



ACOMODACION ACTIVA VIRAL: NUEVO CONCEPTO SOBRE LA RESPUESTA DE LOS CRUSTACEOS A PATOGENOS VIRALES

T. W. Flegel - Departamento de Biotecnología, Universidad Mahidol (Bangkok-Tailandia)
T. Pasharawipas - Departamento de Microbiología, Universidad Rangsit (Pathumthani-Tailandia)

INTRODUCCION

En 1988, en un seminario sobre enfermedades del camarón, un médico se refirió al curioso hecho de que no había respuesta inflamatoria en ninguna de las diapositivas que presentamos mostrando tejidos de camarón con infección viral (Fig. 1).

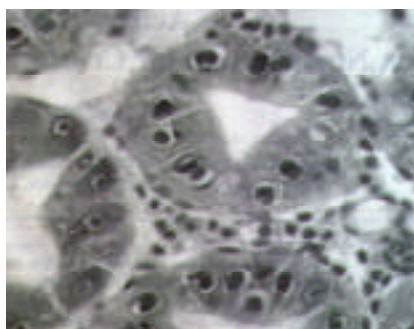


Figura 1. Células de hepatopáncreas infectadas con Hepatopancreatic Parvovirus (HPV). No hay una reacción inflamatoria.

Esto contrastaba ampliamente con las diapositivas de infecciones bacterianas y las respuestas a las toxinas (Fig. 2), las cuales se caracterizan por la agregación



Figura 2. Hepatopáncreas septicémico. Bacterias *Vibrio sp.* han colonizado los túbulos. Existe una gran reacción inflamatoria alrededor de los túbulos.

hemocítica masiva, a menudo encaminada hacia la encapsulación y formación de granulomas. El médico comentó que esto difería de su experiencia general con mamíferos y pidió una explicación. Ninguno pudo darla. Comprensiblemente, esos fueron los primeros días de la industria del camarón en Tailandia, y el conocimiento del mecanismo de defensa del camarón era (y todavía es) relativamente pobre. Aún así, la pregunta ha quedado sin respuesta durante los últimos 10 años.

Sin embargo, la experiencia con epizooticos virales recientes en camarones cultivados nos ha llevado a la conclusión sorprendente de que los crustáceos pueden acomodar activamente patógenos virales.

La manera en que llegamos a esta conclusión, se encuentra resumida en el presente artículo.

Básicamente, fue inspirado por incidentes en los cuales los camarones cultivados adquirían rápidamente lo que inicialmente llamamos tolerancia a las primeras infecciones virales letales. Nuestra descripción inicial de estas infecciones como "infecciones latentes" fue inapropiada, porque se refería a que los virus eran de alguna manera temporalmente inactivos. Sin embargo, ese no era el caso, los virus estaban en el proceso de replicación activa.

La situación del camarón es fundamentalmente diferente de la de los vertebrados. En estos últimos la resistencia adquirida involucra reacciones a antígenos/anticuerpos y

normalmente resulta en patógenos que son liberados del hospedador. Además, las infecciones virales latentes de los vertebrados se encuentran usualmente en reposo, y las infecciones crónicas a largo plazo (infecciones activas y persistentes) son más la excepción que la regla. Por el contrario, las infecciones persistentes, activas pero inocuas, parecen ser más la regla que la excepción en crustáceos, y nosotros eventualmente concluimos que esta predominancia de infecciones persistentes podría ser la manifestación de un mecanismo general de los crustáceos para la acomodación de patógenos virales.

"TOLERANCIA" ADQUIRIDA A LAS INFECCIONES VIRALES.

En 1989, encontramos un gran número de cuerpos de oclusión poliédricos de *Baculovirus monodon* (MBV) en el hepatopáncreas de post larvas *Penaeus monodon*. Pronto descubrimos que la producción en las camarónicas no se afectaba negativamente si las condiciones de cultivo eran las adecuadas, a pesar de que nuestros laboratorios se encontraban todos infectados con el MBV.

En efecto, las larvas de camarón con muy serias infecciones de MBV (i.e., grandes números de células infectadas con muchos cuerpos de oclusión y viriones) no presentaban inflamación, eran activas, aparentemente saludables y crecían normalmente.

Visitamos Taiwan a comienzos de 1990 y encontramos que el MBV era común



Artículos

en la postlarva de *P. monodon*. Asumimos que los taiwaneses no habían identificado el MBV como la causa del desastre de su industria camaronera en 1988.

Entre 1992 y 1994, la Dra. Joan Vickers nos manifestó su sorpresa de que las larvas en Tailandia no estuvieran tan afectadas por un virus (MBV), considerado un patógeno tan severo en los laboratorios de larvas Australianos. Asumimos que esta diferencia radicaría en grados de virulencia asociados con cepas de MBV de diferente origen geográfico.

Nuestro trabajo sobre MBV en Tailandia fue interrumpido por la necesidad de enfocar nuestra atención en el virus de la Cabeza Amarilla o Yellow-Head (YHV).

En 1994, mientras preparábamos muestras de YHV positivas y negativas para trabajar en una sonda de diagnóstico de cADN, tropezamos con el hecho de que los estanques de “control negativo” que habíamos muestreado estaban realmente poblados por altos porcentajes de camarones con infecciones de YHV inocuas. Comprobamos que tal situación era generalizada en las granjas de producción. En aproximadamente 1.5 años de la aparición catastrófica del YHV en el sur de Tailandia, la mayoría de camaroneros estaban obteniendo buenas cosechas a pesar de la presencia de YHV en sus estanques.

Intentando explicar la alta y repentina incidencia de infecciones de YHV inocuas consideramos las posibilidades obvias del camarón resistente y la virulencia reducida de YHV. No teníamos argumento para la resistencia adquirida, porque los crustáceos no tienen anticuerpos. El argumento para una resistencia producto de una selección genética natural era también débil, debido a que una generación de camarones empleando reproductores silvestres toma aproximadamente 2 años. Tampoco hubo ninguna

evidencia de capturas (pesquería) reducidas que apuntaran a un epizootico catastrófico en la población de camarón silvestre. A pesar de estos factores, el camarón de cada estanque respondía en unísono a la presencia del virus o sucumbiendo con una mortalidad casi total, (infecciones letales), o dando una buena cosecha, (infecciones inocuas). Además, parecía que la respuesta del camarón infectado en un estanque dependía de un aspecto(s) compartido desconocido que había adquirido, en algún momento, durante su desarrollo.

Al considerar la posible aparición de una forma menos virulenta de YHV, tuvimos dificultad concibiendo un mecanismo de selección razonable. Los argumentos de selección fueron debