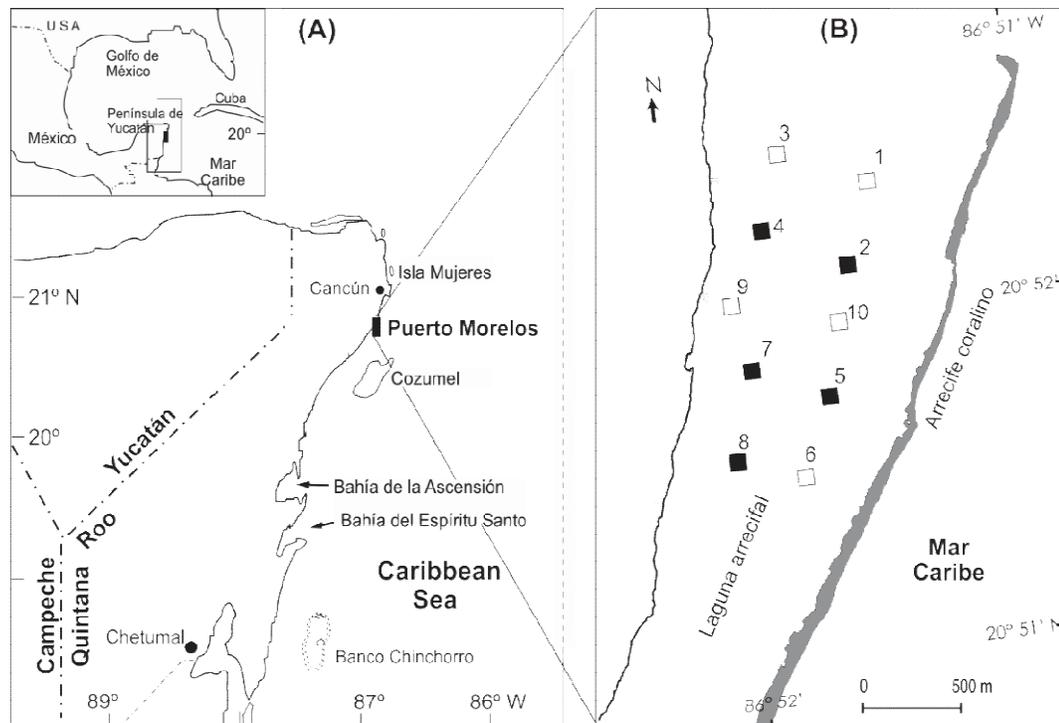


Fig. 3.1. (A) Ubicación de Puerto Morelos en México y el Caribe. (b) Esquema de la laguna arrecifal de Puerto Morelos mostrando los sitios de muestreo. Los cuadros blancos representan los 5 sitios sin casitas y los cuadros negros representan los 5 sitios con casitas.

***Etapas 1: Efecto de las casitas en la densidad de juveniles de *P. argus* y prevalencia de individuos clínicamente infectados con PaV1***

**Objetivos**

- 1) Determinar y comparar a lo largo del tiempo la densidad poblacional y niveles de prevalencia de la enfermedad PaV1 en juveniles de *P. argus* en sitios con casitas y sitios sin casitas distribuidos en la laguna arrecifal de Puerto Morelos.
- 2) Determinar si hay una relación entre la densidad de langostas y los niveles de prevalencia clínica de PaV1.

**Hipótesis**

Si el principal modo de transmisión del PaV1 es el contacto físico, entonces la

prevalencia de langostas enfermas tenderá a ser mayor en los sitios con casitas (donde se espera una mayor densidad y tendencia a agruparse de las langostas) que en los sitios sin casitas.

Si la transmisión de la enfermedad aumenta con la densidad poblacional, entonces se encontrará una correlación positiva entre densidad de langostas y prevalencia de la enfermedad.

## **Material y Métodos**

### **Diseño experimental y muestreo de langostas**

Entre julio y agosto de 2009 se delimitaron 10 sitios experimentales en la laguna arrecifal de Puerto Morelos (Fig. 3.1). Las dimensiones de cada sitio eran de 100 m × 100 m (= 1 ha). La elección del tamaño del sitio (1 ha) se debe a que los juveniles de *P. argus* muestran un alto nivel de fidelidad al refugio y un ámbito de movimiento diario del orden de <1 a ~20 m (Acosta y Butler, 1997; Lozano-Álvarez et al., 2009). Para asegurar la independencia de los datos, los sitios se encontraban separados entre sí (y del arrecife coralino) por distancias entre 200 y 400 m. Estas distancias exceden los ámbitos de movimiento de los juveniles de langosta, como lo demostró un estudio previo de marcaje-recaptura en esta misma laguna arrecifal (Briones-Fourzán et al., 2007). Si bien la presencia de varias casitas en un sitio dado aumenta la movilidad de individuos dentro del sitio, no afecta la movilidad entre sitios (Briones-Fourzán et al., 2007).

En agosto de 2009, en cada uno de 5 de los sitios se instalaron 10 casitas. Las dimensiones de las casitas eran 1 m<sup>2</sup> de área × 4 cm de altura de entrada y 8 cm de altura interior. Las casitas se distribuyeron al azar dentro del sitio pero dejando una distancia mínima de 20 m entre casitas adyacentes (Briones-Fourzán y Lozano-Álvarez, 2001a). Estos 5 sitios se denominaron “sitios con casitas”. Los otros 5 sitios permanecieron sin casitas y se denominaron “sitios sin casitas” (Fig. 3.1). Con el objeto de facilitar el trabajo

dentro de cada sitio, se instalaron estacas de madera cada 10 m en toda el área de cada sitio, quedando este dividido en 100 sub-áreas de 100 m<sup>2</sup> (10 m × 10 m).

A partir de noviembre de 2009, todos los sitios se muestrearon utilizando buceo SCUBA. Los muestreos se realizaron cada 3 a 4 meses con el fin de minimizar la posibilidad de una correlación serial de los datos, ya que Briones-Fourzán et al. (2007), estimaron la persistencia media de los juveniles de langosta en  $80.9 \pm 17.8$  días (media  $\pm$  DE) en los sitios con casitas y  $40.7 \pm 10.3$  días en los sitios sin casitas. En cada muestreo, se revisó el área total de cada sitio, revisando todos los refugios potenciales para juveniles de langosta, incluyendo las casitas (en sitios con casitas). Cada uno de los refugios (tanto los pre-existente como las casitas) fue examinado para determinar si albergaba una o más langostas juveniles. Las langostas se extrajeron de sus refugios y se examinaron para determinar si presentaba uno o más signos clínicos de la enfermedad PaV1 (hemolinfa lechosa, acompañada o no de coloración rojiza del caparazón). Las langostas con estos signos se consideraron como “enfermas” (Montgomery-Fullerton et al., 2007; Li et al., 2008; Candia-Zulbarán et al., 2012; Huchin-Mian et al., 2013). Las langostas que no mostraban ningún signo clínico de la enfermedad se consideraban como “sanas”. A todas las langostas se les midió la longitud cefalotorácica (LC, mm, desde la escotadura inter-orbital hasta el extremo posterior del cefalotórax) con un vernier ( $\pm 0.1$  mm). Todas las langostas fueron analizadas in situ (bajo el agua) para evitar su exposición al aire y para minimizar el estrés causado por la manipulación. Después de la toma de datos, las langostas eran regresadas cuidadosamente al mismo refugio del que habían sido extraídas.

## **Análisis estadísticos**

Las variables de respuesta consideradas en esta etapa del trabajo fueron densidad de langostas (no. de langostas por hectárea), talla media de langostas, y prevalencia de la enfermedad (porcentaje de langostas con signos clínicos de la enfermedad PaV1). Los datos de densidad (previamente transformados a  $\ln(N + 1)$  para aumentar la homogeneidad de varianzas) y de talla media fueron sometidos por separado a ANOVAs de Medidas Repetidas por medio de Modelos Lineales Generales. El factor principal (fijo) fue el Tratamiento (2 niveles, sitios con casitas y sitios sin casitas), mientras que el Tiempo (10 muestreos: Nov09 – Abr12) fue la medida repetida. Los datos de prevalencia fueron sometidos a un análisis de regresión logística en que la variable de respuesta (binaria) fue la ausencia / presencia de signos clínicos de la enfermedad PaV1, mientras que el Tratamiento (con dos niveles, con/sin casitas, y cinco repeticiones por nivel) y el Tiempo (N muestreos: Nov09 – Abr12) se consideraron como factores categóricos (Quinn y Keough, 2002). En el caso de efectos significativos, se estimó la oportunidad relativa (traducción propuesta por Martín-Moreno y Banegas (1997) para el término *odds ratio*) de cada nivel de factor en función del nivel de referencia.

Por otro lado, se aplicó un análisis de correlación a los datos de densidad (número de langostas  $ha^{-1}$ ) *versus* prevalencia de la enfermedad (porcentaje de individuos enfermos). Para ello, se consideraron los datos de todos los sitios individuales con y sin casitas en los que el número de langostas en cada sitio fue  $\geq 5$ , que es el mínimo indispensable para estimaciones de prevalencia (Putt et al., 1988).

## **Resultados**

**Densidad:** Los resultados del ANOVA de medidas repetidas aplicada a la variable Densidad mostraron efectos significativos de los factores Tratamiento y Tiempo, pero no

de su interacción (Tabla 3.1). En promedio, la densidad de las langostas fue más ocho veces más alta en los sitios con casitas ( $72.4 \pm 46.3$  langostas/ha, media  $\pm$  IC 95%) que en los sitios sin casitas ( $8.7 \pm 1.7$  langostas/ha) (Fig. 3.2).

Tabla 3.1. Resultados del ANOVA de medidas repetidas para la variable Densidad (No. de langostas por hectárea)

Efecto	SS	g.l.	MS	F	p
Intercepto	921.177	1	921.177	320.952	<0.001
Tratamiento	112.931	1	112.931	39.347	<0.001
Error	22.961	8	2.870		
Tiempo	12.7802	9	1.4200	6.6162	<0.001
Tiempo*Tratam	3.1179	9	0.3464	1.6141	0.127
Error	15.4532	72	0.2146		

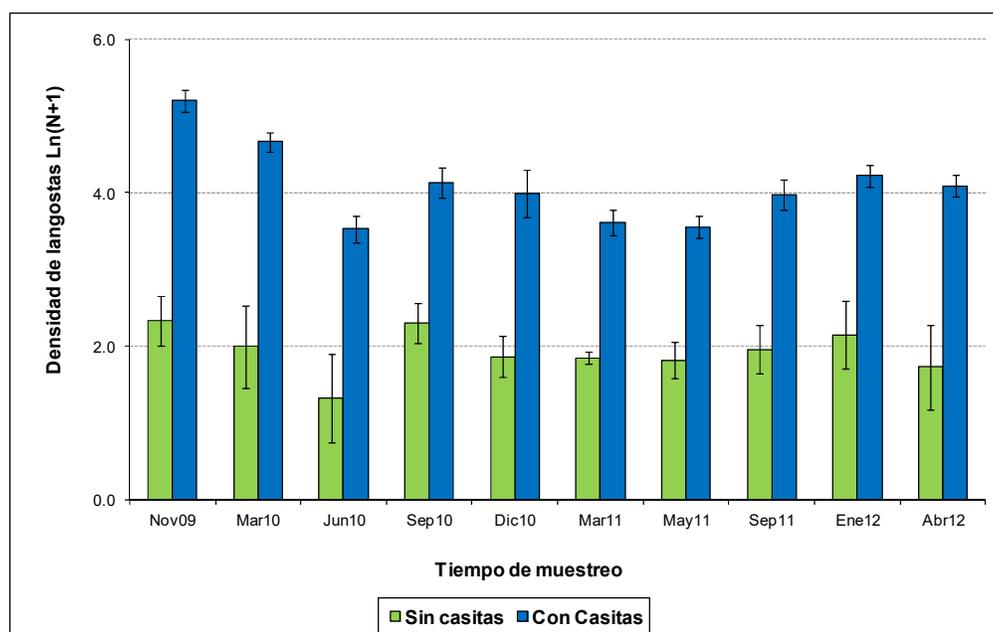


Fig. 3.2. Densidad de langostas ( $\ln(N + 1)$ ) por tiempo de muestreo para cada uno de tratamientos (Sin casitas,  $n = 5$  sitios de 1 ha cada uno; Con casitas,  $n = 5$  sitios de 1 ha cada uno). Las barras de error representan el IC 95%.

**Talla media:** Al igual que en el caso de la densidad, los resultados del ANOVA-MR aplicado a los datos de talla media mostraron efectos significativos de los factores

Tratamiento y Tiempo, pero no de su interacción (Tabla 3.2). En todos los muestreos, la talla media de las langostas fue mayor en los sitios con casitas que en los sitios sin casitas (Figura 3.3).

Tabla 3.2. Resumen del ANOVA de medidas repetidas para Talla media de langostas (LC, mm).

	SS	g. l.	MS	F	p
<b>Intercepto</b>	785.4913	1	785.49	15014.71	<0.001
<b>Tratamiento</b>	1.8088	1	1.81	34.58	0.001
<b>Error</b>	0.3139	6	0.05		
<b>Tiempo</b>	0.4608	9	0.05	3.73	0.001
<b>Tiempo*Tratam</b>	0.2103	9	0.02	1.70	0.111
<b>Error</b>	0.7417	54	0.01		

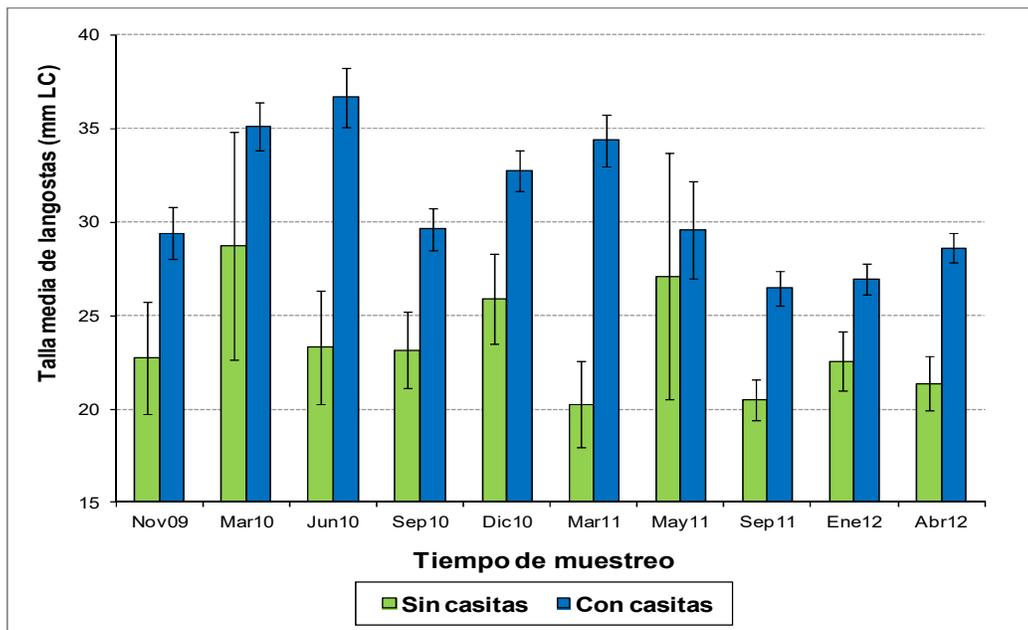


Fig. 3.3. Talla media de langostas por tiempo de muestreo, para cada uno de los tratamientos (Sin casitas, n = 5 sitios de 1 ha cada uno; Con casitas, n = 5 sitios de 1 ha cada uno). Las barras de error indican el IC 95%.

**Prevalencia:** En general, la abundancia de refugios pre-existentes en la laguna arrecifal de Puerto Morelos es relativamente baja, de tal manera que en algunos de los sitios sin

casitas la abundancia de juveniles de langosta fue sistemáticamente muy baja. De hecho, en varios muestreos hubo entre 0 y 4 langostas en uno o más de estos sitios. Dado que se requiere de al menos 5 individuos para estimaciones de prevalencia válidas (Putt et al., 1988), esto impidió la aplicación del análisis de regresión logística como se tenía planeado, ya que para este tipo de análisis es necesario que haya ceros (es decir, langostas sanas) y unos (langostas enfermas) en todos los niveles de todos los factores.

Por esta razón, fue necesario eliminar el nivel “sitio”, de tal manera que para cada muestreo se agruparon los datos de todas las langostas de los sitios sin casitas por un lado, y de todas las langostas de los sitios con casitas por otro lado. Así, la regresión logística solo consideró los factores Tratamiento (2 niveles: con y sin casitas, con este último como nivel de referencia) y Tiempo (10 niveles correspondientes a los 10 censos, con el censo de abril de 2012 como nivel de referencia).

Los resultados de este análisis mostraron que la probabilidad de encontrar langostas enfermas no difirió significativamente entre tratamientos ni entre censos (Tabla 3.3). La comparación gráfica se muestra en la figura 3.4. En promedio, la prevalencia de langostas con enfermedad PaV1 fue similar en el conjunto de sitios son casitas (media, IC 95%: 14.0%, 10.8-17.8%) que en el conjunto de sitios con casitas (14.4%, 13.3-15.6%).

Tabla 3.3. Resumen del análisis de regresión logística para los efectos de los factores Muestreo (con 10 niveles, NOV09 a ABR12) y Tratamiento (con 2 niveles, Con casitas y Sin casitas) sobre la probabilidad de encontrar langostas enfermas (clínicamente infectadas con PaV1) en los sitios experimentales de la Laguna Arrecifal de Puerto Morelos. Ninguno de estos factores, ni su interacción, fueron significativos.

<b>Efecto</b>	<b>Estimado</b>	<b>Wald estadístico</b>	<b>gl</b>	<b>p</b>
Intercepto		460.336	1	<b>&lt;0.001</b>
Muestreo		14.715	9	0.099
Tratamiento		1.132	1	0.287
Muestreo × tratamiento		8.494	9	0.485

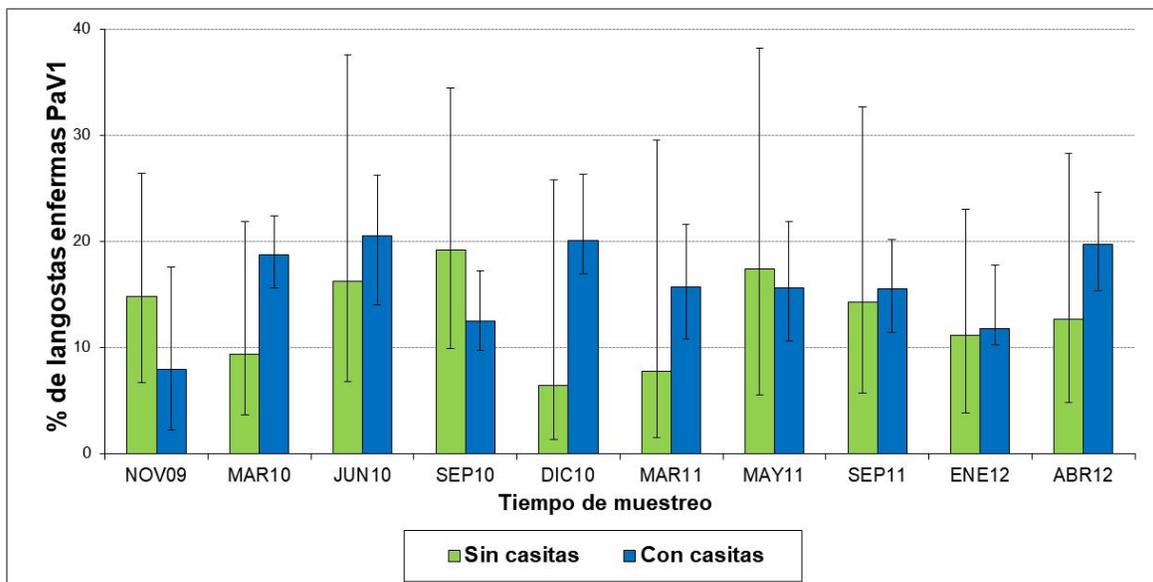


Fig. 3.4. Prevalencia de la enfermedad PaV1 (% langostas con signos clínicos de la enfermedad) por periodo de muestreo en el conjunto de sitios de cada Tratamiento (Sin casitas, n = 5 sitios de 1 ha cada uno; Con casitas, n = 5 sitios de 1 ha cada uno). Las barras de error indican el IC 95%.

### Relación entre densidad de langostas y prevalencia clínica de PaV1

Con los datos de los 10 censos de la primera etapa del estudio de campo, no se encontró una correlación significativa entre la densidad de langostas y los valores de prevalencia clínica de PaV1 ( $r = -0.039$ ,  $N = 80$ ,  $p = 0.727$ ) (Fig. 3.5). Del total de datos, 50 correspondieron a los sitios con casitas (5 sitios  $\times$  10 censos) y 30 a los sitios sin casitas, ya que 20 datos no pudieron ser considerados por corresponder a sitios que tuvieron menos de 5 langostas en algún censo (ver Apéndice 2).

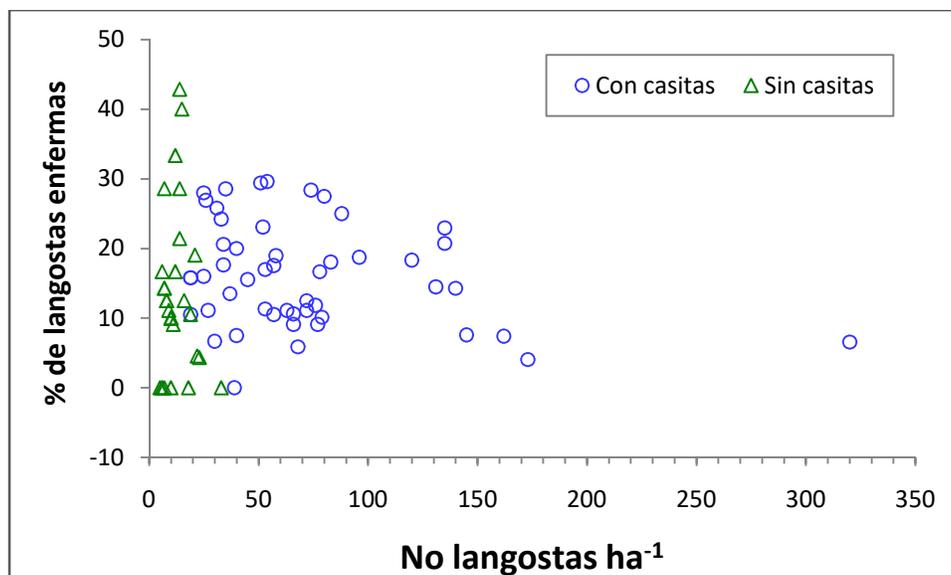


Fig. 3.5. Relación entre la densidad de langostas (No. de langostas  $ha^{-1}$ ) y la prevalencia de la enfermedad PaV1 (porcentaje de langostas con signos clínicos) en sitios con casitas (círculos) y sitios sin casitas (triángulos). No se incluyen los datos en los que la densidad fue menor a 5 langostas por sitio por censo (correspondientes a sitios sin casitas en todos los casos)

### ***Etapa 2: Efecto de la remoción de individuos enfermos en los niveles de prevalencia de la enfermedad PaV1***

El manejo de una enfermedad en una pesquería puede llegar a ser difícil debido a que la dinámica de la enfermedad no necesariamente está relacionada con el acto de la captura. Además, las tasas de propagación de enfermedades suelen ser mucho mayores en el medio marino que en el medio terrestre (McCallum et al., 2003; Harvell et al., 2004). En animales terrestres, se utilizan algunas medidas de remediación de enfermedades infecciosas tales como las cuarentenas, las matanzas selectivas, o la vacunación, cuyo efecto es cuestionable (p. ej. Donnelly et al., 2003). Estas medidas, con muy pocas excepciones (p. ej. Culver y Kuris, 2000), tampoco parecen ser efectivas en el medio marino (Harvell et al., 2004; Burge et al., 2014). A pesar de ello, algunos autores han propuesto extraer y destruir animales marinos enfermos, así como prohibir el regreso de individuos enfermos al agua, con el fin de reducir la transmisión de las enfermedades

(Shields, 2003;Behringer et al., 2012). En algunos lugares, los pescadores lo realizan de manera intuitiva; por ejemplo, en la Bahía de la Ascensión, los pescadores extraen las langostas enfermas que encuentran para destruirlas en tierra (Candia-Zulbarán et al., 2012). Con esta práctica, se pretende disminuir los niveles de prevalencia de la enfermedad al eliminar a los individuos potencialmente más infecciosos, pero a la fecha esta hipótesis no ha sido probada. En el presente trabajo de tesis se planteó examinar si la extracción de individuos enfermos tendría un efecto en la prevalencia de la enfermedad. Este análisis se llevó a cabo exclusivamente en los sitios con casitas dado que durante gran parte de la etapa 2 los números de langostas fueron muy bajos (<5) en varios de los sitios sin casitas (ver Apéndice 2), lo que impidió la estimación de prevalencias (Putt et al., 1988),

### **Hipótesis**

Si la presencia de individuos enfermos en los sitios experimentales representa un foco de infección permanente, entonces se espera que la extracción de todas las langostas enfermas observadas en los sitios durante cada revisión (censo) se vea reflejada en una disminución en la prevalencia de la enfermedad.

### **Material y Métodos**

Los muestreos en el campo se realizaron de la misma manera que en la etapa 1 en tanto que se contaba a todas las langostas y se les examinaba para determinar si tenían signos clínicos de la enfermedad PaV1, pero con la diferencia de que a partir del muestreo realizado en septiembre de 2012 (inicio de la etapa 2), fueron extraídas todas las langostas visiblemente enfermas encontradas dentro de los sitios experimentales.

Dentro de esta etapa, se hicieron ocho muestreos entre septiembre de 2012 y enero de 2015.

### **Análisis estadístico**

Se utilizó un análisis de regresión logística en el que la variable de respuesta (binaria) fue la ausencia/presencia de signos clínicos de la enfermedad PaV1 y se consideraron como factores categóricos la Etapa (con dos niveles, etapa 1 y etapa 2, quedando esta última como nivel de referencia) y el Sitio (con 5 niveles correspondientes a los 5 sitios con casitas, siendo el sitio 8 el nivel de referencia).

### **Resultados**

En el caso de los sitios con casitas, se examinaron un total de 5668 langostas que se encontraron habitando tanto las casitas como los escasos refugios pre-existentes dentro de los límites de cada sitio, de las cuales 3593 correspondieron a la etapa 1 (intervalo de talla: 6.5–69.4 mm LC) y 2075 a la etapa 2 (intervalo de talla: 7.0–76.0 mm LC).

La tabla 3.4 muestra el resumen del análisis de regresión logística aplicado a los sitios con casitas. La probabilidad de encontrar langostas enfermas no difirió significativamente entre etapas (1 o 2) pero sí entre sitios, mientras que la interacción entre ambos factores no fue significativa.

La estimación de los parámetros se aprecia en la tabla 3.5. En el caso de los sitios, donde hubo diferencias significativas en la probabilidad de encontrar langosta enfermas, la probabilidad fue menor en los sitios 5 (oportunidad relativa: 0.81) y 7 (oportunidad relativa: 0.73), y mayor en el sitio 4 (oportunidad relativa: 1.38), con respecto al sitio 8 (que fue el nivel de referencia),

Tabla 3.4. Resumen del análisis de regresión logística para los efectos de los factores Etapa experimental (con 2 niveles, antes y después de remover a las langostas enfermas de cada sitio) y Sitio (con 5 niveles correspondientes a cada uno de los 5 sitios con casitas) sobre la probabilidad de encontrar langostas enfermas (clínicamente infectadas con PaV1) Solo el efecto de Sitio fue significativo.

<b>Efecto</b>	<b>Estadístico</b>		
	<b>gl</b>	<b>de Wald</b>	<b>p</b>
Intercepto	1	1079.085	<0.0001
Etapa	1	3.227	0.0724
Sitio	4	28.029	<0.0001
Etapa × Sitio	4	2.574	0.6313

Tabla 3.5. Parámetros estimados en el análisis de regresión logística para probar el efecto de la Etapa (1: antes y 2: después de remover las langostas enfermas; nivel de referencia: Etapa 2) y el Sitio (los 5 sitios con casitas: 2, 4, 5, 7 y 8; nivel de referencia: Sitio 8) en la probabilidad de encontrar langostas enfermas.

<b>Nivel</b>		<b>Error estándar</b>	<b>Estadístico de Wald</b>	<b>p</b>	<b>Oportunidad relativa (IC 95%)</b>	
<b>del Efecto</b>	<b>Estimado</b>					
Intercepto		-1.472	0.045	1079.085	<0.0001	
Etapa	Etapa 1	-0.080	0.045	3.227	0.0724	0.92 (0.88–1.01)
Sitio	2	0.156	0.081	3.712	0.0540	1.17 (1.00–1.37)
Sitio	4	0.321	0.075	18.464	<0.0001	1.38 (1.19–1.60)
Sitio	5	-0.208	0.089	5.522	0.0188	0.81 (0.68–0.97)
Sitio	7	-0.318	0.112	7.998	0.0047	0.73 (0.58–0.91)

En la figura 3.6 se presenta la prevalencia media en cada uno de los cinco sitios con casitas durante las etapas 1 y 2.

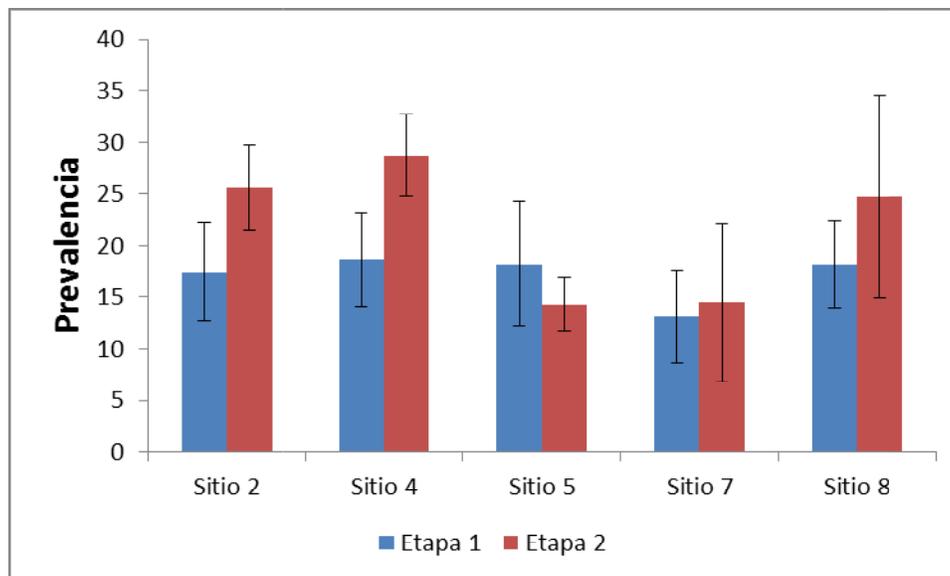


Figura 3.6. Prevalencia media de la enfermedad por Pav1 en cada uno de los 5 sitios con casitas durante la etapa 1 (10 censos) y la etapa 2 (8 censos) de muestreo. Las barras de error muestran el IC 95%.

## Discusión

El modo de transmisión por contacto podría causar altas prevalencias de langostas clínicamente infectadas con PaV1 en las poblaciones de langostas en áreas donde se colocan casitas, dada su distribución agregada en estos grandes refugios. Para examinar esta posibilidad, se llevaron a cabo revisiones (censos) de sitios con y sin casitas con el fin de determinar los niveles de prevalencia de langostas con signos clínicos de la enfermedad por PaV1 (enfermas) y analizar algunos factores de riesgo potenciales.

Claramente, durante la etapa 1 del trabajo de campo las casitas aumentaron de manera sustancial la densidad y talla media de juveniles de *P. argus* en los sitios con casitas en comparación con los sitios sin casitas. En particular, la densidad aumentó cerca de nueve veces en promedio en los sitios con casitas. Estos resultados eran de esperarse ya que experimentos previos obtuvieron resultados similares (Briones-Fourzán y Lozano-Álvarez, 2001a; Briones-Fourzán et al. 2007), pero para los fines del presente

trabajo resultaba de mayor interés examinar el efecto de las casitas en la prevalencia de langostas enfermas con PaV1.

Desafortunadamente, la escasez de langostas en los sitios sin casitas no permitió un análisis de la prevalencia con el mismo grado de detalle que la densidad o la talla media. Sin embargo, los resultados agrupados por categoría de sitio mostraron una prevalencia similar entre el conjunto de sitios con casitas y el conjunto de sitios sin casitas. Además, no se encontró una correlación significativa entre la densidad de langostas y la prevalencia de la enfermedad. Otros autores sostienen que el PaV1 se transmite principalmente por contacto entre langostas infectadas y sanas (Butler et al., 2008, 2015; Behringer et al., 2011); por tanto, sería de esperar que la prevalencia de langostas enfermas fuera mayor en los sitios con casitas, donde hay muchas más langostas y más agrupadas, que en los sitios sin casitas, donde hay pocas langostas y más dispersas, y que a mayor densidad de langostas hubiera más prevalencia de la enfermedad. Sin embargo, los resultados del presente estudio no reflejan estas predicciones. Resulta interesante que en un ejercicio de simulación en el que se examinó el *trade-off* entre el riesgo de depredación y la transmisión de PaV1 en diferentes escenarios de estructura espacial de los hospederos y comportamiento de evitación de individuos enfermos por medio de modelos, tampoco se encontró un incremento en la transmisión o persistencia de PaV1 al aumentar la agregación espacial de langostas (Dolan et al., 2014).

La explicación alternativa es que las langostas sanas estén evitando a las langostas enfermas (Behringer et al., 2006; ver Capítulo 2 del presente trabajo), o bien que puedan compartir casitas con langostas enfermas pero distanciándose de estas en el interior de la casita (hipótesis 2 de Lozano-Álvarez et al., 2008), lo cual es explorado en el Capítulo 4 de esta tesis por medio de análisis de distribución de langostas entre los refugios/casitas disponibles. Sin embargo, las langostas con signos clínicos de PaV1 se

encuentran en una fase avanzada de la enfermedad (fase 3 y 4) de acuerdo a la escala de Li et al., (2008), con un hepatopáncreas muy dañado y disfuncional, lo que implica que no sobrevivirán (Behringer et al., 2011; Cruz-Quintana et al., 2011; Pascual-Jiménez et al., 2012; Herrera-Salvatierra et al., 2019). Por otro lado, los niveles reales de prevalencia de la infección son mayores, ya que muchas langostas pueden estar infectadas aunque clínicamente no lo manifiesten, y al mismo tiempo ser infecciosas (Behringer et al., 2011). Por ejemplo, en la Bahía de la Ascensión, Huchin-Mian et al. (2013) estimaron que por cada langosta con signos clínicos de la enfermedad, hay otra langosta infectada sub-clínicamente, lo que también se encontró en la laguna arrecifal de Puerto Morelos (ver Capítulo 5 del presente trabajo).

Durante la etapa 2 del trabajo, a lo largo de ocho censos que abarcaron cerca de dos años y medio, en cada uno de los cuales se removi6 a todas las langostas enfermas de cada uno de los sitios experimentales, no se encontr6 una diferencia significativa en la probabilidad de encontrar langostas infectadas en comparaci6n con la etapa 1, durante la cual nunca se extrajo a las langostas enfermas. Este resultado es consistente con la opini6n de varios expertos en el sentido de que la extracci6n o destrucci6n selectiva de organismos enfermos no funciona como mecanismo de erradicaci6n o manejo de las enfermedades marinas debido a la falta de conocimientos, por un lado, sobre la importancia relativa de los posibles reservorios ambientales o vectores (Small y Pagenkopp, 2011; Burge et al., 2014) y por otro lado, sobre los diversos mecanismos de transmisi6n y dispersi6n de los pat6genos en el oc6ano (McCallum et al., 2003, Harvell et al., 2009, Kough et al., 2015, Lozano-Álvarez et al., 2015). Algo similar ocurre con las especies invasoras marinas, que una vez establecidas son casi imposibles de erradicar (p.ej. pez le6n, Albins y Hixon, 2013). En una b6squeda bibliogrÁfica solo se encontr6 un trabajo en el que aparentemente se logr6 controlar una especie marina invasora parÁsita a trav6s de la extracci6n selectiva de la especie hospedera (Culver y Kuris, 2000).

Los resultados del análisis de la etapa 2 mostraron diferencias significativas en la probabilidad de encontrar langostas enfermas entre los cinco sitios con casitas, lo que sugiere que hay otros factores ambientales que podrían estar influenciando los niveles de prevalencia. Por ejemplo, en Bahía de la Ascensión, Briones-Fourzán et al. (2012), encontraron una mayor probabilidad de encontrar langostas clínicamente infectadas con PaV1 en sitios con vegetación marina densa que en sitios con poca vegetación, lo que llevó a estos autores a sugerir que la vegetación podría ser un reservorio de PaV1, como se ha encontrado para otros patógenos (Small y Pagenkopp, 2011). En los sitios con casitas de la laguna arrecifal de Puerto Morelos, Lozano-Álvarez et al. (2009) encontraron una mayor heterogeneidad en la densidad de la vegetación en los sitios 4, 7 y 8 (es decir, los que se encontraban en la laguna media) que en los sitios 2 y 5 (es decir, los que se encontraban más cercanos al arrecife), donde en términos generales la vegetación fue menos compleja. Sin embargo, esos resultados no se pueden extrapolar al presente estudio, ya que la vegetación marina en la laguna arrecifal es altamente dinámica por efectos de tormentas y huracanes, presión de herbivoría y entrada de nutrientes de fuentes antrópicas entre otros factores (van Tussenbroek et al., 2008, van Tussenbroek, 2011).

Existen técnicas moleculares que permiten detectar la presencia de PaV1 (Montgomery-Fullerton et al. 2007, ver Capítulo 5), y más recientemente cuantificar las partículas de PaV1 (Clark et al., 2018). Sería interesante utilizar dichas técnicas para analizar de manera simultánea la prevalencia de PaV1, las características de la vegetación marina, y la posible presencia de viriones viables en dicha vegetación en sitios con diferentes atributos ecológicos. Por otro lado, aunque en algunos estudios no se encontraron señales de PaV1 en tejidos de otras especies de crustáceos que co-ocurren con *P. argus*, como *P. guttatus*, *Menippe mercenaria* y *Maguimithrax spinosissimus* varias semanas después de haber sido inoculados con hemolinfa de una langosta enferma

(Butler et al., 2008, Huchin-Mian, 2013), tampoco se puede descartar la posible presencia de otros especies animales que actúen como vectores o reservorios de PaV1 (Davies et al. 2019, 2020).

## **Capítulo 4. Distribución de langostas sanas y enfermas en casitas y refugios naturales**

### **Introducción**

Diversos tipos de parásitos y patógenos tales como bacterias, hongos, gusanos y virus producen enfermedades que pueden afectar a determinados grupos animales (Hart y Hart, 2018; Coulson et al., 2018). La salud, tanto de individuos como de poblaciones, generalmente se ve afectada por el ambiente en el que viven, es decir, algunos ambientes pueden albergar más patógenos que otros y, dado que las densidades de las poblaciones varían a lo largo de los ambientes, la dinámica de transmisión de las enfermedades también puede verse afectada (Pinter-Wollman et al., 2018). Algunos animales son sociales y agregarse con co-específicos puede proveer beneficios tales como vigilancia cooperativa, defensa grupal, aumento de oportunidades de forrajeo y reproducción (Lima y Dill, 1990), pero también puede tener costos, tales como incremento de la agresión e incremento en la transmisión de parásitos y enfermedades infecciosas (Hart, 1990).

La forma en que un animal se ajusta a una situación o ambiente específico, es mediante el despliegue de un comportamiento adaptativo, el cual le permite sobrevivir a lo largo el tiempo y alcanzar la reproducción (Amdam y Hovland, 2011). Estas adaptaciones conductuales también pueden ayudar a que los posibles hospederos puedan evitar ser colonizados por ciertos parásitos y patógenos, y reducir la dispersión de estos organismos (Loehle, 1995; Curtis et al., 2011; Sarabian et al., 2018). Las estrategias para evitar a los parásitos incluyen evitar a los parásitos en sí y a las señales de su presencia en co-específicos, heteroespecíficos, presas, alimentos y hábitat (Sarabian et al., 2018). Por ejemplo, algunas aves son capaces de detectar sitios de anidamiento infestados con ectoparásitos y prefieren utilizar aquellos que no lo están (Bush y Clayton, 2018). En mamíferos, aquellos que constituyen el ganado doméstico de libre forrajeo, que

principalmente son afectados por helmintos parásitos gastrointestinales, evitan alimentarse en parches donde hay heces fecales para reducir su exposición a las larvas infecciosas (Coulson et al., 2018). Las hembras de peces mosquito *Gambusia affinis* y *G. holbrooki*, son capaces de reconocer a los machos infestados por tremátodos por las manchas negras que presentan en el cuerpo y los evitan durante los intentos de apareamiento (Tobler y Schlupp, 2008; Horth et al., 2013).

Aunque *P. argus* presenta uno de los grados de gregarismo más elevados entre las especies de langostas espinosas (Childress, 2007), en diversos experimentos de laboratorio se ha encontrado que las langostas *P. argus* sanas tienden a evitar ocupar refugios que contienen langostas clínicamente infectadas con PaV1 (Behringer et al., 2006; Behringer y Butler, 2010; Anderson y Behringer, 2013; Butler et al., 2015; ver Capítulo 2 del presente trabajo de tesis). Sin embargo, en dichos experimentos las langostas tenían disponibilidad de refugios relativamente pequeños. En cambio, las casitas (refugios artificiales) experimentales escaladas para juveniles de *P. argus* son de mayor tamaño, por lo que cabe la posibilidad de que la mayor área de refugio que proveen mitigue el comportamiento de evitación de las langostas sanas cuando éstas encuentran casitas que albergan una o más langostas enfermas por PaV1, en particular si la disponibilidad de refugios alternos es baja y el riesgo de depredación es alto (Lozano-Álvarez et al., 2008).

En la Bahía de la Ascensión, donde se utilizan casitas comerciales como arte de pesca para la captura de *P. argus*, Candia-Zulbarán (2011) y Briones-Fourzán et al. (2012) encontraron que las langostas muestran un cierto nivel de evitación de la enfermedad indicado por la ocupación solitaria de casitas de un 8.9% del total de langostas enfermas registradas en comparación con el 1.1% de todas las langostas sanas, y por haberse encontrado una relación positiva entre el porcentaje de casitas ocupadas exclusivamente por langostas enfermas y la prevalencia de la enfermedad. Sin

embargo, los porcentajes de casitas co-ocupadas por langostas sanas y langostas enfermas también aumentaron, y más abruptamente, con el aumento de la prevalencia de la enfermedad, a pesar de la presencia de casitas vacías en todas las zonas de la bahía muestreadas. Cabe señalar, empero, que en Bahía de la Ascensión se utilizan casitas comerciales cuyas dimensiones son mayores que las de las casitas experimentales utilizadas en el presente estudio, ya que se utilizan principalmente para langostas de talla comercial (sub-adultos y adultos), mientras que las del presente estudio estaban escaladas para albergar principalmente juveniles de *P. argus*, que son más susceptibles al PaV1 que los sub-adultos y adultos. Por tanto, uno de los objetivos del presente capítulo es determinar si el patrón de distribución en refugios de las langostas juveniles difiere en función de la presencia/ausencia de co-específicos enfermos en dichos refugios, comparando dichos patrones entre casitas y refugios naturales. Asimismo, se examina la hipótesis del área de refugio propuesta por Lozano-Álvarez et al. (2008) analizando el uso del espacio interior de las casitas cohabitadas por langostas sanas y enfermas (juntas vs separadas) y probando el efecto del número de langostas en una casita sobre la probabilidad de encontrar a las langostas enfermas separadas de las langostas sanas.

### **Objetivo**

Estimar las proporciones de casitas y refugios pre-existentes ocupados (a) por langostas enfermas, (b) por langostas sanas y (c) por langostas sanas y langostas enfermas, y comparar los patrones de distribución de las langostas entre casitas y refugios naturales en los casos (b) y (c) para determinar si las langostas sanas tienden a evitar compartir refugios con langostas enfermas.

### **Hipótesis**

Si las langostas sanas tienden a evitar refugios ocupados por langostas enfermas,

entonces se encontrará una menor proporción de refugios co-ocupados por langostas sanas y enfermas que de refugios ocupados solo por langostas sanas o por langostas enfermas, y un promedio mayor de individuos por refugio en el caso de las langostas sanas que en el caso de langostas enfermas + sanas. En cuanto al uso del espacio interior de las casitas, se espera que las langostas enfermas estén segregadas de las sanas, a menos que la casita albergue muchas langostas.

## **Materiales y Métodos**

### **Patrón de ocupación de casitas vs refugios naturales**

En cada uno de los 10 muestreos de la primera etapa (Noviembre 2010 a Abril de 2012) del capítulo 3, se contabilizaron todos los refugios potenciales para langosta pre-existentes en cada uno de los 10 sitios experimentales (p.ej., corales duros, agregaciones de corales blandos, esponjas, agujeros, grietas, etc.), clasificándolos como pequeños (<25 cm de diámetro mayor externo, DME), medianos (25–50 cm DME) o grandes (>50 cm DME). El DME de un refugio natural se considera una buena aproximación al área de refugio que brinda (Childress y Herrnkind, 1997; Briones-Fourzán y Lozano-Álvarez, 2001a). En adelante, los refugios pre-existentes se denominarán “refugios” y las casitas “casitas”. Cada refugio y casita fue examinado para determinar si albergaba una o más langostas y estas fueron examinadas para determinar la presencia de signos clínicos de la enfermedad por PaV1 (hemolinfa lechosa, coloración rojiza del exoesqueleto) (Candia-Zulbarán et al., 2012). En adelante, se hará referencia a las langostas con signos clínicos de la infección por PaV1 como “enfermas”. En el caso de las langostas sin ningún signo clínico de la enfermedad, algunas podrían tener una infección sub-clínica (es decir, estar infectadas pero aún no desarrollar signos macroscópicos o visibles de la enfermedad, ver capítulo 5); sin embargo, para facilitar la lectura, en adelante se hará referencia a estas langostas como “sanas”. Todas las langostas fueron analizadas in situ (bajo el agua) para

evitar su exposición al aire y para reducir el estrés causado por la manipulación. Después de la toma de datos, todas las langostas fueron regresadas cuidadosamente al mismo refugio del que fueron extraídas.

### **Análisis estadísticos**

Para determinar si el patrón de distribución en refugios de las langostas juveniles difiere en función de la presencia/ausencia de langostas enfermas en los refugios, se utilizó un método basado en la distribución binomial negativa del número de langostas por refugio. Los métodos que se basan en conteos se justifican cuando los organismos ocupan áreas del hábitat discretas (tales como refugios diurnos) que representan unidades de muestreo naturales, y la distribución binomial negativa es el tipo de distribución más común en la naturaleza (Bliss y Fisher, 1959). Es importante señalar que el siguiente procedimiento se explica en función de las casitas, pero también se aplicó por separado a los refugios naturales. El total de casitas revisadas a lo largo de la primera etapa del experimento de campo se separó en dos muestras, una correspondiente a las casitas que contenían exclusivamente langostas sanas ("sanas" (= muestra 1) y otra correspondiente a las casitas (o refugios naturales) que contenían langostas sanas cohabitando con langostas enfermas ("sanas + enfermas" (= muestra 2). A cada una de estas dos muestras se le ajustó una distribución binomial negativa, que está definida por dos parámetros: la media ( $m$ , que en el presente estudio representa el número promedio de langostas por casita) y el exponente  $k$ , que representa un índice de agregación (Krebs, 1989). A medida que  $k$  tiende a 0, la distribución se hace más agregada, mientras que a medida que  $k$  tiende a infinito, la distribución se acerca al azar (distribución de Poisson) (White y Bennets, 1996).

Para una muestra dada, los valores y los intervalos de confianza de  $m$  y  $k$  pueden estimarse por medio de un procedimiento de máxima verosimilitud (*maximum likelihood*)

(Bliss y Fisher, 1959). Es importante señalar que para ambas muestras, se utilizó el mismo dato para la clase 0 (N casitas con 0 langostas, ver Resultados), mientras que para la clase 1 (N casitas con 1 langosta), en el caso de la muestra 1 se consideró el número de casitas con 1 langosta sana, y en el caso de muestra 2 se consideró el número de casitas con 1 langosta enferma. Esto se hizo para evitar influenciar el valor de los parámetros correspondientes a la muestra 2 si se asignaba un valor de 0 a la clase 1.

Utilizando el procedimiento denominado selección de modelos (*model selection*), se contrastaron cuatro modelos que representan otras tantas hipótesis referentes a los parámetros  $m$  y  $k$  de las dos muestras a comparar (White y Eberhardt, 1980; White y Bennets, 1996). Dichos modelos, y sus respectivas notaciones, son los siguientes: Modelo 1:  $\{k_v, m_v\}$ : las muestras difieren tanto en  $k$  como en  $m$ . Este es el modelo más parametrizado (“modelo general”) porque estima una  $m$  y una  $k$  para cada muestra. Modelo 2:  $\{k_v, m\}$ : las muestras difieren en  $k$ , pero tienen una  $m$  común. Modelo 3:  $\{k, m_v\}$ : las muestras tienen una  $k$  común, pero difieren en  $m$ . Modelo 4:  $\{k, m\}$ : las muestras tienen tanto una  $k$  como una  $m$  comunes. El modelo 4 es el “modelo reducido”, porque sólo estima dos parámetros. Así, si se comparan sólo dos muestras, el modelo 1 estima 4 parámetros (una  $k$  y una  $m$  para cada muestra), el modelo 2 estima 3 parámetros (una  $k$  para cada muestra y una sola  $m$  común), el modelo 3 estima 3 parámetros (una sola  $k$  común y una  $m$  para cada muestra), y el modelo 4 estima 2 parámetros (una  $k$  común y una  $m$  común). La hipótesis nula es que el modelo 4 describe los datos tan bien como el modelo 1. Si la hipótesis nula es rechazada, entonces se van comparando los otros modelos entre sí (White y Bennets, 1996).

En principio, el mejor modelo sería aquél que tuviera el menor valor de máxima verosimilitud. Sin embargo, mientras más parámetros estime un modelo, se obtiene un mejor ajuste a los datos pero a costa de una menor precisión en las estimaciones. Por tanto, para cada modelo es necesario ponderar el valor de máxima verosimilitud con el

número de parámetros estimados. Esto es lo que hace el Criterio de Información de Akaike (AIC por sus siglas en inglés).  $AIC = -2 \log(L) + 2K$ , donde L es el valor de máxima verosimilitud del modelo y K es el número de parámetros estimados por el modelo.

Para conocer si el patrón de distribución difería entre la muestra 1 (langostas “sólo sanas”) y la muestra 2 (langostas “sanas + enfermas”), se aplicó la selección de modelos utilizando el programa NegAIC incluido en el paquete para análisis estadísticos de datos ecológicos EcoMeth 6.1 (Kenney y Krebs, 2002). El programa NegAIC brinda, para cada modelo, el valor de L y de AIC. Sin embargo, el AIC debe ser corregido en función del tamaño de la muestra (Anderson y Burnham, 1999), denominándose entonces AICc, de acuerdo a la ecuación:

$$AICc = -2 \log(L) + 2K \left[ \frac{N}{N - K - 1} \right]$$

Donde N es el tamaño de la muestra. El mejor modelo sería aquél con el menor valor de AICc (es decir, el más parsimonioso). Sin embargo, la selección de modelos, más que la búsqueda del “mejor” modelo, debe ser considerada como un proceso para hacer inferencias a partir de un conjunto de modelos (Cooch y White, 2010). Además, diferentes modelos pueden tener valores de AICc muy similares, por lo cual es conveniente estimar el  $\Delta AICc$  de cada modelo ( $\Delta AICc$  es la diferencia entre el AICc de un determinado modelo y el AICc del modelo con el menor valor de AICc). Anderson y Burnham (1999) sugieren que cuando la diferencia entre dos modelos ( $\Delta AICc$ ) es  $< 2$ , entonces se puede decir con una seguridad razonable que ambos tienen un peso aproximadamente igual en los datos, mientras que si  $\Delta AICc$  es  $\geq 7$ , entonces hay una fuerte evidencia de que los modelos son realmente diferentes.

Sin embargo, para reducir la incertidumbre en la estimación de los parámetros, la mejor estrategia es llevar a cabo un promediado de modelos (*model averaging*) (Cooch y White, 2010). Para el promediado de modelos, se siguen los siguientes pasos:

1. Para cada modelo, se obtiene el peso normalizado de Akaike ( $w_i$ ):

$$w_i = \exp(-\Delta AICc/2) / \sum \{\exp(-\Delta AICc/2)\}$$

Puesto que la suma de los pesos normalizados de Akaike de todos los modelos es igual a 1, la razón entre los  $w_i$  de los diferentes modelos indica qué tanto es mejor un modelo que otro, es decir provee de un indicador del “apoyo relativo” para seleccionar un modelo sobre otro (equivalente a una razón de verosimilitud).

2. Los parámetros estimados por cada modelo se ponderan multiplicándolo por el  $w_i$  que corresponda a ese modelo. La suma de los productos resultantes de los cuatro modelos es el parámetro promediado. Lo mismo se hace con las varianzas. La raíz cuadrada de la varianza es el error estándar (SE), con el cual se estiman los límites de confianza al 95%.

### **Uso del espacio interior de las casitas cohabitadas por langostas sanas y enfermas**

El análisis del uso del espacio interior de las casitas co-ocupadas por langostas sanas y enfermas se llevó a cabo en la segunda etapa del experimento de campo, entre enero de 2013 y mayo de 2015. En este periodo, las casitas fueron revisadas aproximadamente cada 3-4 meses. En cada revisión, se registró el número de langostas dentro de cada casita, y la condición de salud (Enferma o Sana) y la talla (LC) de cada una de ellas. Adicionalmente, en aquellas casitas que estuvieron co-ocupadas por langostas sanas y enfermas también se registró si las langostas enfermas se encontraban en contacto con las langostas sanas (“juntas”) o segregadas de estas (“separadas”, es decir a una distancia de más de un cuerpo de longitud). En casitas donde había más de una langosta enferma conviviendo con sanas, se consideró como “juntas” si al menos una de las langostas enfermas estaba en contacto con una o más sanas.

Para conocer la probabilidad de encontrar langostas sanas y enfermas de manera separada dentro de una misma casita en función del número de langostas dentro de una

casita, debido a la naturaleza binaria de la variable de respuesta se llevó a cabo un análisis de regresión logística (Warton y Hui, 2011), en el que la posición de las langostas (juntas vs separadas) fue la variable de respuesta, mientras que el número de langostas por casita fue el factor categórico con 4 niveles: 2 langostas, 3–6 langostas, 7–10 langostas y más de 10 langostas.

## **Resultados**

### **Patrones de ocupación y habitación en casitas y refugios naturales**

Tanto en los sitios con casitas como en los sitios sin casitas, se observaron bajos porcentajes de ocupación por parte de las langostas en los refugios pequeños (0.6% y 3.9% respectivamente) y medianos (7.0% y 16.0% respectivamente), y en la mayoría de estos casos los refugios ocupados tenían una sola langosta. En cambio, los refugios naturales grandes (> 50 cm de DME) presentaron mayores porcentajes de ocupación (37.2% para los sitios sin casitas y 33.0% para los sitios con casitas). Por esta razón, se decidió trabajar sólo con los refugios pre-existentes grandes (en adelante “**refugios grandes**”) para ambos tratamientos.

Se agruparon los datos de los cinco sitios con casitas por un lado y de los cinco sitios sin casitas por el otro, de todos los muestreos de Noviembre de 2009 a Abril de 2012 para estimar el porcentaje de refugios grandes y de casitas ocupados por las tres categorías de langostas (sanas, enfermas, o sanas + enfermas).

### **Ocupación de casitas y de refugios grandes por langostas sanas y enfermas**

A lo largo de la primera etapa del trabajo de campo, en el conjunto de los cinco sitios con casitas se revisaron un total de 500 casitas, de las cuales 56 (11.2%) se encontraron sin langostas y 444 (88.8%) se encontraron ocupadas por una o más

langostas sanas, enfermas, o sanas + enfermas (máximo número de langostas en una casita: 107). Además, se revisaron un total de 215 refugios grandes, de los cuales 144 (67.0%) se encontraron sin langostas y 71 (33%) se encontraron ocupados por una o más langostas (máximo número de langostas en un refugio grande en los sitios con casitas: 5).

En el conjunto de los cinco sitios sin casitas se revisaron un total de 495 refugios grandes, de los cuales 311 (62.8%) se encontraron sin langostas y 184 (37.2%) se encontraron ocupados por una o más langostas (máximo número de langostas en un refugio grande en los sitios sin casitas: 8). La tabla 4.1 resume el número de casitas y refugios grandes que se encontraron vacíos u ocupados por langostas sanas, enfermas, o sanas + enfermas, tanto en los sitios con casitas como en los sitios sin casitas. Se aprecia que, en todos los casos, hubo pocos refugios grandes y casitas albergando solo langostas enfermas. Sin embargo, la mayoría de las casitas (45.4%) albergaron langostas sanas + enfermas, seguidas de las casitas con solo langostas sanas (34.8%), y solo el 11.2% de las casitas se registraron vacías (sin langostas). En cambio, la mayoría de los refugios grandes en ambos tipos de sitios (con y sin casitas) se encontraron sin langostas (67% y 62.8%, respectivamente), seguidos de refugios grandes ocupados solamente por langostas sanas (22.3% y 28.7% respectivamente), y porcentajes muy bajos co-ocupados por langostas sanas + enfermas (5.1% y 3.6%, respectivamente).

Tabla 4.1. Número de casitas y refugios grandes que se encontraron ocupados por tres categorías de langostas de acuerdo con la condición de salud, tanto en el conjunto de sitios con casitas como en el conjunto de sitios sin casitas.

Condición de salud de langostas	Sitios con casitas				Sitios sin casitas	
	Casitas	%	Refugios grandes	%	Refugios grandes	%
Sanas	172	34.8	48	22.3	142	28.7
Enfermas	45	9.0	12	5.6	24	4.8
Sanas + enfermas	227	45.4	11	5.1	18	3.6
Sin langostas	56	11.2	144	67.0	311	62.8
Total	500	100	215	100	495	100

### Distribución de langostas en casitas y en refugios grandes (sitios con casitas)

En los sitios con casitas, la distribución de las dos muestras de langostas (muestra 1: langostas sanas; muestra 2: langostas sanas + enfermas) tuvo un buen ajuste a la distribución binomial negativa, tanto en las casitas (Fig. 4.1A) como en los refugios grandes. Sin embargo, el máximo número de langostas en una casita fue de 23 para la muestra 1, y de 107 para la muestra 2, mientras que el máximo número de langostas en un refugio grande fue de 10 para la muestra 1, y de 5 para la muestra 2 (Fig. 4.1B).

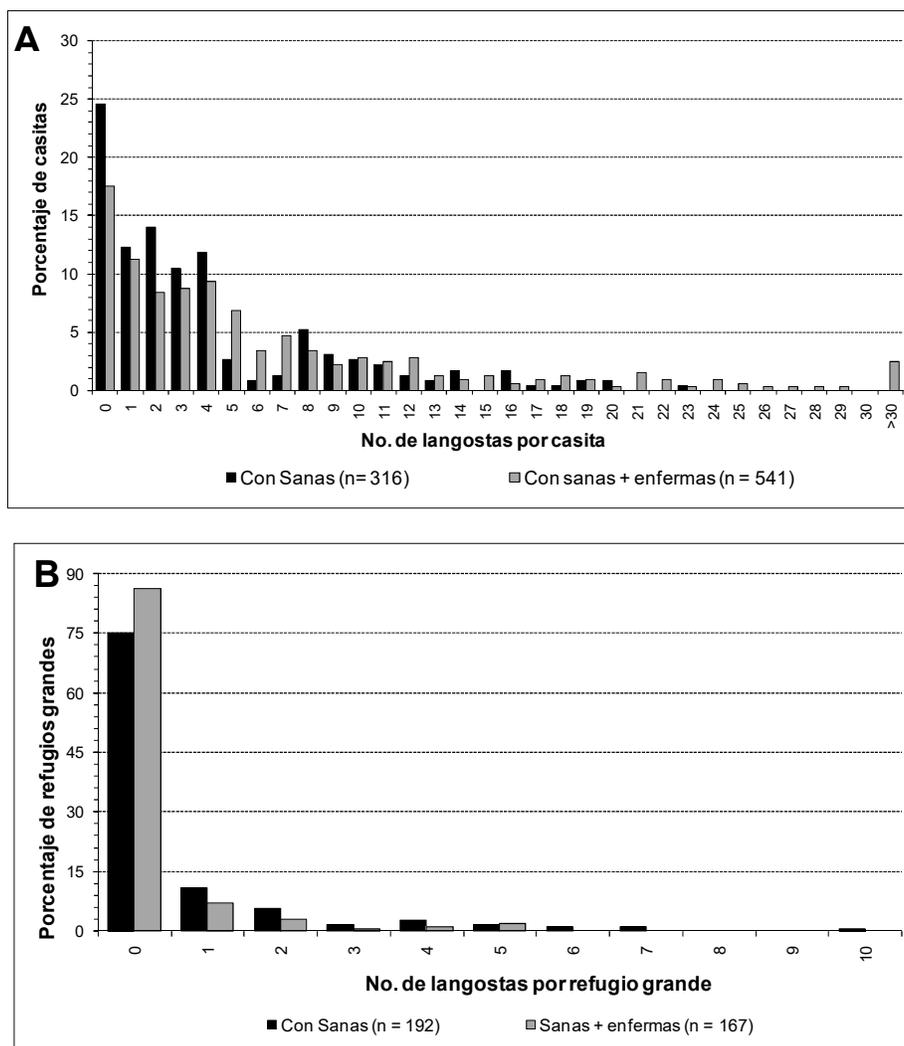


Fig. 4.1. Sitios con casitas. Distribución de langostas entre A) casitas y B) refugios grandes que contenían langostas sanas (muestra 1, columnas negras) o langostas sanas + enfermas (muestra 2, columnas grises). Para reducir la extensión de la gráfica, para cada tipo de muestra se agruparon las casitas que contenían más de 30 langostas. En la leyenda, n = número de casitas para cada muestra.

### Distribución de langostas en refugios grandes (sitios sin casitas)

En los sitios sin casitas, la distribución de las dos muestras de langostas en refugios grandes (muestra 1: langostas sanas; muestra 2: langostas sanas + enfermas) tuvo un buen ajuste a la distribución binomial negativa (Fig. 4.2). En este caso, el máximo número de langostas en un refugio grande fue de 8 para la muestra 1, y de 5 para la muestra 2.

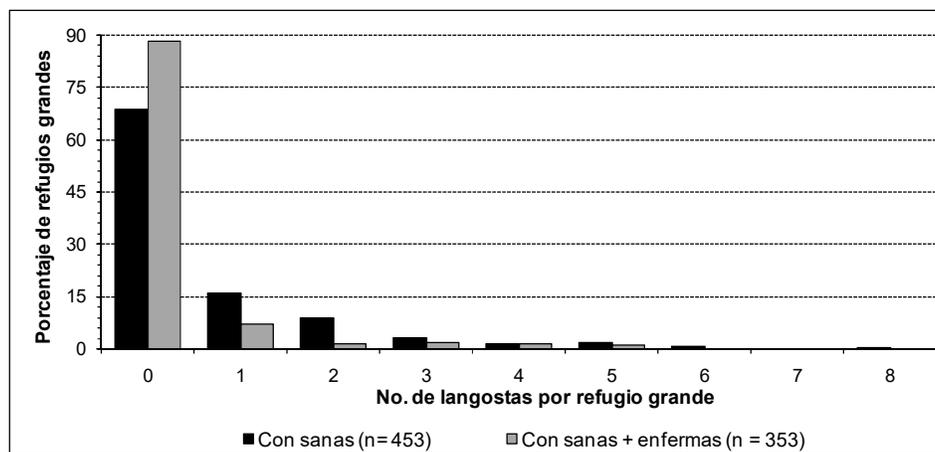


Fig. 4.2. Sitios sin casitas. Distribución de langostas entre refugios naturales grandes que contenían sólo langostas sanas (muestra 1, columnas negras) o langostas sanas + enfermas (muestra 2, columnas grises). En la leyenda, n = número de refugios grandes para cada muestra.

### Selección y promediado de modelos

La tabla 4.2 muestra los resultados de la selección de modelos para ambos tipos de sitios y de refugios (casitas y refugios grandes). En los sitios con casitas, dos modelos, el  $\{k, m_v\}$  y el  $\{k_v, m_v\}$ , tuvieron un buen ajuste a los datos de la distribución de langostas tanto en casitas como en refugios grandes, ya que sus pesos de Akaike fueron considerablemente mayores que los de los otros modelos. Ambos modelos estimaron una  $m$  diferente para cada muestra, pero el primero estimó una  $k$  común para ambas muestras, mientras que el segundo estimó una  $k$  diferente para cada una. Por tanto, se procedió al promediado de modelos. En los sitios sin casitas, en cambio, el modelo  $\{k_v,$

$m_v\}$  fue el que mejor se ajustó a los datos de la distribución de langostas en refugios grandes, con un peso de Akaike de 0.999.

Tabla 4.2. Resultados de la selección de modelos. Para cada modelo, se presenta el número de parámetros estimado, los valores de máxima verosimilitud, el criterio de Akaike corregido para el tamaño de la muestra ( $AIC_c$ ), y el peso normalizado de Akaike ( $w_i$ ).

	Modelo	No. de parámetros	Máxima verosimilitud	$AIC_c$	$\Delta AIC_c$	$w_i$
<b>Sitios <u>con</u></b>						
<b>casitas</b>						
	$\{k, m_v\}$	3	-1528.960	3063.964	0	0.65876
Casitas	$\{k_v, m_v\}$	4	-1528.603	3065.280	1.316	0.34123
	$\{k, m\}$	2	-1541.292	3086.606	22.642	0.00001
	$\{k_v, m\}$	3	-1541.233	3088.510	24.546	0
		$\{k, m_v\}$	3	-291.230	588.528	0
Ref. grandes	$\{k_v, m_v\}$	4	-290.505	589.123	0.595	0.37817
	$\{k_v, m\}$	3	-293.333	592.734	4.206	0.06218
	$\{k, m\}$	2	-294.561	593.156	4.628	0.05035
<b>Sitios <u>sin</u></b>						
<b>casitas</b>						
	$\{k_v, m_v\}$	4	-660.027	1328.104	0	0.9988
Ref. grandes	$\{k_v, m\}$	3	-668.051	1342.132	14.028	0.0009
	$\{k, m_v\}$	3	-669.150	1344.330	16.226	0.0003
	$\{k, m\}$	2	-682.953	1369.921	41.817	0.0000

Los resultados del promediado de modelos se presentan en la tabla 4.3, y de manera gráfica en la figura 4.3. Estos resultados muestran que, en los sitios con casitas, las casitas co-ocupadas por langostas sanas + enfermas tuvieron una  $m$  ( $\pm$  SE) de  $7.08 \pm 0.49$  langostas por casita, superior a las casitas ocupadas por langostas sanas ( $m = 4.07 \pm 0.34$  langostas por casita), mientras que el valor de  $k$  no difirió de manera significativa entre ambas muestras. Aun cuando la densidad media de langostas por casita difirió entre las dos muestras de langostas, los hábitos gregarios de esta especie se vieron reflejados en casitas co-ocupadas por langostas sanas +enfermas. Por otro lado, los refugios

grandes de los sitios con casitas que fueron ocupados solo por langostas sanas tuvieron una  $m$  ( $\pm$  SE) de  $0.62 \pm 0.13$  langostas por casita, mayor a los refugios grandes co-ocupados por langostas sanas + enfermas ( $m = 0.31 \pm 0.1$  langostas por casita), pero estas medias no difirieron significativamente entre las dos muestras de langostas. El valor de  $k$  tampoco difirió de manera significativa entre ambas muestras. Sin embargo, comparando los dos tipos de refugios (casitas vs. refugios grandes), tanto la  $m$  como la  $k$  fueron mayores en las casitas que en los refugios grandes ocupados tanto por langostas sanas como por langostas sanas + enfermas.

En los sitios sin casitas, los resultados del promediado de modelos muestran que los refugios grandes ocupados por langostas sanas tuvieron una  $m$  ( $\pm$  SE) de  $0.61 \pm 0.06$  langostas por refugio, superior a los co-ocupados por langostas sanas + enfermas ( $m = 0.16 \pm 0.05$  langostas por refugio) (Tabla 4.3, Fig. 4.3). De manera similar, el valor de  $k$  difirió de manera significativa entre ambas muestras, es decir, en los sitios sin casitas, los refugios grandes ocupados por langostas tuvieron un mayor valor de  $k$  ( $0.432 \pm 0.073$ ) que los co-ocupados por langostas sanas y enfermas ( $k = 0.113 \pm 0.029$ ).

Tabla 4.3. Resultados del promediado de modelos. Parámetros  $m$  y  $k$  para la distribución de langostas en casitas y refugios grandes de los sitios con casitas, y en refugios grandes de los sitios sin casitas, según la condición de las langostas: sólo sanas y sanas + enfermas (SE: error estándar; Lim C: límite de confianza al 95%).

Refugio	Langostas	Parámetro $m$				Parámetro $k$			
		$m$	SE	Lim C inferior	Lim C superior	$k$	SE	Lim C inferior	Lim C superior
<b>Sitios <u>con</u> casitas:</b>									
Casitas	Sanas	4.07	0.34	3.40	4.73	0.754	0.077	0.602	0.905
	Sanas + enfermas	7.08	0.49	6.12	8.04	0.721	0.058	0.608	0.834
Ref. grandes	Sanas	0.63	0.13	0.38	0.87	0.187	0.042	0.104	0.270
	Sanas + enfermas	0.31	0.10	0.12	0.50	0.151	0.046	0.061	0.240
<b>Sitios <u>sin</u> casitas:</b>									
Ref. grandes	Sanas	0.61	0.06	0.50	0.72	0.432	0.073	0.289	0.575
	Sanas + enfermas	0.16	0.05	0.14	0.33	0.113	0.029	0.056	0.170

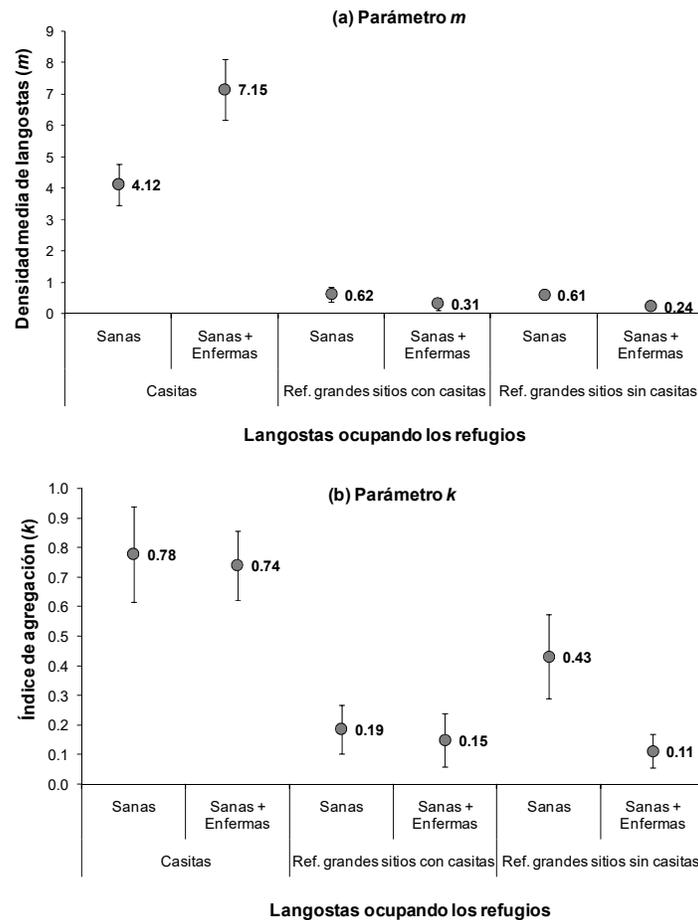


Fig. 4.3. Comparación de los parámetros  $m$  (media: número de langostas por casita) y  $k$  (índice de agregación) con sus respectivos intervalos de confianza al 95% obtenidos por promediado de modelos, para casitas y refugios grandes en los sitios con casitas, y refugios grandes en los sitios sin casitas ocupados sólo por langostas sanas y por langostas sanas con enfermas.

### Uso del espacio interior de las casitas cohabitadas por langostas sanas y enfermas

Entre enero de 2013 y mayo de 2015 se llevaron a cabo 9 revisiones en los cuales se obtuvieron 450 registros de casitas (50 casitas x 9 revisiones). Se encontraron langostas enfermas y sanas cohabitando en 181 casitas (40% del total), pero solo en 148 fue posible registrar la posición relativa de las langostas enfermas respecto de las sanas. En estas 148 casitas, el número total de langostas por casita varió de 2 a 29, pero la mayoría (49%) tuvo de 3 a 6 langostas (figura 4.4). La talla media difirió

significativamente entre las langostas enfermas (media  $\pm$  error estándar:  $25.2 \pm 0.59$ ; intervalo: 10–62 mm LC) y las langostas sanas ( $28.3 \pm 0.37$ ; intervalo: 9–76 mm LC) (prueba  $t$  de Student:  $t_{1260}=3.812, p < 0.001$ ).

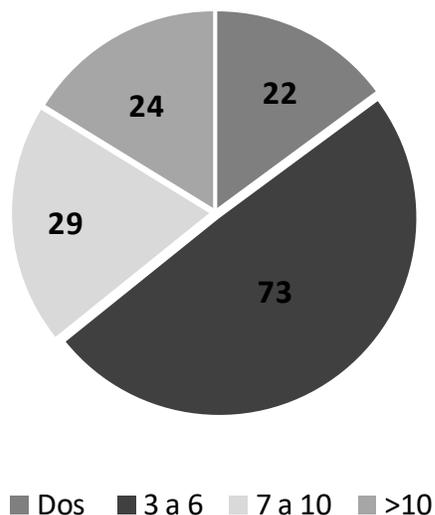


Fig. 4.4. Número de casitas co-ocupadas por langostas *Panulirus argus* sanas y enfermas de PaV1 de acuerdo al número de langostas por casita (Dos, 3 a 6, 7 a 10 y más de 10).

En 69 de las 148 casitas co-ocupadas por langostas sanas y enfermas (46.4%), las langostas enfermas estuvieron separadas, y en 79 (53.4%) estuvieron juntas con las sanas. Cuando hubo sólo 2 langostas presentes –una enferma y una sana (n= 22 casitas)–, las langostas se registraron separadas en significativamente más casitas. Sin embargo, este patrón tendió a cambiar con el incremento en el número de langostas por casita, de tal manera que en aquellas casitas ocupadas por >10 langostas (n=24 casitas), las langostas enfermas y sanas estuvieron juntas en significativamente más casitas (Fig. 4.5). Sin embargo, la posición relativa de las langostas enfermas respecto de las langostas sanas no difirió significativamente del azar en las casitas con 3–6 langostas (n=73) o con 7–10 langostas (n=29) (Fig. 4.5).

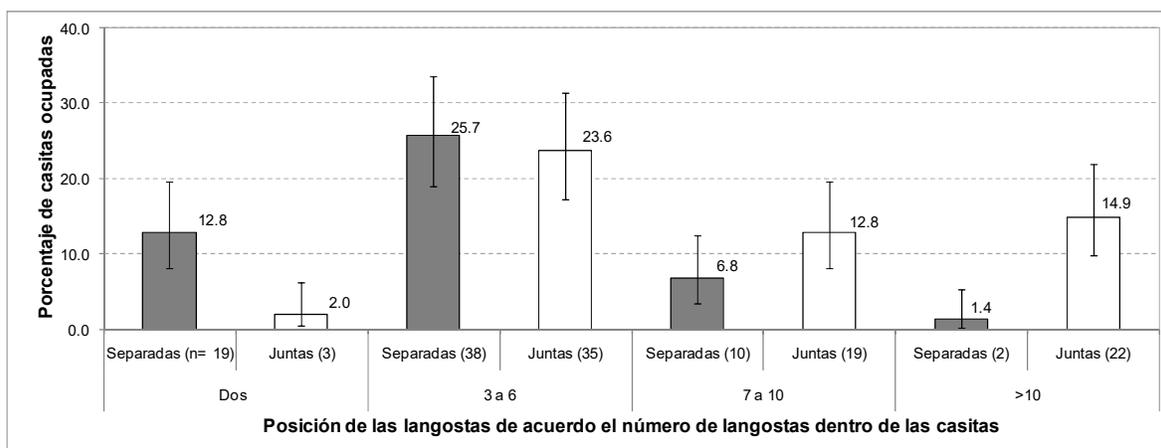


Figura 4.5. Distribución de langostas entre 148 casitas co-ocupadas por langostas sanas y enfermas en las que las langostas enfermas se encontraban separadas de ( $n = 69$  casitas) o junto a ( $n = 79$  casitas) co-específicos sanos. Separadas, barras en color gris; Juntas, barras en color blanco). Los números dentro de los paréntesis representan el tamaño de muestra (número de casitas). Las barras de error muestran el IC 95%.

La tabla 4.4 muestra el resumen del análisis de regresión logística aplicado a los sitios con casitas. La probabilidad de encontrar a las langostas sanas y enfermas separadas dentro de las casitas difirió significativamente entre las categorías del número de langostas por casita.

Tabla 4.4. Resumen del análisis de regresión logística para el efecto del número de langostas por casita ("categoría", con 4 niveles: 2 langostas, 3 a 6, 7 a 10, >10 langostas) sobre la probabilidad de encontrar langostas sanas y enfermas de PaV1 de manera separada dentro de una casita.

Efecto	gl	Estadístico	
		de Wald	<i>p</i>
Intercepto	1	0.411	0.5213
Categoría	3	22.007	<b>&lt;0.0001</b>

El análisis de regresión logística confirmó que, comparado con la posición al azar de las langostas enfermas en casitas con 7 a 10 langostas (como nivel de referencia), la probabilidad de encontrar a las langostas enfermas separadas de las sanas no difirió en

las casitas con 3 a 6 langostas (oportunidad relativa: 1.43), pero fue significativamente más alta en casitas con sólo 2 langostas (oportunidad relativa: 8.36) y significativamente más baja en casitas con >10 langostas (oportunidad relativa: 0.12) (Tabla 4.5). Es importante hacer notar que, aunque la mayoría de las 126 casitas que tenían 3 o más langostas tenían solo 1 o 2 langostas enfermas (49.2% y 32.5%, respectivamente), algunas tuvieron 3 (12.7%), 4 (1.6%), o hasta 5 (4.0%) langostas enfermas cohabitando con co-específicos sanos.

Tabla 4.5. Parámetros estimados en el análisis de regresión logística para probar el efecto del número de langostas por casita, con 4 niveles o "categorías": Dos, 3 a 6, 7 a 10, >10; nivel de referencia: 7 a 10, en la probabilidad de encontrar a las langostas enfermas separadas de (vs junto a) las sanas. El nivel de referencia fue la categoría de 7 a 10 langostas.

	Nivel del Efecto	Estimado	Error estándar	Estadístico de Wald	<i>p</i>	Oportunidad relativa (IC 95%)
Intercepto		-0.278	0.267	1.085	0.2976	
Categoría	Dos	2.124	0.514	17.074	<b>&lt;0.0001</b>	8.36 (3.05–22.90)
Categoría	>10	-2.120	0.586	13.069	<b>0.0003</b>	0.12 (0.04–0.38)
Categoría	3 a 6	0.360	0.314	1.315	0.2515	1.43 (0.77–2.65)

## Discusión

En términos generales, las casitas ocupadas por los dos tipos de muestras de langostas (langostas sanas y langostas sanas +enfermas) presentaron valores de  $m$  y  $k$  significativamente mayores que los de los refugios grandes en los dos grupos de sitios (con y sin casitas). Resulta interesante que si bien la densidad de langostas por refugio ( $m$ ) fue mayor en casitas que en refugios naturales grandes, la distribución estuvo más agregada ( $k$  se acercó más a cero) en los refugios naturales que en las casitas. En conjunto, ambos resultados reflejan la escasez de refugios estructurados para langostas en la laguna arrecifal de Puerto Morelos, como ya lo habían indicado Briones-Fourzán y

Lozano-Álvarez (2001a) y Briones-Fourzán et al. (2007). Lo interesante es cómo afecta (o no) la presencia de langostas enfermas esta distribución.

Por ejemplo, el parámetro  $m$ , es decir, el número promedio de langostas por refugio, tuvo un valor más alto en casitas co-ocupadas por langostas sanas + enfermas que en casitas ocupadas exclusivamente por langostas sanas, aunque el parámetro  $k$ , indicador de la tendencia de los individuos a agregarse o a dispersarse, no difirió entre las dos muestras de langostas ocupando casitas. Estos resultados podrían sugerir una cierta tendencia por parte de algunas langostas sanas a evitar compartir refugio con langostas enfermas, ya que resulta notoria la baja proporción de casitas ocupadas exclusivamente por langostas enfermas (45/500, donde el máximo número de langostas fue de 4 y la media fue de 1.24 langostas por casita) en comparación con las casitas co-ocupadas por langostas sanas y enfermas, donde el máximo número de langostas fue de 107 (cabe señalar que eran 104 langostas sanas cohabitando con 3 enfermas). Sin embargo, las casitas ocupadas por langostas sanas + enfermas tuvieron un promedio de langostas por casita mayor que las casitas ocupadas solamente por langostas sanas, sugiriendo que las casitas permiten la cohabitación de langostas y enfermas. En general, se encontró un mayor nivel de cohabitación entre langostas sanas + enfermas en casitas que en refugios naturales grandes. Sin embargo, entre los refugios grandes, la densidad de langostas sanas + enfermas fue menor que en los ocupados sólo por sanas.

En el medio acuático, uno de los conflictos ecológicos que está recibiendo atención es el de las interacciones entre la evitación de parásitos y de depredadores, ya que los cambios en el comportamiento del hospedero en respuesta a los parásitos, tales como aumentos en su actividad o cambios en el hábitat, podrían hacerlos más susceptibles a la depredación o viceversa (McKean y Lazzaro, 2011; Behringer et al., 2018). En un trabajo reciente, Lozano-Álvarez et al. (2018) evaluaron de manera experimental el *trade-off* entre el riesgo de depredación y el riesgo de contagio de PaV1

propuesto por Lozano-Álvarez et al. (2008), que se basa en la elección de refugio por parte de langostas de *P. argus* en presencia de co-específicos enfermos de PaV1 y, modulada por la disponibilidad de refugio alternativo y el riesgo de depredación potencial (por parte de peces balístidos). Lozano-Álvarez et al. (2018) encontraron que en presencia del depredador y con uno de los dos refugios disponibles ocupado por una langosta enferma, las langostas focales se agregaron en el refugio vacío alternativo, pero cuando los dos refugios disponibles estuvieron ocupados por langostas enfermas, algunas langostas focales permanecieron en el área abierta del estanque pero otras compartieron el refugio ocupado por langostas enfermas indicando que, en ausencia de refugios alternativos, las langostas pueden cohabitar con langostas enfermas incluso en ausencia del depredador.

Sin embargo, no todos los individuos evitan a los co-específicos enfermos. Por ejemplo, los machos de pinzón *Carpodacus mexicanus* prefieren alimentarse cerca de otros machos enfermos con *Mycoplasma gallisepticum*, debido a que estos últimos son menos agresivos a causa de la enfermedad. Este proceso actúa como una trampa evolutiva al mimetizar al patógeno con el comportamiento de los pájaros infectados (Bowman y Howley, 2010). El 1% de los machos de peces mosquito *Gambusia holbrooki* presentan un melanismo heredable, presentando un patrón de manchas que se asemeja al que presentan los machos infectados por tremátodos, haciendo que los machos sanos con melanismo sean también evitados por las hembras en los intentos de apareamiento, comprometiendo así su efectividad sexual (Horth et al., 2013). En el sentido de la evitación de la depredación, los humanos que son vulnerables a enfermedades infecciosas suelen calificar a los depredadores como más peligrosos, lo que sugiere que el sistema de evitación de enfermedades activa el comportamiento que reduce el contacto con individuos peligrosos (Prokop y Fančovičová, 2013).

Las langostas sanas y enfermas que fueron encontradas cohabitando en un 40% de las casitas muestreadas representan un nivel similar al encontrado por Briones-Fourzán et al. (2012) en casitas comerciales distribuidas en una zona dentro de la Bahía de la Ascensión con características similares a las de la laguna arrecifal de Puerto Morelos (38%). Aunque las casitas que se utilizaron en el presente estudio fueron más pequeñas que las comerciales, de todos modos el área de refugio que proveen ( $1.2 \text{ m}^2$ ) permite una mayor agregación de langostas que los refugios naturales distribuidos en la laguna arrecifal.

Con respecto al uso del espacio interior de las casitas, los resultados de la posición relativa de las langostas enfermas respecto de las langostas sanas proporcionan solamente una imagen instantánea del uso potencial del espacio de la casita, puesto que las langostas no permanecen estáticas dentro de una casita. Sin embargo, resulta interesante que la probabilidad de encontrar langostas enfermas separadas de las langostas sanas disminuyó al aumentar el número de langostas por casita. En casitas co-ocupadas por sólo una langosta sana y una langosta enferma, es posible que la langosta sana trate de mantener cierta distancia de la enferma, pero esto puede ser más difícil de conseguir a medida que se congregan más langostas dentro de la casita, especialmente cuando hay más de una langosta enferma. Debido a que las langostas enfermas conservan su comportamiento gregario (Behringer y Butler, 2010), pueden intentar agregarse con co-específicos sanos, resultando en una probabilidad similar de encontrarse separadas o juntas en el momento de muestrear las casitas con más de 10 langostas, pero al aumentar aún más el número de langostas en una casita, la probabilidad de encontrar langostas enfermas separadas disminuye drásticamente. Por lo tanto, la amplitud del área de refugio de las casitas permite hasta cierto punto la segregación de langostas sanas y enfermas, lo cual dependerá tanto del número de

langostas que se encuentren cohabitando una casita dada en un tiempo dado, como del comportamiento gregario expresado por las langostas enfermas.

En un experimento de campo, Butler et al. (2015) introdujeron langostas *P. argus* enfermas de PaV1 en refugios con agregaciones naturales de co-específicos, observando que más langostas abandonaron el refugio en comparación con aquellas a las que se les agregó un co-específico sano, aun cuando no había un refugio alternativo y mostrando claramente un comportamiento evasivo hacia los co-específicos enfermos como parte de una inmunidad conductual. Sin embargo, a diferencia del trabajo realizado por Lozano-Álvarez et al. (2018), estas langostas no se encontraban en un riesgo inminente de depredación que hiciera presión sobre la decisión de quedarse o abandonar el refugio.

Los ambientes naturales ofrecen múltiples desafíos, muchas veces de manera simultánea, y los individuos deben ser capaces de lidiar de manera apropiada con cada fuente de estrés. Es decir, los individuos exhiben diferencias consistentes en la respuesta a un desafío ambiental que se expresan en una variedad de contextos y situaciones. Tales conjuntos de comportamiento se denominan “síndromes conductuales” o “personalidad de los animales” y cada individuo dentro de una especie se puede describir con un síndrome o personalidad en particular (revisión en Frost et al., 2013). Una de esas personalidades es la audacia o atrevimiento, que define la respuesta de un individuo a algo nuevo y su propensión a asumir riesgos. Los animales atrevidos son a menudo más agresivos, más activos y más propensos a explorar nuevos entornos u objetos que los co-específicos que no lo son (Frost et al., 2013).

En términos generales, la aversión o desagrado (*disgust*) tiene una importante función adaptativa que puede reducir el riesgo de enfermarse; sin embargo, el grado de sensibilidad de la aversión puede variar ampliamente entre los individuos de una misma especie. Tybur et al. (2018) sugieren que esta variación depende de los requerimientos o estrategias sexuales, nutricionales y sociales de cada individuo. La evolución de las

estrategias de evitación y eliminación de patógenos y parásitos implica que dichas estrategias evolucionaron al haber beneficios de supervivencia y buen estado físico (Hart y Hart, 2018). Los depredadores y los patógenos son poderosas herramientas de selección natural que influyen en la evolución de los sistemas de autoprotección y prevención de enfermedades (McKean y Lazzaro, 2011). Ambos sistemas son activados por condiciones ecológicas y protegen a los individuos contra el daño físico o la transmisión de enfermedades (Prokop y Fančovičová, 2013).

El parasitismo tiene mucho en común con la depredación, y los desarrollos conceptuales y técnicos en la investigación sobre el comportamiento anti-depredador podrían en el futuro generar ideas sobre las respuestas antiparasitarias de los hospederos silvestres (Coulson et al., 2018). Aún hay mucho por aprender sobre la epidemiología de los parásitos en otras especies, así como las compensaciones (*trade-offs*) que hacen los hospederos como defensa contra patógenos y parásitos frente a otras inversiones beneficiosas como el apareamiento y la búsqueda de alimento (McKean y Lazzaro, 2011; Sarabian et al., 2018).

## **Capítulo 5. Confirmación de las medidas de validez de la evaluación visual de signos clínicos de la infección por PaV1 en juveniles de langosta *Panulirus argus* en la laguna arrecifal de Puerto Morelos**

### **Introducción**

El diagnóstico de las enfermedades infecciosas se realiza mediante la detección directa o indirecta de los agentes infecciosos. Mediante los métodos directos, se detectan los agentes y/o sus componentes, tales como los ácidos nucleicos, las proteínas estructurales y no estructurales, las enzimas, etc. Mediante los métodos indirectos, se detectan los anticuerpos inducidos por las infecciones (OIE, 2006).

Las pruebas diagnósticas permiten clasificar a los individuos en diferentes categorías en relación con la presencia o ausencia de una enfermedad (Pita-Fernández y Pértegas-Díaz, 2003). El resultado de la prueba puede ser correcto (verdadero positivo y verdadero negativo) o incorrecto (falso positivo y falso negativo). El análisis de su validez (capacidad de probar lo que pretende medir) puede obtenerse calculando los valores de sensibilidad y especificidad (Altman y Bland, 1994a). Las medidas de validez garantizan que los resultados no estén sesgados y por tanto permitan una adecuada estimación de la utilidad potencial de dicha prueba (Gómez de la Cámara, 1998; Bellmunt-Montoya, 2007). Una prueba diagnóstica tendrá mayor validez en la medida en que sea capaz de detectar muchos casos con la alteración buscada (sensibilidad alta), excluya a muchos casos sin la alteración (especificidad alta), el resultado positivo represente una alta probabilidad de presentar la alteración (valor predictivo positivo alto) y el resultado negativo refleje una alta probabilidad de la ausencia de la alteración (valor predictivo negativo) (Altman y Bland, 1994b; Pita-Fernández y Pértegas-Díaz, 2003).

Cuando se estudia una muestra de individuos, los datos obtenidos permiten clasificar a los sujetos en cuatro grupos en una tabla 2 x 2 como la que se muestra en la tabla 5.1. En ella se compara, en las filas el resultado de la prueba diagnóstica y en las columnas el resultado de la prueba de referencia o estándar de oro (*gold standard*).

Tabla 5.1. Relación entre el resultado de una prueba diagnóstica y la presencia o ausencia de una enfermedad (modificado de: Pita-Fernández y Pértegas-Díaz, 2003).

		Prueba de referencia	
		Negativo	Positivo
Prueba diagnóstica:	Sano	Verdadero negativo (VN)	Falso positivo (FP)
	Enfermo	Falso Negativo (FN)	Verdadero Positivo (VP)

En donde:

Verdadero Negativo (VN): son aquellos individuos que no presentaron los signos clínicos de la enfermedad y que dieron negativo a la prueba de referencia.

Falso Positivo (FP): son aquellos individuos que no presentaron los signos clínicos de la enfermedad y que dieron positivo a la prueba de referencia.

Falso Negativo (FN): son aquellos individuos que presentaron los signos clínicos de la enfermedad y que dieron negativo a la prueba de referencia, y

Verdadero Positivo (VP): son aquellos individuos que presentaron los signos clínicos de la enfermedad y que dieron positivo a la prueba de referencia.

Durante algunos años a partir de la emergencia de la enfermedad causada por el virus PaV1 en langostas *Panulirus argus*, la forma de detectar la infección en organismos vivos se basó en la observación de los signos clínicos y su confirmación a partir del

sacrificio de los individuos para acceder a los diferentes órganos afectados para su análisis histológico (Shields y Behringer, 2004). Sin embargo, dada la importancia de monitorear al virus en las poblaciones silvestres y el estudio de su comportamiento en el laboratorio, se requirió del desarrollo de herramientas de diagnóstico fiables, como la hibridación *in situ* por fluorescencia (FISH por sus siglas en inglés) (Li et al., 2006) y la optimización de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) (Montgomery-Fullerton et al., 2007), cuya importancia radica en que para su empleo no es necesario sacrificar a los organismos ya que es posible hacer la detección del virus a partir de una muestra de hemolinfa.

Para ampliar su utilidad en los diagnósticos veterinarios y en las identificaciones de patógenos, la PCR se ha modificado ampliamente en los últimos años. En la PCR se utiliza un par de cebadores de oligonucleótidos específicos para amplificar una pequeña parte del genoma del agente infeccioso. La sensibilidad analítica de la PCR, definida como la cantidad más pequeña de copias de genomas de agentes infecciosos que pueden ser detectados, es relativamente alta, con un mínimo de entre 100 y 1000 copias del genoma detectable. La especificidad analítica, es decir, la capacidad para distinguir entre el agente objetivo y otros agentes infecciosos estrechamente relacionados también es bastante alta.

En el caso de PaV1, los muestreos basados en la observación clínica de la enfermedad subestiman la prevalencia de la infección debido a la presencia de infecciones sub-clínicas, o fases tempranas de la infección que aún no se manifiestan en signos macroscópicos. Para determinar en qué medida puede ser subestimada la prevalencia real sobre la base de la prevalencia clínica, se puede comparar la sensibilidad y la especificidad de la prevalencia determinada por la observación de signos clínicos con la prevalencia de la infección determinada por PCR (Lalkhen y McCluskey, 2008; Huchin-Mian et al., 2013). Por ejemplo, en la población de langostas de la Bahía de la Ascensión,

la cual está compuesta principalmente por adultos, sub-adultos y juveniles grandes, Huchin-Mian et al. (2013) estimaron la sensibilidad de la observación de los signos clínicos de PaV1 comparándola con la prevalencia determinada por PCR. Dichos autores encontraron que la sensibilidad de los signos clínicos era de 0.5 (sensibilidad = número de langostas con signos clínicos divididos entre el número total de langostas positivas a PCR) y la especificidad de 1.0 (especificidad = número de langostas sin signos clínicos dividido entre el número total de langostas negativas a PCR). Es decir, por cada langosta visiblemente enferma había otra con infección sub-clínica, pero los signos visibles de la infección (hemolinfa lechosa y coloración rojiza del exoesqueleto) fueron específicos para la infección por PaV1.

Sin embargo, la sensibilidad y especificidad de una prueba pueden variar entre diferentes poblaciones debido a diversos factores, tales como la etapa de la enfermedad o la presencia de otros microorganismos (Cameron, 2002). Por tanto, la validación de una prueba requiere re-evaluar sus características de desempeño para cada población de animales en que se aplica (Jacobson, 1998). En el presente trabajo, se hace una evaluación de la sensibilidad y especificidad de los signos clínicos en comparación con la detección con PCR en la población de langostas que habitan casitas en la laguna arrecifal de Puerto Morelos, compuesta principalmente por juveniles tempranos y tardíos de *P. argus*.

### **Objetivos**

- 1) Evaluar la sensibilidad y especificidad de los signos clínicos de PaV1 como indicadores de infección en estudios epidemiológicos en poblaciones de langostas *Panulirus argus* compuestas principalmente por juveniles (hábitats de crecimiento)

- 2) Estimar la prevalencia real de la infección (clínica + sub-clínica) con el virus PaV1 en la población de langostas juveniles que habitan casitas en la laguna arrecifal de Puerto Morelos

## **Materiales y métodos**

### **Captura de langostas y obtención de las muestras**

Las langostas se capturaron mediante buceo libre y SCUBA directamente en casitas experimentales ubicadas en la laguna arrecifal de Puerto Morelos. Se extrajeron todas las langostas de cada casita con ayuda de redes manuales (“jamos”) y se colocaron dentro de una bolsa de malla por cada casita. La bolsa se sujetó a la borda de la embarcación de tal forma que las langostas permanecían dentro del agua mientras se iban extrayendo y analizando una por una, con el objeto de afectar lo menos posible a las demás (Lozano-Álvarez et al., 1991b). Cada langosta se examinó cuidadosamente, considerándose como “enfermas” aquellas que mostraban signos clínicos evidentes de la enfermedad, en particular hemolinfa lechosa y coloración rojiza del exoesqueleto y en algunos casos letargo, y como “sanas” aquellas que no mostraron ningún signo de la enfermedad (Montgomery-Fullerton et al., 2007). A cada langosta se le midió la longitud cefalotorácica (LC) con un vernier ( $\pm 0.1$  mm) y se le determinó el sexo.

Para la detección del ADN del virus PaV1 por medio de PCR, a cada langosta se le extrajo una muestra de  $\sim 200$   $\mu\text{L}$  de hemolinfa con una aguja de insulina. La zona de punción fue en la base del quinto par de pereiópodos, previamente desinfectada con alcohol al 70%. Las metodologías de extracción de ADN y los ensayos de PCR para la diagnosis de la infección por PaV1 ya fueron explicados en el capítulo 2 y el protocolo se presenta en el Apéndice 1.

## **Análisis de datos**

### **Sensibilidad y especificidad de la observación clínica de la enfermedad PaV1**

La sensibilidad de una prueba clínica se refiere a la habilidad de dicha prueba para identificar correctamente a los individuos infectados, calculándose de la siguiente manera:

$$Sensibilidad = \frac{Verdaderos\ Positivos}{Verdaderos\ Positivos + Falsos\ Negativos}$$

De esta manera, una prueba con una sensibilidad de 1 identifica correctamente al 100% del total de individuos con la infección, mientras que una prueba con una sensibilidad de 0.8 detecta correctamente al 80% de los individuos infectados (verdaderos positivos), pero no detecta al 20% de los individuos infectados (falsos negativos).

Por otro lado, la especificidad de una prueba clínica se refiere a la habilidad de dicha prueba de identificar correctamente a los individuos no infectados, calculándose de la siguiente manera:

$$Especificidad = \frac{Verdaderos\ Negativos}{Verdaderos\ Negativos + Falsos\ Positivos}$$

Así, una prueba con una especificidad de 1 identifica correctamente al 100% de todos los individuos que no están infectados, mientras que una prueba con una especificidad de 0.8 detecta correctamente al 80% de los individuos no infectados (verdaderos negativos), pero el 20% de individuos no infectados son erróneamente detectados como infectados (falsos positivos).

Para evaluar la utilidad de los signos clínicos observados al determinar la prevalencia de la infección con PaV1 en relación con la PCR, se consideró como

Sensibilidad al número de langostas con signos clínicos dividido entre el número de langostas positivas a PaV1 por PCR y como Especificidad como al número de langostas sin signos clínicos dividido entre el número total de langostas negativas a PaV1 por PCR (Huchin-Mian et al., 2013). Dado que la sensibilidad y la especificidad son proporciones, se pueden calcular los intervalos de confianza al 95% mediante métodos estándares para proporciones (Gardner y Altman, 1989; Newcombe, 1998; Bellmunt-Montoya, 2007).

Tanto la sensibilidad como la especificidad proporcionan información acerca de la probabilidad de obtener un resultado concreto positivo o negativo en función de la verdadera condición del organismo enfermo con respecto a la enfermedad (Altman y Bland, 1994a). Sin embargo, se carece de información previa acerca de su verdadero diagnóstico; es decir, ante un resultado positivo o negativo en la prueba, lo que se quiere conocer es qué tan probable es que el individuo esté realmente enfermo o sano (Pita-Fernández y Pértegas-Díaz, 2003). La sensibilidad y la especificidad no proporcionan esta información, por lo que los datos deben ser aproximados a los resultados de la prueba utilizando los valores predictivos de la prueba (Altman y Bland, 1994b).

### **Valores predictivos de la prueba**

El Valor Predictivo Positivo (VPP) es la probabilidad de padecer la enfermedad si se obtiene un resultado positivo en la prueba. Se calcula de la siguiente manera:

$$\text{Valor predictivo positivo (VPP)} = \frac{\text{Verdaderos Positivos}}{\text{Verdaderos Positivos} + \text{Falsos Positivos}}$$

El valor Predictivo Negativo (VPN) es la probabilidad de que un individuo que arroje un resultado negativo en la prueba esté realmente sano. Se calcula de la siguiente manera:

$$\text{Valor Predictivo Negativo (VPN)} = \frac{\text{Verdaderos Negativos}}{\text{Falsos Negativos} + \text{Verdaderos Negativos}}$$

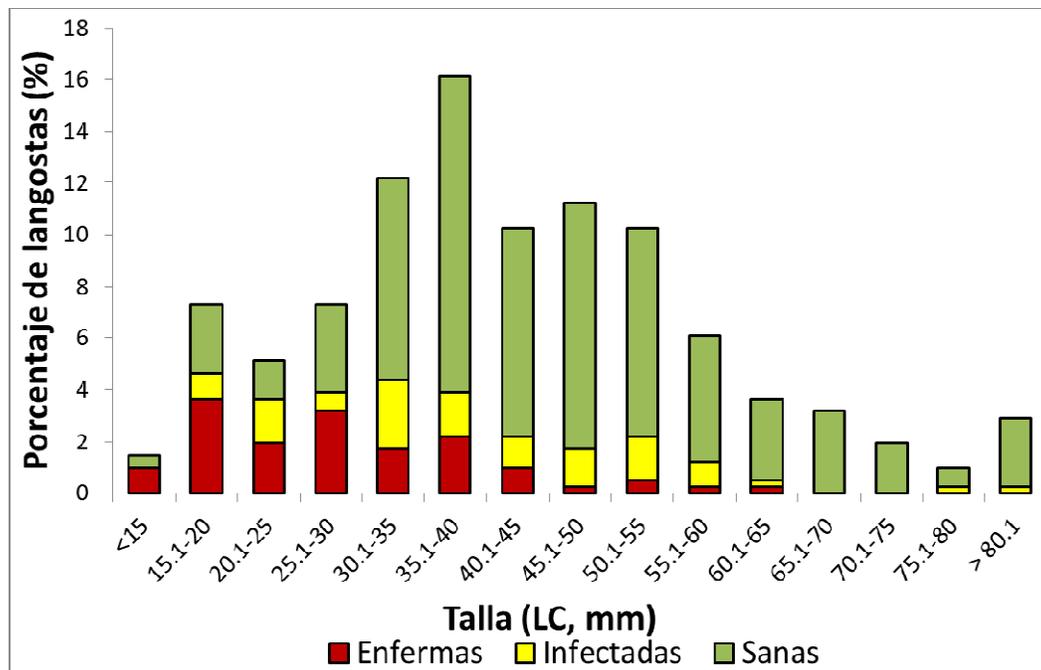
Los valores predictivos dependen estrechamente de la prevalencia de la enfermedad en la población en la que se aplica la prueba diagnóstica. Al aumentar la prevalencia crece el valor predictivo positivo para una misma sensibilidad y especificidad; esto se debe a que disminuye el número de falsos positivos. De la misma manera, al disminuir la prevalencia disminuye el valor predictivo positivo y aumenta el valor predictivo negativo porque para una misma sensibilidad y especificidad disminuyen los falsos negativos (Gómez de la Cámara, 1998).

## **Resultados**

Entre febrero de 2014 y febrero de 2015 se examinaron un total de 466 langostas *P. argus* que habitaban casitas experimentales en la laguna arrecifal de Puerto Morelos. El intervalo de tallas de esta muestra fue amplio (10.7–95.6 mm LC), pero con predominancia de juveniles (Fig. 5.1). De las 466 langostas examinadas, a 452 se les extrajo una muestra de hemolinfa para realizar un diagnóstico de la infección con PaV1 mediante dos pruebas diagnósticas, es decir, por la presencia de signos clínicos (hemolinfa lechosa) y por la prueba de referencia PCR. La clasificación de los individuos según el resultado del diagnóstico se muestra en la tabla 5.2.

De las 452 langostas examinadas, 65 mostraron signos clínicos de la infección por PaV1, arrojando una prevalencia de la enfermedad (infección clínica) de 14.4%. Sin embargo, 136 langostas dieron positivo a PaV1 por PCR, lo que da una prevalencia de la infección de 30.1%. Con base en estos resultados, la sensibilidad de la observación clínica de la enfermedad fue de  $65/136 = 0.48$  (IC al 95%: 0.39–0.56). Esto indica que la

diagnosis basada en la observación de los signos clínicos detecta alrededor del 48% de los casos de infección por PaV1, es decir, que por cada langosta visiblemente enferma de la población evaluada, hay por lo menos una más que también está infectada pero que no es detectada visualmente porque no presenta los signos clínicos de la enfermedad.



**Fig. 5.1.** Distribución de tallas (en mm de longitud cefalotorácica) de langostas *Panulirus argus* que habitaban casitas experimentales en la laguna arrecifal de Puerto Morelos (N = 466). La porción de las columnas en color rojo representa la fracción correspondiente a las langostas visiblemente enfermas de PaV1; la porción en amarillo representa a la fracción correspondiente a las langostas sub-clínicamente infectadas con PaV1 y la porción en verde representa la fracción correspondiente a las langostas sanas.

Por otro lado, no se observaron los signos clínicos de la enfermedad en ninguna de las 316 langostas examinadas que dieron negativo a PaV1 por PCR, lo que indica que la especificidad de la observación clínica de la enfermedad fue de  $316/316 = 1.0$  (IC al 95%: 0.98–1.0), es decir, que la hemolinfa lechosa y la coloración rojiza del exoesqueleto son signos clínicos específicos de la infección clínica por PaV1 en la población de langostas *P. argus* de la laguna arrecifal de Puerto Morelos.

Los valores predictivos positivo y negativo fueron 1.0 y 0.81 respectivamente. Es decir, se tiene un 100% de probabilidad de que una langosta esté infectada cuando muestra los signos clínicos de la infección. Por otro lado, se tiene una probabilidad del 81% de que una langosta esté completamente sana (libre de infección) cuando no muestra los signos clínicos de la infección.

Tabla 5.2. Resultados de la observación clínica y el análisis por PCR de langostas *Panulirus argus* para la detección de la infección por PaV1, donde VN son los Verdaderos Negativos, FN los Falsos Negativos, FP los Falsos Positivos y VP los Verdaderos Positivos.

		<b>Prueba de referencia: PCR</b>	
		Negativo	Positivo
<b>Prueba diagnóstica:</b> <b>Signos clínicos de PaV1</b>	Sin signos	<b>VN</b> 316	<b>FN</b> 71
	Con signos	<b>FP</b> 0	<b>VP</b> 65

### **Discusión**

Los valores de sensibilidad y especificidad diagnóstica constituyen los parámetros más importantes que se establecen durante la validación de una prueba. Estas estimaciones son la base del cálculo de otros parámetros a partir de los cuales se realizan inferencias sobre los resultados de la prueba (por ejemplo, los valores predictivos de los resultados positivos y negativos de la prueba). Por consiguiente, es muy importante que las estimaciones sobre la sensibilidad y la especificidad diagnósticas sean tan precisas como sea posible. Lo ideal es que deriven del análisis de un conjunto de muestras procedentes de animales de referencia, cuyos antecedentes y estado en cuanto a la

enfermedad/infección en cuestión se conozcan y sean relevantes para la población en la que se va a utilizar la prueba (OIE, 2017).

Los resultados del presente estudio confirman los valores de sensibilidad y especificidad de la evaluación visual de los signos clínicos de infección por PaV1 previamente estimados por Huchin-Mian et al. (2013) en la población de *Panulirus argus* de Bahía de la Ascensión. El valor de la sensibilidad fue muy similar entre el presente estudio, realizado en la laguna arrecifal de Puerto Morelos (0.48), y el estudio de Huchin-Mian et al. (2013), realizado en Bahía de la Ascensión (0.51), a pesar de las amplias diferencias entre las respectivas áreas de estudio en cuanto al tamaño de muestra (452 y 1397, respectivamente), rango de tallas de las langostas (10.7–95.6 mm LC y 12.8–168.0 mm LC, respectivamente), y prevalencia clínica promedio (14.4% y 5.4%, respectivamente).

Al realizar la prueba de PCR en langostas que presentaban signos diagnósticos de la enfermedad PaV1, no se obtuvieron resultados falsos positivos, lo cual concuerda con los resultados de Huchin-Mian et al. (2013) de que los signos clínicos tienen una especificidad del 100%. Estos resultados contrastan con los obtenidos en otros organismos. Por ejemplo, en algunos peces, la sintomatología y lesiones de muchas enfermedades infecciosas carecen de la especificidad suficiente como para establecer un diagnóstico definitivo del posible agente etiológico. Esto hace que sea necesaria la identificación mediante análisis de laboratorio. Cualquier sistema de diagnóstico clínico debe permitir la identificación fiable y específica del agente causal, en el menor tiempo posible, para poder utilizarse de manera rutinaria. La técnica de PCR cumple estos requisitos, y por ello en estos momentos existen diversas técnicas de PCR descritas para la totalidad de los agentes infecciosos o parasitarios de mayor significado clínico en acuicultura (Gibello et al., 2001). Por ejemplo, a partir de ensayos de PCR, Gómez et al. (2004) reportaron que grandes poblaciones de peces marinos tanto de cultivo como

silvestres en áreas adyacentes a granjas de cultivo, estaban infectados de forma sub-clínica con betanodavirus genéticamente muy relacionados, lo que sugiere una importancia de tales peces infectados como portadores o como reservorio de betanodavirus.

Cabe mencionar que, en el presente estudio, el único individuo adulto sin signos de la enfermedad que dio positivo a PaV1 por PCR, es decir, sub-clínicamente infectado, fue una hembra ovígera de 95.6 mm LC, cuyos huevos también analizados por PCR, resultaron libres de infección. Este resultado sugiere que el PaV1 no se transmite de manera vertical, lo que sería consistente con los resultados de Lozano-Álvarez et al. (2015), quienes analizaron 169 larvas filosomas y 239 puerulos nectónicos de *Panulirus argus* colectados en aguas oceánicas del Caribe Mexicano. Todas las filosomas dieron negativo a PaV1 por PCR, pero 2 de las 239 postlarvas dieron positivo a PaV1 por PCR, lo que sugiere una transmisión de PaV1 mediante el agua, aunque estos autores también sugirieron que los tapetes de sargazo flotante, muy abundante en su zona de muestreo, podrían ser un reservorio ambiental de PaV1 (Lozano-Álvarez et al., 2015).

Es importante resaltar que no se detectaron falsos positivos en los ensayos de PCR ni en el presente estudio ni el de Huchin-Mian et al. (2013), lo que resultó en una especificidad diagnóstica de 100% para PaV1 de los signos clínicos representados por la hemolinfa lechosa. En otros decápodos, varios patógenos pueden causar que la hemolinfa se vuelva lechosa, por ejemplo bacterias parecidas a rickettsias en *Panulirus homarus* y *P. ornatus* crecidas en cercos marinos en Vietnam (Nunan et al. 2010), el virus RV-CM en *Carcinus maenas*, el virus CoBV en *Chionoecetes opilio*, y el virus Bi-facies en *Callinectes sapidus* (revisión en Bateman y Stentiford, 2017), así como el dinoflagelado *Hematodinium* spp. En *Nephrops norvegicus* y numerosas especies de cangrejos anomuros y braquiuros (revisión en Morado, 2011). Sin embargo, no se ha reportado que alguno de estos patógenos afecte a *P. argus*.

Además del PCR de punto final (Montgomery-Fullerton et al., 2007), otros métodos existentes para detectar PaV1 incluyen análisis histológicos (Shields y Behringer, 2004), hibridación fluorescente *in situ* (FISH, por sus siglas en inglés) (Li et al., 2006) y PCR cuantitativo o de tiempo real (qPCR, Clark et al., 2018). Los análisis histológicos pueden detectar infecciones activas en individuos pero requieren sacrificar a las langostas. Los otros métodos son valiosos para diagnosticar individuos con infección sub-clínica (es decir, sin signos visibles), pero el PCR es menos caro que el qPCR y puede detectar el ADN de patógenos mucho más rápido que el FISH (Pestal et al., 2003). El ensayo con qPCR, que aún no se había desarrollado cuando se hicieron los muestreos para este trabajo, podría convertirse en el nuevo estándar de oro, ya que su límite de detección es de 10 copias de DNA del plásmido (Clark et al., 2018), comparado con ~37 copias de ADN con el ensayo de PCR de punto final ( $= 0.02 \text{ fg DNA PaV1 } \mu\text{l}^{-1}$ , Moss et al., 2012). Sin embargo, la utilización de qPCR probablemente no habría mejorado mucho la estimación de sensibilidad de la evaluación visual de signos clínicos obtenida en el presente trabajo, porque cuando la prueba que se usa como estándar de oro (como el PCR de tiempo final usado aquí) es mucho mejor que la prueba que está siendo evaluada (es decir, la evaluación visual), entonces hay poca diferencia entre la sensibilidad y especificidad relativas y la sensibilidad y especificidad verdaderas (Cameron, 2002). Aunque el PCR no puede determinar si los individuos que dan positivo a la prueba desarrollarán la enfermedad o son solamente portadores (Montgomery-Fullerton et al., 2007; Cáceres-Martínez y Vázquez-Yeomans, 2013), resulta útil para evaluar qué tan ampliamente está distribuido un patógeno en particular en poblaciones de hospederos asintomáticos (Peinado-Guevara y López-Meyer, 2006).

Un primer paso importante para el manejo de una enfermedad es desarrollar un conocimiento básico sobre las enfermedades y los estados de salud comprometidos que están presentes en un área determinada (Cameron, 2002). El manejo de las emergencias

de enfermedades (es decir, cuando las enfermedades causan impactos ecológicos, económicos o sociales significativos) requiere de un buen monitoreo, que a su vez requiere de diagnósticos rápidos y precisos (Groner et al., 2016). Las técnicas de PCR son cada vez menos costosas, pero su uso para monitoreo de largo plazo aún está lejos de ser rutinario, en particular en países en desarrollo (Gibello et al., 2001; Muldrew, 2009). La evaluación visual es más fácil de implementar a la larga, pero claramente subestima la prevalencia de PaV1. En el presente trabajo se utilizó el PCR como el estándar de oro para evaluar la sensibilidad y especificidad de la observación de los signos clínicos. Puesto que la sensibilidad y especificidad de una prueba diagnóstica es independiente de la prevalencia (Lalkhen y McCluskey, 2008), cuando la especificidad de una prueba determinada es 1 (es decir, 100% comparada con el estándar de oro), entonces el valor de sensibilidad se puede utilizar como un factor de corrección para la prevalencia (Pestal et al., 2003). Por tanto, nuestros resultados confirman la aseveración de Huchin-Mian et al. (2013) de que, siempre y cuando se examine una muestra representativa en una población dada de *P. argus*, la verdadera prevalencia de PaV1 en esa población se podrá estimar aplicando un factor de 2x a la prevalencia clínica. Esto puede ayudar a simplificar los esfuerzos por monitorear cambios en la prevalencia de PaV1 en poblaciones locales de *P. argus*.

## Capítulo 6. Discusión general y conclusiones

El presente trabajo de tesis abordó aspectos ecológicos de una enfermedad viral que ataca a las langostas espinosas del Caribe, *Panulirus argus*, un importante recurso pequero en México y en toda la región del Gran Caribe. Esta enfermedad se descubrió a principios de los años 2000 y su agente etiológico fue descrito pocos años después (Shields y Behringer, 2004), siendo llamado *Panulirus argus virus 1*. El PaV1 ataca principalmente las langostas juveniles (<50 mm LC) y se transmite por contacto y a través del agua (Butler et al., 2008), lo que despertó la alarma en lugares donde se pescan langostas utilizando casitas, refugios artificiales que pueden albergar múltiples langostas ya que capitalizan el comportamiento gregario de esta especie (Behringer et al., 2011; Cruz-Quintana et al., 2012).

El presente estudio se desarrolló en la laguna arrecifal de Puerto Morelos, un ambiente rico en hábitats para asentamiento de postlarvas y crecimiento de langostas juveniles pequeñas, pero pobre en refugios estructurados tipo grieta para juveniles grandes y sub-adultos, cuyo cambio de hábitat (de la vegetación a los refugios tipo grieta) coincide con la expresión del comportamiento gregario (Childress y Herrnkind, 1996; Ratchford y Eggleston, 1998). Más aún, muchos de los escasos refugios naturales para juveniles de langosta en esta laguna son de naturaleza efímera (Briones-Fourzán y Lozano-Álvarez, 2001a; Lozano-Álvarez et al., 2009), por lo que el refugio es un factor limitante para la población local de juveniles de *P. argus* ya que su falta o escasez aumenta el riesgo de depredación y reduce la abundancia local de langosta, como quedó demostrado en un experimento con casitas (escaladas para juveniles) llevado a cabo hace años (Briones-Fourzán et al., 2007). Esta situación permitió la evaluación del comportamiento de las langostas en presencia de co-específicos enfermos de PaV1; el posible efecto del uso de casitas en los niveles de prevalencia de PaV1; el efecto de la

remoción de langostas enfermas de las casitas a lo largo del tiempo, y los patrones de agregación de langostas sanas y enfermas en casitas vs refugios naturales de dimensiones grandes. Asimismo, se estimaron las medidas de validación (sensibilidad y especificidad) de los signos visibles de la enfermedad (infección clínica) contra ensayos de PCR (“estándar de oro”) con fines de monitoreo de la prevalencia de esta enfermedad a lo largo del tiempo.

### **Principales aportaciones de este trabajo**

Dado que el comportamiento social de *Panulirus argus* es mediado por señales químicas, los individuos son atraídos hacia refugios ocupados por co-específicos; sin embargo, también pueden evitar esos refugios si los co-específicos se encuentran heridos o muertos al detectar sus señales químicas como señal de alarma de depredación. Para un individuo que está buscando un refugio, seguir las señales químicas de co-específicos hacia un refugio reduce su tiempo de exposición a los depredadores y le permite evaluar la calidad del refugio (Nevitt et al., 2000; Childress y Herrnkind, 2001a), mientras que congregarse dentro del refugio puede incrementar la sobrevivencia per cápita a través del llamado efecto de dilución o la defensa grupal del refugio (Eggleston et al., 1990; Childress y Herrnkind, 2001a, 2001b; Briones-Fourzán et al., 2007).

En ese sentido, con la finalidad de dilucidar si las señales químicas provenientes de langostas enfermas de PaV1 podrían afectar la elección de refugio por parte de langostas sanas se llevó a cabo un experimento controlado para examinar y contrastar la respuesta de *P. argus* a refugios de los que emanaban señales químicas de langostas sanas (no infectadas), infectadas (sub-clínicamente infectada), enfermas (clínicamente infectadas), o muertas. A diferencia de estudios previos en los que no se había controlado la presencia del virus PaV1 en las langostas focales, en este estudio sólo langostas no

infectadas (de acuerdo con resultados de pruebas de PCR) y en intermuda fueron utilizadas como focales.

Las langostas focales evitaron significativamente el refugio con olores de co-específicos enfermos en un grado muy similar a la evitación de refugios con olores de alarma de co-específicos muertos (80% y 85% de evitación, respectivamente). En cambio, su respuesta a refugios con olores de co-específicos sanos o sub-clínicamente infectados con PaV1 no difirió del azar. Estos resultados sugieren que una vez que las langostas infectadas con PaV1 desarrollan los signos clínicos de la enfermedad, su olor tiene un efecto tan repelente sobre otras langostas como el olor de los co-específicos muertos. Como parte del progreso de la infección viral PaV1, los principales sitios de infección son los fagocitos fijos en el hepatopáncreas pero más adelante la infección se vuelve sistémica (Li et al., 2008). En langostas severamente infectadas, el hepatopáncreas se aprecia isquémico, atrofiado, y con necrosis local, lo que posiblemente provoca desgaste metabólico y letargo (Shields y Behringer, 2004; Briones-Fourzán et al., 2009). Los cambios que ocurren en los constituyentes de la hemolinfa de langostas infectadas con PaV1 tanto experimentalmente (Li et al., 2008) como naturalmente (Pascual-Jiménez et al., 2012; Herrera-Salvatierra et al., 2019) se reflejan en el incremento de la degradación del tejido y catabolismo del hepatopáncreas. Por lo tanto, es posible que las langostas visiblemente enfermas exuden químicos asociados con la descomposición, dando como resultado un “olor a muerte”, que las langostas sub-clínicamente infectadas aún no emiten o emiten en menor grado.

En el presente estudio (capítulo 3) se exploró el efecto potencial de la presencia de casitas en los niveles de prevalencia de la enfermedad PaV1 (etapa 1), y más adelante se exploró el efecto de remover regularmente a todos los individuos enfermos de las casitas en los niveles de prevalencia (etapa 2). En la etapa 1, a lo largo de 10 muestreos con una frecuencia trimestral, la densidad de las langostas fue en promedio ocho veces más alta

en los sitios experimentales con casitas que en aquellos sin casitas, resultados que se esperaban y que coinciden con trabajos previos (Briones-Fourzán y Lozano-Álvarez, 2001b; Briones-Fourzán et al., 2007). Sin embargo, la presencia de casitas al parecer no afectó la prevalencia media de PaV1 y tampoco hubo una relación significativa entre la densidad de langostas y la prevalencia de la enfermedad. Este resultado es consistente con ejercicios de simulación en los que tampoco se encontró un incremento en la transmisión o persistencia de PaV1 al aumentar la agregación espacial de langostas (Dolan et al., 2014), lo que sugiere que las langostas sanas evitan el contacto con las enfermas (Behringer et al., 2006, Capítulo 2 de este trabajo) -lo que podría estar ayudando a controlar la epizootia (Butler et al., 2015)-, o que pueden compartir la amplia área de refugio que proveen las casitas, pero manteniendo su distancia en el interior (Lozano-Álvarez et al., 2008, 2018; Capítulo 4 de este trabajo).

En la etapa 2, la extracción de langostas enfermas no impactó los niveles de prevalencia, pero hubo diferencias significativas en la probabilidad de encontrar langostas enfermas entre los 5 sitios con casitas, lo que sugiere que hay otros factores que pueden estar influenciando dichos niveles. Por ejemplo, en la Bahía de la Ascensión, Briones-Fourzán et al. (2012) encontraron menores niveles de prevalencia de PaV1 en sitios de la bahía menos profundos, con fondo duro y escasa vegetación, y mayores en sitios más profundos y con vegetación marina densa. Con base en sus resultados, Briones-Fourzán et al. (2012) sugirieron que si las partículas de PaV1 se transmiten a través del agua (Butler et al., 2008), entonces su persistencia podría estar influenciada por la exposición del hábitat a la radiación ultravioleta y a la cantidad de sombra provista por la vegetación marina local, es decir, que la vegetación marina podría actuar como reservorio ambiental para viriones de PaV1 (Briones-Fourzán et al., 2012).

Los reservorios de infección son lugares en los que los microorganismos patógenos pueden sobrevivir hasta que puedan ingresar a un nuevo individuo y causar

una infección, permitiendo de esta manera que una enfermedad persista en el tiempo y sea transmitida. Estos reservorios pueden ser otro individuo, animales, vegetación u objetos inanimados. Entre estos últimos, los más comunes son el agua, el suelo y las superficies que pueden albergar concentraciones de microorganismos, generalmente de una misma especie, significativamente superiores a las encontradas habitualmente y a las del ambiente circundante (Calderón, 1989). En particular, los virus marinos tienen la capacidad de adsorberse a ciertas superficies como mecanismo de persistencia en el ambiente marino (Gerba y Schaiberger, 1975). Por ello, entre los reservorios potenciales del virus podrían encontrarse, además de las propias langostas, el agua circundante y las praderas densas de pasto marino y algas, pero también otras especies animales (Small y Pagenkopp, 2013)

Recientemente, Davies et al. (2019) llevaron a cabo otro estudio en la Bahía de la Ascensión con el objetivo de identificar reservorios potenciales de PaV1. Al igual que Briones-Fourzán et al. (2012), encontraron los mayores niveles de prevalencia en los sitios con más vegetación, apoyando la hipótesis sobre la función de los pastos marinos como reservorios ambientales para el virus PaV1. Pero además, Davies et al. (2019) analizaron la composición de las comunidades locales de invertebrados para detectar las especies de crustáceos decápodos más abundantes como reservorios potenciales de PaV1. Estas especies fueron principalmente pequeños cangrejos ermitaños, tales como *Pagurus brevidactylus*, que fue el decápodo más abundante en todas sus zonas de estudio, *Clibanarius tricolor*, *Calcinus tibicen*, *Paguristes anomalus* y *P. puncticeps*. En un estudio similar hecho en la laguna arrecifal de Puerto Morelos, Davies et al. (2020) también encontraron una gran abundancia de cangrejos ermitaños en sitios con casitas, reforzando la hipótesis de que estos organismos podrían ser reservorios potenciales de PaV1.

Cabe señalar que en el ambiente oceánico, hábitat de larvas y postlarvas recién metamorfoseadas de *P. argus*, Lozano-Álvarez et al. (2015) encontraron dos postlarvas oceánicas que estaban infectadas con PaV1 (utilizando PCR). Estos autores sugirieron que las masas de sargazo flotantes podrían ser reservorios ambientales de PaV1 y que los puerulos infectados que nadan hacia zonas costeras para asentarse en las zonas de vegetación podrían representar un reservorio asintomático de PaV1.

En hábitats con refugios escasos, el riesgo de depredación de juveniles de langosta es más alto que en hábitats con refugios abundantes, por lo que las langostas sanas enfrentan una disyuntiva (*trade-off*) entre evitar compartir refugios con co-específicos enfermos y evitar el riesgo de depredación (Lozano-Álvarez et al., 2008, 2018). De hecho, en la naturaleza, los comportamientos de evitación pueden ser costosos, tanto energéticamente como debido a disyuntivas entre demandas conflictivas (Loehle, 1995, Wisenden et al., 2009) y, como lo señalaron Shabani et al. (2009), la elección de refugio es un asunto complejo que va a depender en gran medida del contexto en el que las señales químicas son transmitidas por los co-específicos.

Así, con respecto a la agregación de langostas en casitas y/o refugios naturales, la densidad de langostas por refugio fue mayor en casitas que en refugios naturales grandes, pero la distribución estuvo más agregada en los refugios naturales que en las casitas, lo que refleja la escasez de refugios estructurados para langostas en la laguna arrecifal de Puerto Morelos. Sin embargo, la presencia de langostas enfermas no impidió la cohabitación con langostas sanas, pero esta cohabitación fue mayor en casitas que en refugios naturales, ya que el 40% de las casitas contenía langostas sanas cohabitando con enfermas. Esto sugiere que en ausencia de refugios alternativos, la amplia área de refugio que provee una casita ( $\sim 1 \text{ m}^2$ ) permite la segregación entre langostas sanas y enfermas. Sin embargo, la probabilidad de segregación de las langostas enfermas al interior de la casita disminuyó al aumentar el número de langostas ocupando la casita, lo

que sugiere que dicha segregación dependerá tanto del número de langostas que se encuentren cohabitando una casita en un tiempo dado como del comportamiento gregario expresado por las langostas enfermas.

Debido a que *P. argus* es un recurso pesquero importante, resulta deseable monitorear la prevalencia de PaV1 en poblaciones locales como la que se encuentra en la laguna arrecifal de Puerto Morelos. La hemolinfa lechosa es visible a través de la membrana translúcida entre el cefalotórax y el abdomen, pero este signo solo es evidente en etapas avanzadas de la infección. Huchin-Mian et al. (2013) estimaron las medidas de validación (sensibilidad y especificidad) de los signos clínicos de PaV1 utilizando la prueba de PCR de punto final como el “estándar de oro”, en la población de langostas de Bahía de la Ascensión, donde hay una importante pesquería comercial de *P. argus*. En el presente trabajo, se estimaron las medidas de validación de una manera similar para la población de juveniles de *P. argus* de la laguna arrecifal de Puerto Morelos, y se obtuvieron virtualmente los mismos valores de sensibilidad y especificidad (0.48 y 1, respectivamente) para la observación de los signos clínicos que en el trabajo de Huchin-Mian et al. (2013) (0.51 y 1, respectivamente). Esto indica que en la laguna arrecifal de Puerto Morelos, por cada langosta clínicamente infectada con PaV1 (es decir, enferma) hay otra langosta con infección sub-clínica, y confirma la validez de aplicar un simple factor 2x para monitorear la prevalencia real de PaV1 en el tiempo sobre la base de evaluaciones visuales en muestras representativas de la población, que son mucho más fáciles y rápidas de llevar a cabo.

### **Limitaciones del trabajo y recomendaciones**

Como todo trabajo de investigación, el presente estudio tuvo limitaciones. De estas, la más tal vez importante fue la gran escasez de langostas en los sitios

experimentales sin casitas (ver Apéndice 2), que impidió hacer los análisis estadísticos como estaban planeados (con el sitio como unidad experimental) y limitó la comparación de patrones de ocupación de refugios naturales entre los sitios con y sin casitas. Si bien las langostas juveniles grandes y sub-adultas son naturalmente escasas en la laguna arrecifal de Puerto Morelos (por la falta de refugio adecuado), en estudios anteriores hubo más langostas en los sitios sin casitas que las registradas en el presente estudio (Briones-Fourzán y Lozano-Álvarez, 2001b; Briones-Fourzán et al., 2003, 2007). Es posible que esta situación esté reflejando, además de la mortalidad por depredación asociada a la escasez de refugios, una mortalidad adicional por efecto de la emergencia y posterior expansión de PaV1 a partir de 2001.

Otra limitación fue que la evaluación de la respuesta de las langostas focales a los estímulos fue llevada a cabo a lo largo de la noche debido al interés en apreciar la elección o rechazo de un refugio del que emanara olor de langosta enferma o sub-clínicamente infectada antes del amanecer, cuando las langostas regresan al refugio para reducir el riesgo de depredación, más que la respuesta inmediata a la hemolinfa, como lo hicieron Shabani et al. (2008) y Briones-Fourzán et al. (2008). Dado que los olores de alarma provenientes de organismo heridos pueden causar aversión por un periodo limitado, en las pruebas de toda la noche con langostas muertas el estímulo químico podría estar cambiando a lo largo del tiempo (revisión en Aggio y Derby, 2011). Por tanto, lograr identificar las moléculas que producen estos comportamientos en las langostas e identificar sus fuentes en animales vivos permitirá en el futuro analizar las respuestas mediante experimentos con un mayor nivel de control para conocer cómo y dónde se procesan estas señales.

Por otro lado, el alcance de las conclusiones a las que se puede llegar está limitado por la complejidad inherente a los sistemas naturales, donde varios factores pueden actuar e interactuar para producir los patrones observados. Se sabe que los

patógenos pueden interactuar con factores tales como la pérdida de hábitat, el cambio climático, la sobreexplotación, especies no nativas y la contaminación, lo cual contribuye a extinciones locales o globales (Smith et al., 2009). Cuando el presente estudio se inició, el conocimiento sobre PaV1 era reducido; por ejemplo, se desconocía si los factores ambientales podrían estar influenciando los niveles de prevalencia, y de ser así, cuáles podrían ser. Antes se pensaba que los niveles de prevalencia de PaV1 podrían tener relación con la temperatura del agua (Behringer et al., 2011), pero en el presente estudio no se encontró un efecto significativo del tiempo en los niveles de prevalencia (Capítulo 3), como tampoco lo encontraron en Florida Butler et al. (2015). Estos autores registraron un aumento en la agregación de langostas luego de que un florecimiento de cianobacterias arrasó con la población de esponjas, que son el principal refugio para los juveniles de *P. argus* en áreas con fondos duros de la bahía de Florida.

De acuerdo con Butler et al. (2015), a pesar de la escasez de refugios, las langostas sanas abandonaban su refugio si se les introducía experimentalmente una langosta enferma, prefiriendo el riesgo de depredación al riesgo de contagiarse. Esos resultados se contraponen con los de los experimentos de Lozano-Álvarez et al. (2018), en los que, en presencia de un depredador, las langostas sanas utilizaron casitas vacías pero también compartieron casitas ocupadas tanto por langostas sanas como por langostas enfermas, lo que sugiere que la evitación de la enfermedad depende hasta cierto grado de la disponibilidad de refugios alternativos y de la inmediatez del riesgo de depredación. Asimismo, en el presente trabajo se observó una cohabitación relativamente alta de langostas sanas y enfermas en las casitas, pero la probabilidad de que las langostas enfermas estuvieran segregadas al interior de la casita disminuyó al aumentar el número de langostas ocupando la casita. En conjunto, estos estudios evidencian el comportamiento complejo pero flexible de *P. argus* en diferentes contextos ecológicos, por lo que sería conveniente analizar los patrones de cohabitación entre langostas sanas y

enfermas en hábitats naturales diferentes a la laguna arrecifal de Puerto Morelos, por ejemplo fondos duros con lechos de macroalgas; parches arrecifales, etc.

Otros factores que podrían interactuar con el PaV1 para producir los patrones de prevalencia observados en las langostas son, como se menciona más arriba, los reservorios potenciales del virus. Si bien ya se ha sugerido que la vegetación marina densa podría ser un reservorio ambiental (Briones-Fourzán et al., 2012) y que los pequeños cangrejos ermitaños que abundan en todos los tipos de hábitats que ocupan los juveniles de *P. argus* podrían también ser reservorios de PaV1 (Davies et al., 2019, 2020), hace falta probar estas hipótesis. Para ello, sería necesario utilizar técnicas para análisis de ADN ambiental y/o PCR en tiempo real (Clark et al., 2018). De esta manera, estudios futuros acerca de la influencia de los factores ecológicos sobre la transmisión de PaV1 permitirán ubicar los lugares y las condiciones que favorecen la sobrevivencia y/o multiplicación del virus.

El presente trabajo tuvo un enfoque principalmente ecológico, pero aún falta mucho por descubrir sobre la enfermedad causada por PaV1. Para ello, es necesario continuar analizando más a fondo los efectos del virus en langostas hospederas a nivel inmune y nutricional (Herrera-Salvatierra et al., 2019) e incluso molecular, para obtener un mejor conocimiento de la enfermedad y del sistema hospedero-patógeno.

## **Conclusiones**

Las langostas requieren de refugios para protegerse de sus depredadores y sobrevivir, y en el caso de *Panulirus argus*, múltiples individuos pueden compartir un refugio, en particular si este es grande, como es el caso de las casitas. Pero la presencia de co-específicos clínicamente infectados con PaV1 puede afectar los patrones de cohabitación porque las langostas sanas tienden a evitar las señales químicas provenientes de co-específicos enfermos. Sin embargo, para una langosta expuesta que

está buscando refugio, la decisión de compartirlo o no con un co-específico enfermo plantea un conflicto, ya que también existe el riesgo de depredación y ambos, depredación y enfermedad, son fuerzas importantes que determinan la adecuación de los individuos (Hart, 1990). Para un individuo, debería ser ventajoso poder detectar de forma efectiva un alto riesgo de depredación y comportarse de manera acorde para reducir la probabilidad de ser depredado. Pero el riesgo de depredación puede variar ampliamente en diferentes contextos ecológicos o escalas temporales; por tanto, los individuos deben ser sensibles a los niveles presentes de riesgo de depredación para poder lograr más en su vida que solo evitar ser comidos (Lima y Dill, 1990). De manera similar, las defensas contra patógenos, incluyendo la inmunidad conductual (o “disgusto”, Curtis et al., 2011), puede reducir el riesgo de enfermarse, pero también hay costos y beneficios de las respuestas inmunes (McKean y Lazzaro, 2011). Así, la langosta debería resolver el conflicto con base en la evaluación que haga del riesgo presente de depredación, su experiencia previa con depredadores (y enfermedades), y los costos y beneficios asociados a estas opciones conductuales. Todos estos factores podrían determinar en un momento dado los patrones de cohabitación de langostas sanas y enfermas. Estos, en conjunto con la posible existencia de reservorios naturales o vectores del PaV1 así como con las condiciones inmunológicas de langostas en diferentes lugares, podrían estar modulando los niveles de prevalencia de la enfermedad.

## Referencias

- Acosta CA, Butler MJ (1997) Role of mangrove habitat as nursery for juvenile spiny lobster, *Panulirus argus*, in Belize. *Mar Freshwater Res* 48: 721–727.
- Aggio J, Derby CD (2011) Chemical communication in lobsters. In: Breithaupt T, Thiel M (eds) *Chemical Communication in Crustaceans*. Springer, New York, pp 239–256.
- Albins MA, Hixon MA (2013) Worst case scenario: potential long-term effects of invasive predatory lionfish (*Pterois volitans*) on Atlantic and Caribbean coral-reef communities. *Environ Biol Fish* 96: 1151–1157.
- Aljanabi S, Martínez I (1997) Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucl Acids Res* 25: 4692–4693.
- Altman DG, Bland JM (1994a). Diagnostic test 1: Sensitivity and specificity. *Br Med J* 308:1552.
- Altman DG, Bland JM (1994b). Diagnostic test 2: Predictive values. *Br Med J* 309:102.
- Amdam GV, Hovland AL (2011) Measuring animal preferences and choice behavior. *Nature Educ Knowl* 3(10):74.
- Anderson DR, Burnham KP (1999) Understanding information criteria for selection among capture-recapture or ring recovery models. *Bird Stud* 46: 14–21.
- Anderson JR, Behringer DC (2013) Spatial dynamics in the social lobster *Panulirus argus* in response to diseased conspecifics. *Mar Ecol Prog Ser* 474: 191–200.
- Arce AM, Aguilar-Dávila W, Sosa-Cordero E, Caddy JF (1997) Artificial shelters (casitas) as habitat for juvenile spiny lobsters *Panulirus argus* in the Mexican Caribbean. *Mar Ecol Prog Ser* 158: 217–224.
- Bateman KS, Stentiford GD (2017) A taxonomic review of viruses infecting crustaceans with an emphasis on wild hosts. *J Invertebr Pathol* 147:86–110.
- Behringer DC (2012) Diseases of wild and cultured juvenile crustaceans: Insights from below the minimum landing size. *J Invertebr Pathol* 110: 225–233.
- Behringer DC, Butler MJ (2010) Disease avoidance influences shelter use and predation in Caribbean spiny lobster. *Behav Ecol Sociobiol* 64: 747–755.
- Behringer DC, Butler MJ, Shields JD (2006) Avoidance of disease by social lobsters. *Nature* 441: 421.
- Behringer DC, Butler MJ, Shields JD, Moss J (2011) Review of *Panulirus argus* Virus 1—a decade after its discovery. *Dis Aquatic Org* 94: 153–160.

- Behringer DC, Butler MJ IV, Moss J, Shields JD (2012) PaV1 infection in the Florida spiny lobster (*Panulirus argus*) fishery and its effects on trap function and disease transmission. *Can J Fish Aquat Sci* 69: 136–144.
- Behringer DC, Karvonen A, Bojko J (2018) Parasite avoidance behaviours in aquatic environments. *Phil Trans R Soc B* 373: 20170202.
- Bellmont-Montoya S (2007) Validación de pruebas diagnósticas. *Angiología* 59(6): 433–438.
- Bliss CI, Fisher RA (1953) Fitting the negative binomial distribution to biological data. *Biometrics* 9: 176–200.
- Bowman KM, Hawley DM (2010) Sickness behaviour acting as an evolutionary trap? Male house finches preferentially feed near diseased conspecifics. *Biol Lett* 6: 462–465.
- Briones-Fourzán P, Lozano-Álvarez E (2000) The spiny lobsters fisheries in México. In: Phillips BF, Kittaka J (eds), *Spiny Lobsters: Fisheries and Culture*, 2nd ed. Blackwell, Oxford, pp. 144–157.
- Briones-Fourzán P, Lozano-Álvarez E (2001a) The importance of *Lobophora variegata* (Phaeophyta: Dictyotales) as a habitat for small juveniles of *Panulirus argus* (Decapoda: Palinuridae) in a tropical reef lagoon. *Bull Mar Sci* 68: 207–219.
- Briones-Fourzán P, Lozano-Álvarez E (2001b) Effects of artificial shelters (Casitas) on the abundance and biomass of juvenile spiny lobsters *Panulirus argus* in a habitat-limited tropical reef lagoon. *Mar Ecol Prog Ser* 221: 221–232.
- Briones-Fourzán P, Lozano-Álvarez E (2008) Coexistence of congeneric spiny lobsters on coral reefs: differences in conspecific aggregation patterns and their potential antipredator benefits. *Coral Reefs* 27: 275–287.
- Briones-Fourzán P, Baeza-Martínez K, Lozano-Álvarez E (2009) Nutritional indices of juvenile Caribbean spiny lobsters in a Mexican reef lagoon: Are changes over a 10-year span related to the emergence of *Panulirus argus* Virus 1 (PaV1)? *J Exp Mar Biol Ecol* 370: 82–88.
- Briones-Fourzán P, Lozano-Álvarez E, Eggleston DB (2000) The use of artificial shelters (Casitas) in research and harvesting of Caribbean spiny lobsters in Mexico. In Phillips BF, Kittaka J (eds) *Spiny Lobsters: Fisheries and Culture*, 2<sup>nd</sup> ed. Blackwell, Oxford, pp. 420–446.
- Briones-Fourzán P, Lozano-Álvarez E, Negrete-Soto F, Barradas-Ortiz C (2007) Enhancement of juvenile Caribbean spiny lobsters: an evaluation of changes in

- multiple response variables with the addition of large artificial shelters. *Oecologia* 151: 401–416.
- Briones-Fourzán P, Muñoz de Cote-Hernández R, Lozano-Álvarez E (2016) Variability in prevalence of *Cymatocarpus solearis* (Trematoda, Brachycoeliidae) in Caribbean spiny lobsters *Panulirus argus* (Decapoda: Palinuridae) from Bahía de la Ascensión (Mexico). *J Invertebr Pathol* 137: 62–70.
- Briones-Fourzán P, Ramírez-Zaldívar E, Lozano-Álvarez E (2008) Influence of conspecific and heterospecific aggregation cues and alarm odors on shelter choice by syntopic spiny lobsters. *Biol Bull* 215: 182–190.
- Briones-Fourzán P, Candia-Zulbarán RI, Negrete-Soto F, Barradas-Ortiz C, Huchin-Mian JP, Lozano-Álvarez E (2012) Influence of local habitat features on disease avoidance by Caribbean spiny lobsters in a casita-enhanced bay. *Dis Aquat Org* 100: 135–148.
- Briones-Fourzán P, Álvarez-Filip L, Barradas-Ortiz C, Morillo-Velarde PS, Negrete-Soto F, Segura-García I, Sánchez-González A, Lozano-Álvarez E (2019) Coral reef degradation differentially alters feeding ecology of co-occurring congeneric spiny lobsters. *Front Mar Sci* 5: 516.
- Burge CA, Eakin CM, Friedman CS, Froelich B, Hershberger PK, Hofmann EE, Petes LE, Prager KC, Weil E, Willis BL, Ford SE, Harvell CD (2014) Climate change influences on marine infectious diseases: implications for management and society. *Annu Rev Mar Sci* 6: 249–277.
- Bush SE, Clayton DH (2018) Anti-parasite behaviour of birds. *Phil Trans R Soc B* 373: 20170196.
- Butler MJ, Herrnkind WF (1997) A test of recruitment limitation and the potential for artificial enhancement of spiny lobster (*Panulirus argus*) populations in Florida. *Can J Fish Aquat Sci* 54: 452–463.
- Butler IV MJ, Herrnkind WF, Hunt JH (1997) Factors affecting the recruitment of juvenile Caribbean spiny lobsters dwelling in macroalgae. *Bull Mar Sci* 61: 3–19.
- Butler MJ IV, Steneck RS, Herrnkind WF (2006) Juvenile and adult ecology. In: Phillips BF (Ed.) *Lobsters: Biology, Management, Aquaculture and Fisheries*. Blackwell, Oxford, 263–309.
- Butler MJ, Behringer DC, Shields JD (2008) Transmission of *Panulirus argus* Virus 1 (PaV1) and its effect on the survival of juvenile Caribbean spiny lobster. *Dis Aquat Org* 79: 173–182.

- Butler IV MJ, Behringer Jr DC, Dolan III TW, Moss J, Shields JD (2015) Behavioral immunity suppresses an epizootic in Caribbean spiny lobsters. *PLoS One* 10(6): e0126374.
- Cáceres-Martínez J, Vázquez-Yeomans R (2013) Uso de la técnica de PCR en el proceso de diagnóstico de enfermedades infecciosas en organismos acuáticos, su validación y su interpretación. *Cienc Pesq* 21(1): 57-65.
- Caddy JF (2008) The importance of “cover” in the life histories of demersal and benthic marine resources: a neglected issue in fisheries assessment and management. *Bull Mar Sci* 83: 7–52.
- Calderón EAM (1989) Investigación de reservorios ambientales de bacterias causantes de infecciones hospitalarias. Organización Panamericana de la Salud. Oficina Sanitaria Panamericana, Oficina Regional de la Organización Mundial de la Salud. 118 pp.
- Cameron A (2002) Survey toolbox for aquatic animal diseases. Monograph No. 94. Australian Centre for International Agriculture Research (ACIAR), Canberra.
- Candia-Zulbarán RI (2011) Ecología y prevalencia del síndrome de la enfermedad viral por PaV1 (*Panulirus argus* Virus 1) en la Bahía de la Ascensión, Quintana Roo, donde se usan refugios artificiales (“casitas”) para la pesca de langostas *Panulirus argus*. Tesis de Maestría, Universidad Nacional Autónoma de México. Puerto Morelos, México.
- Candia-Zulbarán RI, Briones-Fourzán P, Negrete-Soto F, Barradas-Ortiz C, Lozano-Álvarez E (2012) Variability in clinical prevalence of PaV1 in Caribbean spiny lobsters occupying commercial casitas over a large bay in Mexico. *Dis Aquat Org* 100: 125–133.
- Candia-Zulbarán RI, Briones-Fourzán P, Lozano-Álvarez E, Barradas-Ortiz C, Negrete-Soto F (2015) Caribbean spiny lobsters equally avoid dead and clinically PaV1-infected conspecifics. *ICES J Mar Sci* 72(Suppl 1): i164–i169.
- Cerenius L, Jiravanichpaisal P, Liu H-P, Söderhäll I (2010) Crustacean immunity In: Söderhäll K (ed), *Invertebrate immunity*. Landes Bioscience, Austin, pp. 239–259.
- Cerenius L, Söderhäll K (2018) Crayfish immunity – Recent findings. *Dev Comp Immunol* 80: 94–98.
- Chan TY (2010) Annotated checklist of the world’s marine lobsters (Crustacea: Decapoda: Astacidea, Glypheidea, Achelata, Polychelida). *Raffles Bull Zool (Suppl 23)*: 153–181.

- Childress MJ (2007) Comparative sociobiology of spiny lobsters. In: Duffy JM, Thiel M (eds), Evolutionary ecology of social and sexual systems: Crustaceans as model organisms. Oxford Univ Press, New York, pp. 271–293.
- Childress MJ, Herrnkind WF (1994) The behavior of juvenile Caribbean spiny lobster in Florida Bay: seasonality, ontogeny, and sociality. *Bull Mar Sci* 54: 819–827.
- Childress MJ, Herrnkind WF (1996) The ontogeny of social behavior among juvenile Caribbean spiny lobsters. *Anim Behav* 51: 675–687.
- Childress MJ, Herrnkind WF (2001a) Influence of conspecifics on the ontogenetic habitat shift of juvenile Caribbean spiny lobsters. *Mar Freshw Res* 52: 1077–1084
- Childress MJ, Herrnkind WF (2001b) The guide effect influence on the gregariousness of juvenile Caribbean spiny lobsters. *Anim Behav* 62: 465–472.
- Childress MJ, Heldt K, Miller S (2015) Are juvenile Caribbean spiny lobsters (*Panulirus argus*) becoming less social? *ICES J Mar Sci* 72 (Suppl 1): i170–i176.
- Clark A, Behringer D, Moss Small J, Waltzek T (2018) Partial validation of a TaqMan real-time quantitative PCR assay for the detection of *Panulirus argus* virus 1. *Dis Aquat Org* 129:193–198.
- Cobb JS (1981). Behaviour of the western Australian spiny lobster, *Panulirus cygnus* George, in the field and laboratory. *Aust J Mar Freshw Res* 32: 399–409.
- Cooch E, White G (2010) Program Mark: A Gentle Introduction, 9th edition.  
<http://www.phidot.org/software/mark/docs/book>
- Cooch EG, Conn PB, Ellner SP, Dobson AP, Pollock KH. 2012. Disease dynamics in wild populations: modeling and estimation: a review. *J Ornithol* 152 (Suppl 2): S485–S509.
- Coulson G, Cripps JK, Garnick S, Bristow V, Beveridge I (2018) Parasite insight: assessing fitness costs, infection risks and foraging benefits relating to gastrointestinal nematodes in wild mammalian herbivores. *Phil Trans R Soc B* 373: 20170197.
- Cruz R, Phillips BF (2000) The artificial shelters (*Pesqueros*) used for the spiny lobster (*Panulirus argus*) fisheries in Cuba. In: Phillips BF, Kittaka J (eds) *Spiny Lobsters: Fisheries and Culture*, 2nd edn. Blackwell, Oxford, pp. 400–419.
- Cruz-Quintana Y, Rodríguez-Canul R, Vidal-Martínez VM (2011) First evidence of *Panulirus argus* Virus 1 (PaV1) in spiny lobster from Cuba and clinical estimation of its prevalence. *Dis Aquat Org* 93: 141–147.
- Culver CS, Kuris AM (2000) The apparent eradication of a locally established introduced marine pest. *Biol Invas* 2: 245–253.

- Curtis V, de Barra M, Aunger R (2011) Disgust as an adaptive system for disease avoidance behavior. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 366: 389–401.
- Dahlgren CP, Staine F (2007) Growth and survival of Caribbean spiny lobsters, *Panulirus argus*, raised from puerulus to adult size in captivity. *Proc Gulf Carib Fish Inst* 59: 303–312.
- Davies CE, Briones-Fourzán P, Lozano-Álvarez E (2019) Untangling the effects of size, habitat and invertebrate biodiversity on parasite prevalence in the Caribbean spiny lobster. *Mar Biol* 166: 113.
- Davies CE, Briones-Fourzán P, Barradas-Ortiz C, Negrete-Soto F, Moo-Cocom G, Lozano-Álvarez E (2020) Do ecological characteristics drive the prevalence of *Panulirus argus* virus 1 (PaV1) in juvenile Caribbean spiny lobsters in a tropical reef lagoon? *PLoS ONE* 15: e0229827.
- Deleveaux VKW, Bethel G (2002) National report of the spiny lobster fishery in the Bahamas. *FAO Fish Rep* 715: 161–167.
- Derby CD (2000) Learning from spiny lobsters about chemosensory coding of mixtures. *Physiol Behav* 69: 203–209.
- Dicke M, Grostal P (2001) Chemical detection of natural enemies by arthropods: an ecological perspective. *Annu Rev Ecol System* 32: 1–23.
- Diez L, Moquet L, Detrain C (2013) Post-mortem changes in chemical profile and their influence on corpse removal in ants. *J Chem Ecol* 39: 1424–1432.
- Dolan III TW, Butler IV MJ (2006) The adaptive value of aggregation among juvenile Caribbean spiny lobster: an evaluation using individual-base modeling. *J Crust Biol* 26: 565–578.
- Dolan III TW, Butler IV MJ, Shields JD (2014) Host behavior alters spiny lobster–viral disease dynamics: a simulation study. *Ecology* 95:2346–2361
- Donnelly CA, Woodroffe R, Cox DR, Bourne J, Gettinby G, Le Fevre AM, McInerney JP, Morrison WI (2003) Impact of localized badger culling on tuberculosis incidence in British cattle. *Nature* 426: 834–837.
- Eggleston DB, Lipcius RN (1992) Shelter selection by spiny lobster under variable predation risk, social conditions and shelter size. *Ecology* 73: 992–1011.
- Eggleston DB, Lipcius RN, Miller DL (1992) Artificial shelters and survival of juvenile Caribbean spiny lobster *Panulirus argus*: spatial, habitat and lobster size effects. *Fish Bull* 90: 691–702.

- Eggleston DB, Lipcius RN, Grover JJ (1997) Predator and shelter- size effects on coral reef fish and spiny lobster prey. *Mar Ecol Prog Ser* 149: 43–59.
- Eggleston DB, Lipcius RN, Miller D, Cobá-Cetina L (1990) Shelter scaling regulates survival of Caribbean spiny lobster, *Panulirus argus*. *Mar Ecol Prog Ser* 62: 70–88.
- Ehrhardt NM, Puga R, Butler IV MJ (2011) Implications of the ecosystem approach to fisheries management in large ecosystems: the case of the Caribbean spiny lobster. In: Fanning L, Mahon R, McConney P (eds.) *Towards marine ecosystem-based management in the wider Caribbean*. Amsterdam Univ Press, Amsterdam, pp. 157–175.
- Evans LH, Jones JB, Brock JA (2000) Diseases of spiny lobsters. In: Phillips BF, Kittaka J (eds.), *Spiny Lobsters: Fisheries and Culture* (2<sup>nd</sup> Edition). Fishing News Books (Blackwell), Oxford, pp. 586–600.
- FAO (2016) *Panulirus argus* (Latreille, 1804). <http://www.fao.org/fishery/species/3445/en>
- Ferner MC, Smee DL, Chang YP (2005) Cannibalistic crabs respond to the scent of injured conspecifics: danger or dinner? *Mar Ecol Progr Ser* 300: 193–200.
- Flegel TW, Sritunyalucksana K (2011) Shrimp molecular responses to viral pathogens. *Mar Biotechnol* 13: 587–607.
- Flores IC, Vázquez R, Aguirre V, Orihuela A (2005) El comportamiento animal como escudo para evitar la enfermedad y remedio hacia la salud (algunas bases fisiológicas). *Avanc Invest Agropec* 9(3): 3–9.
- Frost AJ, Thomson JS, Smith C, Burton HC, Davis B, Watts PC, Sneddonad LU (2013) Environmental change alters personality in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Anim Behav* 85: 1199–1207.
- Fuentes-Breña AD (2010) Influencia de la estructura vegetal en la supervivencia de juveniles de *Panulirus argus* (Latreille, 1804) en la laguna arrecifal de Puerto Morelos, Quintana Roo, México. Tesis profesional, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México.
- Gardner MJ, Altman DG (1989) Calculating confidence interval for proportions and their differences. In: Gardner MJ, Altman DG (eds.), *Statistics with Confidence*. BMJ Publishing Group, London, pp. 28–33.
- Gerba CP, Schaiberger GE (1975) Effect of particulates on virus survival in seawater. *J Water Pollut Control Fed* 47:93–103.

- Gibello A, Blanco MM, Domínguez L, Fernández-Garayzábal JF (2001) Utilización de la PCR para el diagnóstico en ictiopatología. Revista AquaTIC, no. 15, Noviembre 2001. [<http://www.revistaaquatic.com/aquatic/art.asp?t=h&c=130>]
- Giraldes BW, Smyth DM (2016) Recognizing *Panulirus meripurpuratus* sp. nov. (Decapoda: Palinuridae) in Brazil—Systematic and biogeographic overview of *Panulirus* species in the Atlantic Ocean. Zootaxa 4107: 353–366.
- Gittens LG, Butler IV MJ (2018) The effect of casitas on *Panulirus argus* mortality, growth, and susceptibility to disease in the Bahamas. Bull Mar Sci 94: 995–1016.
- Godfrey SS, Bull CM, James R, Murray K (2009) Network structure and parasite transmission in a group living lizard, the gidgee skink, *Egernia stokesii*. Behav Ecol Sociobiol 63: 1045–1056.
- Goldstein JS, Matsuda H, Takenouchi T, Butler MJ (2008). The complete development of larval Caribbean spiny lobster *Panulirus argus* (Latreille, 1804) in culture. J Crust Biol 28: 306–327.
- Gomez DK, Sato J, Mushiake K, Isshiki T, Okinaka Y, Nakai T (2004) PCR-based detection of betanodaviruses from cultured and wild marine fish with no clinical signs. J Fish Dis 27: 603–608.
- Gómez de la Cámara A (1998) Caracterización de pruebas diagnósticas. Medicine 7(104): 4872–4877.
- Gómez del Prado-Rosas MC, Álvarez-Cadena JN, Lamothe-Argumedo R, Grano-Maldonado MI (2003) *Cymatocarpus solearis*, a brachycoeliid metacercaria parasitizing *Panulirus argus* (Crustacea: Decapoda) from the Mexican Caribbean Sea. An Inst Biol Univ Nal Autón Méx., Ser Zool 74: 1–10.
- Groner ML, Maynard J, Breyta R, Carnegie RB, Dobson A, Friedman CS, Froelich B, Garren M, Gulland FMD, Heron SF, Noble RT, Revie CW, Shields JD, Vanderstichel R, Weil E, Wyllie-Echeverria S, Harvell CD (2016) Managing marine disease emergencies in an era of rapid change. Phil Trans R Soc B 371:20150364.
- Gutzler BC, Butler IV MJ, Behringer DC (2015) Casitas: a location-dependent ecological trap for juvenile Caribbean spiny lobsters, *Panulirus argus*. ICES J Mar Sci 72 (Suppl. 1): i177–i184.
- Hart BL (1990) Behavioral adaptations to pathogens and parasites: five strategies. Neurosci Biobehav Rev 14: 273–294.
- Hart BL (1992) Behavioral adaptations to parasites: An ethological approach. J Parasitol 78:256–265

- Hart BL, Hart LA (2018) How mammals stay healthy in nature: the evolution of behaviours to avoid parasites and pathogens. *Phil Trans R Soc B* 73: 20170205.
- Harvell D, Aronson R, Baron N, Connell J, Dobson A, Ellner S, Gerber L, Kim K, Kuris A, McCallum H, Lafferty K, McKay B, Porter J, Pascual M, Smith G, Sutherland K, Ward J (2004) The rising tide of ocean diseases: unsolved problems and research priorities. *Front Ecol Environ* 2: 375–382.
- Hauton C (2011) The scope of the crustacean immune system for disease control. *J Invertebr Pathol* 110: 251–260.
- Herrera-Salvatierra N, Pascual-Jiménez C, Huchin-Mian JP, Lozano-Álvarez E, Montero-Muñoz J, Briones-Fourzán P, Rodríguez-Canul R (2019) Nutritional and immunological evaluation of juvenile spiny lobsters *Panulirus argus* (Latreille, 1804) (Decapoda: Achelata: Palinuridae) naturally infected with the PaV1 virus. *Journal of Crustacean Biology* 39: 162–171.
- Herrnkind WF (1980) Spiny lobsters: patterns of movement. In: Cobb JS, Phillips BF (eds), *The Biology and Management of Lobsters*, Vol 1. Academic Press, New York, pp. 349–407.
- Herrnkind WF, Butler MJ, Hunt JH, Childress MJ (1997) Role of physical refugia: implications from a mass sponge die-off in a lobster nursery in Florida. *Mar Freshw Res* 48: 759–769.
- Herrnkind WF, Butler MJ, Hunt JH (1999) A case for shelter replacement in a disturbed spiny lobster nursery in Florida: why basic research had to come first. *Am Fish Soc Symp* 22: 421–437.
- Hock K, Fefferman NH (2012) Social organization patterns can lower disease risk without associated disease avoidance or immunity. *Ecol Complexity* 12: 34–42.
- Holthuis LB (1991) Marine lobsters of the world: an annotated and illustrated catalogue of species of interest to fisheries known to date. *FAO Fish Synop No. 125*, Vol 13. FAO, Rome.
- Horner AJ, Nickles SP, Weissburg MJ, Derby CD (2006) Source and specificity of chemical cues mediating shelter preference of Caribbean spiny lobsters (*Panulirus argus*). *Biol Bull* 211: 128–139.
- Horner AJ, Weissburg MJ, Derby CD (2008). The olfactory pathway mediates sheltering behavior of Caribbean spiny lobsters, *Panulirus argus*, to conspecific urine signals. *J Comp Physiol A* 194: 243–253.

- Horth L, Gauthier D, Vogelbein W (2013) Heritable melanism and parasitic infection both result in black-spotted mosquitofish. *Southeast Nat* 12: 209–216.
- Howell DC (2002) *Statistical Methods for Psychology*, 5<sup>th</sup> ed. Duxbury, Pacific Grove, CA.
- Huchin-Mian JP (2013) Prevalencia de *Panulirus argus* Virus 1 (PaV1) en el Caribe Mexicano y evaluación del efecto patogénico, inmune y fisiológico en langostas *Panulirus argus*. Tesis Doctoral, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional-Mérida. Mérida, México.
- Huchin-Mian JP, Rodríguez-Canul R, Arias-Bañuelos E, Simá-Álvarez R, Pérez-Vega JA, Briones-Fourzán P, Lozano-Álvarez E (2008) Presence of *Panulirus argus* Virus 1 (PaV1) in juvenile spiny lobsters, *Panulirus argus*, from the Caribbean coast of Mexico. *Dis Aquat Org* 79: 153–156.
- Huchin-Mian JP, Briones-Fourzán P, Simá-Álvarez R, Cruz-Quintana Y, Pérez-Vega JA, 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 lobsters *Panulirus argus*. *Dis Aquat Org* 86: 159–162.
- Huchin-Mian JP, Rodríguez-Canul R, Briones-Fourzán P, Lozano-Álvarez E (2013) *Panulirus argus* virus 1 (PaV1) infection prevalence and risk factors in a Mexican lobster fishery employing casitas. *Dis Aquat Org* 107: 87–97.
- Instituto Nacional de Ecología (2000) Programa de Manejo del Parque Nacional Arrecife de Puerto Morelos. Instituto Nacional de Ecología/Comunidad de Puerto Morelos/Secretaría de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca, México.
- Jacobson RH (1998) Principles of validation of diagnostic assays for infectious diseases. In: *Diagnosis and Epidemiology of Animal Diseases in Latin America*. International Atomic Energy Agency, Vienna, pp. 15–23.
- Kasai H, Yoshimizu M, Ezura Y (2002) Disinfection of water for aquaculture. *Fish Sci* 68 (Suppl. 1): 821–824.
- Kenney AJ, Krebs CJ (2002) *EcoMeth 6.1: programs for ecological methodology*. Exeter Software, New York, NY.
- Kiryu Y, Behringer DC, Landsberg JH, Petty BD (2009) Microsporidiosis in the Caribbean spiny lobster *Panulirus argus* from southeast Florida, USA. *Dis Aquat Org* 84: 237–242.
- Kough AS, Paris CB, Behringer DC, Butler IV MJ (2015) Modelling the spread and connectivity of waterborne marine pathogens: the case of PaV1 in the Caribbean. *ICES J Mar Sci* 72 (Suppl 1): i139–i146.

- Krause J, Ruxton GD, Godin JGJ (1999) Distribution of *Crassiphiala bulboglossa*, a parasitic worm, in shoaling fish. *J Anim Ecol* 68: 27–33.
- Krekorian CO, Sommerville DC, Ford RF (1974). Laboratory study of behavioral interactions between the American lobster, *Homarus americanus* and the California spiny lobster, *Panulirus interruptus* with comparative observations on the rock crab, *Cancer antennarius*. *Fish Bull* 72:1146–1159.
- Krebs CJ (1989) *Ecological Methodology*. Harper Collins, New York.
- Lafferty KD (2017) Marine infectious disease ecology. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 48: 473–496.
- Lafferty KD, Porter JW, Ford SE (2004) Are diseases increasing in the ocean? *Annu Rev Ecol Evol Syst* 35: 31–54.
- Lalkhen AG, McCluskey A (2008) Clinical tests: sensitivity and specificity. *Contin Educ Anaesth Crit Care Pain* 8: 221–223.
- Lavallée J, Hammell L, Spangler E, Cawthorn R (2001) Estimated prevalence of *Aerococcus viridians* and *Anophyoides haemophila* in American lobsters *Homarus americanus* freshly captured in the waters of Prince Edward Island, Canada. *Dis Aquat Org* 46: 231–236.
- Li C, Shields JD, Small HJ, Reece KS, Hartwig CL, Cooper RA, Ratzlaff RE (2006) Detection of *Panulirus argus* Virus 1 (PaV1) in the Caribbean spiny lobster using fluorescence in situ hybridization (FISH). *Dis Aquat Org* 72: 185–192.
- Li C, Shields JD, Ratzlaff RE, Butler MJ (2008) Pathology and haematology of the Caribbean spiny lobster experimentally infected with *Panulirus argus* Virus 1 (PaV1). *Virus Res* 132: 104–113.
- Lightner DB (2011) Virus diseases of farmed shrimp in the Western Hemisphere (the Americas): A review. *J Invertebr Pathol* 106: 110–130.
- Lima SL, Dill LM (1990) Behavioral decisions made under the risk of predation: a review and prospectus. *Can J Zool* 68: 619–640.
- Lipcius RN, Herrnkind WF (1982) Molt cycle alterations in behavior, feeding, and diel rhythms of a decapod crustacean, the spiny lobster *Panulirus argus*. *Mar Biol* 68: 241–252.
- Lipcius RN, Eggleston DB (2000) Ecology and fishery biology of spiny lobsters. In: Phillips BF, Kittaka J (eds) *Spiny Lobsters: Fisheries and Culture*, 2<sup>nd</sup> ed. Fishing News Books, Oxford, pp. 1–41.

- Lipcius RN, Eggleston DB, Miller DL, Luhrs TC (1998) The habitat-survival function for Caribbean spiny lobster: an inverted size effect and non-linearity in mixed algal and seagrass habitats. *Mar Freshw Res* 49: 807–816.
- Loehle C (1995) Social barriers to pathogen transmission in wild animal populations. *Ecology* 76: 326–335.
- Lozano-Álvarez E (1995) Requisitos para la introducción de refugios artificiales en pesquerías de langosta. *Rev Cub Invest Pesq* 19(2): 21–26.
- Lozano-Alvarez E, Spanier E (1997) Behaviour and growth of captive spiny lobsters (*Panulirus argus*) under the risk of predation. *Mar Freshw Res* 48: 707–713.
- Lozano-Álvarez E, Briones-Fourzán P, González-Cano J (1991a) Pesca exploratoria de langostas con nasas en la plataforma continental del área de Puerto Morelos, Q.R., México. *An Inst Cienc Mar Limnol Univ Nal Autón México* 18(1):49–58.
- Lozano-Álvarez E, Briones-Fourzán P, Phillips BF (1991b) Fishery characteristics, growth and movements of the spiny lobster *Panulirus argus* (Latreille) in Bahía de la Ascensión, México. *Fish Bull* 89: 79–89.
- Lozano-Álvarez E, Briones-Fourzán P, Ramírez-Estévez A, Placencia-Sánchez D, Huchin-Mian JP, Rodríguez-Canul R (2008) Prevalence of *Panulirus argus* virus 1 (PaV1) and habitation patterns of healthy and diseased juvenile Caribbean spiny lobsters in shelter-limited habitats. *Dis Aquat Org* 80: 95–104.
- Lozano-Álvarez E, Meiners C, Briones-Fourzán P (2009) Ontogenetic habitat shifts affect performance of artificial shelters for Caribbean spiny lobsters. *Mar Ecol Prog Ser* 396: 85–97.
- Lozano-Álvarez E, Briones-Fourzán P, Huchin-Mian JP, Segura-García I, Ek-Huchim JP, Améndola-Pimenta M, Rodríguez-Canul R (2015) *Panulirus argus* virus 1 detected in oceanic postlarvae of Caribbean spiny lobster: implications for disease dispersal. *Dis Aquat Org* 117: 165–170.
- Lozano-Álvarez E, Cid-González LN, Candia-Zulbarán RI, Negrete-Soto F, Barradas-Ortiz C, Briones-Fourzán P (2018) Avoiding disease vs avoiding predation: testing the trade-off in *Panulirus argus*. *Bull Mar Sci* 94: 657–674.
- Lyle WG, MacDonald CD (1983) Molt stage determination in the Hawaiian spiny lobster *Panulirus marginatus*. *J Crust Biol* 3: 208–216.
- Martín-Moreno JM, Banegas JR (1997) Sobre la traducción del término inglés *odds ratio* como oportunidad relativa. *Salud Pública Méx* 39: 72–64.

- McCallum H, Harvell CD, Dobson A (2003) Rates of spread of marine pathogens. *Ecol Lett* 12: 1062–1067.
- McKean KA, Lazzaro BP (2011) The costs of immunity and the evolution of immunological defense mechanisms. In: Flatt T, Heyland A (eds) *Mechanisms of Life History Evolution: the Genetics and Physiology of Life History Traits and Trade-offs*. Oxford University Press, Oxford, pp. 299–310.
- Morado JF (2011) Protistan diseases of commercially important crabs: a review. *J Invertebr Pathol* 106:27–53.
- Montgomery-Fullerton MM, Cooper RA, Kauffman KM, Shields JD, Ratzlaff RE (2007) Detection of *Panulirus argus* Virus 1 in Caribbean spiny lobsters. *Dis Aquat Org* 76: 1–6.
- Moss J, Butler MJ IV, Behringer DC, Shields JD (2012) Genetic diversity of the Caribbean spiny lobster virus, *Panulirus argus* virus 1 (PaV1), and the discovery of PaV1 in lobster postlarvae. *Aquat Biol* 14:223–232.
- Moss J, Behringer D, Shields JD, Baeza A, Aguilar-Perera A, Bush PG, Dromer C, Herrera-Moreno A, Gittens L, Matthews TR, McCord MR, Schärer MT, Reynal L, Truelove N, Butler MJ (2013) Distribution, prevalence, and genetic analysis of *Panulirus argus* virus 1 (PaV1) from the Caribbean Sea. *Dis Aquat Org* 104: 129–140.
- Muldrew KL (2009) Molecular diagnostics of infectious diseases. *Curr Opin Pediatr* 21: 102–111.
- Nevitt G, Pentcheff ND, Lohmann KJ, Zimmer RK (2000) Den selection by the spiny lobster *Panulirus argus*: testing attraction to conspecific odors in the field. *Mar Ecol Prog Ser* 203: 225–231.
- Newcombe RG (1998) Two-side confidence intervals for the single proportion: Comparison of seven methods. *Stat Med* 17: 857–872.
- Nizinski MS (2007) Predation in subtropical soft-bottom systems: spiny lobsters and molluscs in Florida Bay. *Mar Ecol Prog Ser* 345: 185–197.
- Nunan LM, Poulos BT, Navarro S, Redman RM, Lightner DV (2010) Milky hemolymph syndrome (MHS) in spiny lobsters, penaeid shrimp and crabs. *Dis Aquat Org* 91:105–112.
- Orihuela A, Aguirre-Flores V, Vázquez-Rosales R, Betancourt-Alonso MA, Flores-Pérez FI (2011) Bases biológicas del comportamiento del animal enfermo. *Univ Cienc* 27(1): 113–119.

- OIE (2006) Validación y control de calidad de los métodos de reacción en cadena de la polimerasa utilizados para el diagnóstico de enfermedades infecciosas. En: Manual de pruebas de diagnóstico para los animales acuáticos. Organización Mundial de Sanidad Animal, Ciudad.
- OIE (2014) Principios y métodos de validación de las pruebas de diagnóstico de enfermedades infecciosas. En: Manual de pruebas de diagnóstico para los animales acuáticos. Organización Mundial de Sanidad Animal, Ciudad.
- Padilla-Ramos S, Briones-Fourzán P (1997) Características biológicas de las langostas (*Panulirus* spp.) provenientes de las capturas en Puerto Morelos, Quintana Roo, México. *Cienc Mar* 23: 175–193.
- Pascual-Jiménez C, Huchin-Mian JP, Simões N, Briones-Fourzán P, Lozano-Álvarez E, Sánchez-Arteaga A, Pérez-Vega JA, Simá-Álvarez R, Rosas-Vázquez C, Rodríguez-Canul R (2012) Physiological and immunological characterization of Caribbean spiny lobsters naturally infected with *Panulirus argus* Virus 1 (PaV1). *Dis Aquat Org* 100: 113–124.
- Peinado-Guevara LI, López-Meyer M (2006) Detailed monitoring of white spot syndrome virus (WSSV) in shrimp commercial ponds in Sinaloa, Mexico, by nested PCR. *Aquaculture* 251: 33–45.
- Pérez-Campos RA, Huchim-Lara O, Salas S, Liceaga-Correa M, Hernández-Núñez H, Pascual-Jiménez C, Rodríguez-Canul R (2016) Landscape analysis for PaV1 infection in lobsters *Panulirus argus* from the artisanal fishery of the eastern coast of Yucatan, Mexico. *Open J Mar Sci* 6: 386–394.
- Pestal GP, Taylor DM, Hoenig JM, Shields JD, Pickavance R (2003) Monitoring the prevalence of the parasitic dinoflagellate *Hematodinium* sp. in snow crabs *Chionoecetes opilio* from Conception Bay, Newfoundland. *Dis Aquat Org* 53: 67–75.
- Phillips BF, Melville-Smith R (2006) *Panulirus* species. In: Phillips BF (ed) *Lobsters: Biology, Management, Aquaculture and Fisheries*. Blackwell, Oxford, pp 359–384.
- Phillips BF, Melville-Smith R, Kay MC, Vega-Velázquez A (2013) *Panulirus* species. In: Phillips BF (Ed.) *Lobsters: Biology, Management, Aquaculture, and Fisheries*, 2nd Ed., Wiley-Blackwell, Oxford, pp. 289–325.
- Phillips BF, McWilliam PS (2009) Spiny lobster development: where does successful metamorphosis to the puerulus occur?: A review. *Rev Fish Biol Fish* 19: 193–215.

- Pinter-Wollman N, Jelic A, Wells NM (2018) The impact of the built environment on health behaviours and disease transmission in social systems. *Phil Trans R Soc B* 373: 20170245.
- Pita-Fernández S, Pértegas-Díaz S (2003) Pruebas diagnósticas: sensibilidad y especificidad. *Cad Aten Primaria* 10: 120–124.
- Porter L, Butler M, Reeves RH (2001) Normal bacterial flora of the spiny lobster *Panulirus argus* and its possible role in shell disease. *Mar Freshw Res* 52: 1401–1405.
- Prokop P, Fančovičová J (2013) Self-protection versus disease avoidance. The perceived physical condition is associated with fear of predators in humans. *J Individ Differ* 34: 15–23.
- Putt SNH, Shaw APM, Woods AJ, Tyler L, James AD (1988) Veterinary epidemiology and economics in Africa - A manual for use in the design and appraisal of livestock health policy. Univ of Reading, Reading, UK.
- Quinn GP, Keough MJ (2002) Experimental Design and Data Analysis for Biologists. Cambridge Univ Press, Cambridge.
- Ramírez-Estévez AE, Ríos-Lara GV, Lozano-Álvarez E, Briones-Fourzán P, Aguilar-Cardozo C, Escobedo GF, Figueroa-Paz F, Sosa-Mendicuti V, Martínez-Aguilar JD (2010) Estimación de crecimiento, movimientos y prevalencia de PaV1 en juveniles de langosta *Panulirus argus* en la Reserva de la Biósfera Banco Chinchorro (Quintana Roo, México) a partir de datos de marcado recaptura. *Cien Pesq* 18(1): 51–66.
- Ratchford SG, Eggleston DB (1998) Size- and scale-dependent chemical attraction contribute to an ontogenetic shift in sociality. *Anim Behav* 56: 1027–1034.
- Robalino J, Browdy CL, Prior S, Metz A, Parnell P, Gross P, Warr G (2004) Induction of antiviral immunity by double-stranded RNA in a marine invertebrate. *J Virol* 78: 10442–10448.
- Rodríguez-Martínez RE, Ruíz-Rentería F, van Tussenbroek B, Barba-Santos G, Escalante-Mancera E, Jordán-Garza G, Jordán-Dahlgren E (2010) Environmental state and tendencies of the Puerto Morelos CARICOMP site, Mexico. *Rev Biol Trop* 58 (Suppl 3): 23–43.
- Rosas C, Cooper EL, Pascual C, Brito R, Gelabert R, Moreno T, Miranda G, Sanchez A (2004) Indicators of physiological and immunological status of *Litopenaeus setiferus* wild populations (Crustacea, Penaeidae). *Mar Biol* 145: 401–413.

- Ruiz-Rentería F, van Tussenbroek BI, Jordán-Dahlgren E (1998) Puerto Morelos, Quintana Roo, México. In: Kjerve B (ed) CARICOMP–Caribbean coral reef, seagrass, and mangrove sites. UNESCO, Paris, pp. 56–66.
- Salas S, Cabrera MA, Zapata-Araujo C, Euan-Ávila JI, Maldonado-Repetto A (2007) ¿Son los refugios artificiales una opción para mejorar la pesquería de langosta? El caso de la pesquería en Yucatán. *Proc Gulf Carib Fish Inst* 60: 197–208.
- Sarabian C, Curtis V, McMullan R (2018) Evolution of pathogen and parasite avoidance behaviours. *Phil Trans R Soc B* 373: 20170256.
- Shabani S, Kamio M, Derby CD (2008) Spiny lobsters detect conspecific blood-borne alarm cues exclusively through olfactory sensilla. *J Exp Biol* 211: 2600–2608.
- Shabani S, Kamio M, Derby CD (2009) Spiny lobsters use urine-borne olfactory signaling and physical aggressive behaviors to influence social status of conspecifics. *J Exp Biol* 212: 2464–2474.
- Shields JD (2003) Research priorities for diseases of the blue crab *Callinectes sapidus*. *Bull Mar Sci* 72: 505–517.
- Shields JD (2011) Diseases of spiny lobsters: a review. *J Invertebr Pathol* 106: 79–91.
- Shields JD, Behringer DC (2004) A new pathogenic virus in the Caribbean spiny lobster *Panulirus argus* from the Florida Keys. *Dis Aquat Org* 59: 109–118.
- Shields JD, Stephens FJ, Jones B (2006) Pathogens, parasites and other symbionts. In: Phillips BF (ed) *Lobsters: Biology, Management, Aquaculture and Fisheries*. Blackwell, Oxford, pp 146–204.
- Simpson LA, Ambrosio LJ, Baeza JA (2017) A new species of *Carcinonemertes*, *Carcinonemertes conanobrieni* sp. nov. (Nemertea: Carcinonemertidae), an egg predator of the Caribbean spiny lobster, *Panulirus argus*. *PLoS ONE* 12(5): e0177021.
- Small HJ, Pagenkopp KM (2011) Reservoirs and alternate hosts for pathogens of commercially important crustaceans: a review. *J Invertebr Pathol* 106: 153–164.
- Small HJ, Stentiford GD, Behringer DC, Freeman MA, Atherley NAM, Reece KC, Bateman KS, Shields JD (2019) Characterization of microsporidian *Ameson herrnkindi* sp. nov. infecting Caribbean spiny lobsters *Panulirus argus*. *Dis Aquat Org* 136: 209–218.
- Smith KF, Acevedo-Whitehouse K, Pedersen AB (2009) The role of infectious diseases in biological conservation. *Anim Conserv* 12: 1–12.
- Söderhäll K, Cerenius L (1993) Crustacean immunity. *Annu Rev Fish Dis* 1992: 3–23.

- Sosa-Cordero E, Arce A, Aguilar-Dávila W, Ramírez-González A (1998) Artificial shelters for spiny lobster *Panulirus argus* (Latreille): an evaluation of occupancy in different benthic habitats. *J Exp Mar Biol Ecol* 229: 1–18.
- Subramaniam K, Behringer DC, Bojko J, Yutin N, Clark AS, Bateman KS, van Aarle R, Bass D, Kerr RC, Koonin EV, Stentiford GD, Waltzek tB (2020) A new family of DNA viruses causing disease in crustaceans from diverse aquatic biomes. *mBio* 11:e02938-19.
- Tobler M, Schlupp I (2008) Influence of black spot disease on shoaling behaviour in female western mosquito fish, *Gambusia affinis* (Poeciliidae, Teleostei). *Environ Biol Fish* 81: 29–34.
- Tybur JM, Çınar Ç, Karinen AK, Perone P (2018) Why do people vary in disgust? *Phil Trans R Soc B* 373: 20170204.
- van Tussenbroek BI (2011) Dynamics of seagrasses and associated algae in coral reef lagoons. *Hidrobiológica* 21: 293–310.
- van Tussenbroek BI, Barba-Santos MG, van Dijk JK, Sanabria-Alcaraz SNM, Téllez-Calderón ML (2008) Selective elimination of rooted plants from a tropical seagrass bed in a back-reef lagoon: a hypothesis tested by Hurricane Wilma (2005). *J Coast Res* 24: 278–281.
- Vázquez A, Sierra C, Juárez S, Agundis C, Zavala A, Zenteno E (1998) Mecanismos de inmunidad en crustáceos. *Interciencia* 23(6): 344-348.
- Warton DI, Hui FKC (2011) The arcsine is asinine: the analysis of proportions in ecology. *Ecology* 92: 3–10.
- Weiss HM, Lozano-Álvarez E, Briones-Fourzán P (2008) Circadian shelter occupancy patterns and predator-prey interactions of juvenile Caribbean spiny lobsters in a reef lagoon. *Mar Biol* 153: 953–963.
- Weiss HM, Lozano-Álvarez E, Briones-Fourzán P, Negrete-Soto F (2006) Using red lights with fixed-site video cameras to study the behavior of the spiny lobster, *Panulirus argus*, and associated animals at night and inside their shelters. *Mar Technol Soc J* 40(3): 86–95.
- White GC, Bennets RE (1996) Analysis of frequency count data using the negative binomial distribution. *Ecology* 77: 2549–2557.
- White GC, Eberhardt LE (1980) Statistical analysis of deer and elk pellet-group data. *J Wildl Managem* 44: 121–131.

- Wisenden BD, Goater B, James CT (2009) Behavioral defenses against parasites and pathogens. In: Zaccone G, Perriere C, Mathis A, Kapoor BG (Eds.) *Fish Defenses*, Vol. 2: Pathogens, Parasites and Predators, Science Publishers, Enfield, NH. pp. 151–168.
- Yao M, Rosenfeld J, Attridge S, Sidhu S, Aksenov V, Rollo CD (2009) The ancient chemistry of avoiding risks of predation and disease. *Evol Biol* 36: 267–281.
- Zimmer-Faust RK, Tyre JE, Case JF (1985) Chemical attraction causing aggregation in the spiny lobster, *Panulirus interruptus* (Randall), and its probable ecological significance. *Biol Bull* 169: 106–118.
- Zúñiga-Arellano B, Caballero-Ochoa AA, Conejero-Vargas CA, Cao-Romero CM, Solís-Marín FA, Elizalde-Mendez I, Cruz-Ruiz T, López-Luján L (2018) Estrellas de mar y cocodrilos en las ofrendas del Templo Mayor. Exposición fotográfica temporal en el tapial de la Zona Arqueológica del Templo Mayor, Ciudad de México, 2018-2019.

## ANEXO i

### **Detección de infección viral *Panulirus argus* Virus 1 (PaV1) en juveniles de langosta espinosa del Caribe *Panulirus argus***

#### **Colecta de organismos**

Mediante buceo SCUBA y libre con ayuda de redes manuales, se capturaron langostas juveniles con y sin signos clínicos de infección por PaV1, provenientes de la laguna arrecifal de Puerto Morelos, en lugares alejados a los sitios experimentales. Las langostas fueron mantenidas para su aclimatación en estanques separados con flujo continuo de agua de mar provistos de refugios suficientes, y alimentadas diariamente con mezcla de mariscos congelados.

#### **Toma de muestras de hemolinfa**

A cada langosta se le extrajo ~ 200-300  $\mu\text{L}$  de hemolinfa (dependiendo de la talla de las langostas) con una jeringa para insulina estéril, a través de la membrana artrodial de la base del quinto par de pereiópodos. El sitio de extracción fue previamente desinfectado con etanol al 70%. Cada muestra de hemolinfa se fijó en etanol al 96% (~ 200  $\mu\text{L}$ ) previamente vertido en tubos Eppendorf estériles de 1.5 ml etiquetados individualmente. Luego se marcó a cada langosta con una pequeña placa de plástico con el mismo número de la muestra de hemolinfa para su posterior identificación. La placa fue adherida a la zona más plana del cefalotórax con pegamento líquido instantáneo. Las muestras que no se analizan de inmediato se conservan en congelación a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

**Protocolo de extracción de ADN de hemolinfa de *Panulirus argus* por el método STE  
(Sodium acetate-Tris-EDTA)**

STE: (Sodium acetate-Tris-EDTA)

Tris-HCl: hidrocloreuro de tris (hidroximetil) aminometano

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

1. Centrifugar a 13000 rpm durante 2 minutos para obtener el precipitado celular de cada muestra de hemolinfa fijada en alcohol.
2. Tomar una muestra de este precipitado celular (~20g) y colocarla en un nuevo tubo Eppendorf estéril de 1.5 ml, previamente etiquetado.
3. Agregar 600  $\mu$ L de solución STE y con ayuda de la punta de micropipeteo, resuspender las células y solubilizar la muestra.
4. Agregar 20  $\mu$ L de Proteinasa K.
5. Agitar vigorosamente con ayuda del vortex durante 20 segundos.
6. Incubar en baño seco a 55°C durante toda la noche (o 12 horas) y agitar con el vortex frecuentemente durante la incubación.
7. Terminada la incubación, agregar 200  $\mu$ L de Acetato de Sodio 3M, pH 5.2 (solución precipitadora de proteínas)
8. Agitar vigorosamente con ayuda del vortex durante 20 segundos.
9. Incubar a 0° C en escarcha de hielo durante 10 minutos.
10. Centrifugar a 13000 rpm durante 5 minutos para precipitar las proteínas.
11. Recuperar 600  $\mu$ L del sobrenadante que es donde estará contenido el ADN
12. Agregar 600  $\mu$ L de Isopropanol frío. Agitar por inversión suavemente por un máximo de cuatro veces para unir las cadenas de ADN.
13. Conservar en congelación a -20° C durante toda la noche

14. Centrifugar a 13000 rpm durante 10 minutos para precipitar el ADN y formar un *pellet*.
15. Decantar el sobrenadante de un solo golpe teniendo cuidado de no arrastrar el *pellet*.
16. Lavar Agregar 600  $\mu\text{L}$  de Etanol al 70% frío.
17. Agitar por inversión suavemente varias veces para lavar bien el ADN.
18. Centrifugar a 13000 rpm durante 5 minutos.
19. Con micro pipeta, retirar el sobrenadante lo más que se pueda, teniendo cuidado de no tocar el *pellet* con la punta.
20. Agregar 50  $\mu\text{L}$  de solución de rehidratación TE (Tris –EDTA).
21. Resuspender el ADN por pipeteo y solubilizar con la misma solución de rehidratación.
22. Conservar en congelación a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### **Caracterización electroforética de ADN**

Para poder visualizar si se hizo bien la extracción, es decir, que el ADN esté purificado, se corre una alícuota de ADN resuspendido mediante electroforesis en gel de agarosa 1%.

1. Se toma una alícuota de 7  $\mu\text{L}$  del ADN resuspendido.
2. Se agregan 3  $\mu\text{L}$  de búfer de carga 5x *Green GoTaq Flexi buffer*, cuya función es proporcionar densidad a la muestra y permitir que se deposite bien en el fondo del pocillo del gel, además de estar compuesto por dos capas de color que migran de acuerdo a la densidad de los fragmentos de ADN. La capa azul migra con el fragmento de 3-5 pb de ADN y la amarilla con el fragmento de 50 pb de ADN.

3. Se inyecta cada muestra (10  $\mu\text{L}$ ) en cada pocillo premoldeado del gel de agarosa 1% teñido con Bromuro de Etidio 0.1%.
4. Se llena la cámara electroforética con *Buffer* TAE 1x.
5. Se aplica una corriente de 90 V de negativo a positivo por 20 minutos o hasta que el colorante amarillo llegue a la mitad del gel.
6. Se visualizan las bandas fluorescentes de DNA, mediante el uso de un transiluminador de radiación UV.

### Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR por sus siglas en inglés)

Para detectar la presencia del virus PaV1, se utilizan cebadores (*primers*) específicos para PaV1, 45aF (TTC CAG CCC AGG TAC GTA TC) y 543aR (AAC AGA TTT TCC AGC GT) para amplificar un fragmento de 499 pb de ADN viral (Montgomery-Fullerton et al. 2007)

1. Para cada muestra se prepara una reacción de PCR que será de un volumen final de 25  $\mu\text{L}$  (volumen de reacción estandarizado por Huchin-Mian et al., 2013), de los cuales:

Reactivos	Volumen 1X ( $\mu\text{L}$ )
<i>5x Green GoTaq Flexi buffer</i>	3
MgCl <sub>2</sub>	2.5
Mezcla de DNTPs	1
<i>Primer Forward</i>	1
<i>Primer Reverse</i>	1
Taq ADN Polimerasa	0.15

H <sub>2</sub> O	15
ADN	1
Volumen final	25

- Se prepara una mezcla de reacción madre con el volumen total de todas las reacciones a trabajar, incluyendo los controles negativo y positivo.
- En tubos para PCR estériles y etiquetados, se coloca 1  $\mu$ L de ADN de cada muestra. En todos los casos se utiliza H<sub>2</sub>O ultra pura como control negativo y ADN de una langosta severamente infectada de PaV1 como control positivo (Huchin-Mian et al. 2008).
- A cada tubo se agregan 24  $\mu$ L de solución madre de reacción de PCR para completar los 25  $\mu$ L de volumen de reacción.
- La amplificación por PCR se lleva a cabo en un termociclador en las siguientes condiciones (Huchin-Mian et al. 2009):

Paso	T °C	Tiempo	Ciclos
Inicial	94 °C	10 min	1
Desnaturalización	94 °C	30 sec	30
Alineamiento	63 °C	30 sec	
Extensión	72 °C	1 m min	
Extensión final	72 °C	10 m	1
Mantenimiento	10 °C	10 min	1

- Los productos de PCR se caracterizan electroforéticamente en un gel de Agarosa al 2% teñido con Bromuro de Etidio 0.1%.

7. Las bandas fluorescentes positivas se visualizan en un transiluminador de radiación UV.

## ANEXO II

Número de langostas por sitio sin/con casitas durante la Etapa 1 (10 censos) y la Etapa 2 (8 censos). Las celdas con menos de 5 individuos (cantidad mínima para estimar prevalencias; Putt et al. 1988) aparecen resaltadas en color gris.

REVISIÓN	ETAPA 1										ETAPA 2								
	Nov 09	Mar 10	Jun 10	Sep 10	Dic 10	Mar 11	May 11	Sep 11	Ene 12	Abr 12	Sep 12	Ene 13	May 13	Sep 13	Feb 14	Jun 14	Sep 14	Ene 15	
SITIO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	2	3	4	5	6	7	8	
<b>Sin casitas</b>	1	4	1	0	7	11	4	3	3	11	4	4	3	4	5	1	0	9	1
	2	11	19	3	8	2	5	8	6	4	2	0	8	3	15	2	9	8	0
	3	33	23	12	15	10	6	7	14	15	15	5	3	11	2	4	4	1	4
	4	7	10	13	16	6	7	9	13	23	22	10	0	6	29	2	21	15	3
	5	6	1	0	3	3	5	2	2	1	0	0	1	0	0	0	0	0	6
<b>Con casitas</b>	1	321	139	40	67	137	57	35	69	89	78	97	83	70	111	21	36	39	26
	2	146	79	19	27	19	30	19	35	39	34	30	40	13	44	56	40	51	25
	3	140	120	57	83	51	26	37	32	77	72	44	48	15	74	72	40	72	45
	4	177	131	35	76	52	25	41	96	78	56	33	76	25	79	41	38	37	31
	5	162	74	26	72	59	53	45	53	65	66	30	37	32	107	89	64	54	33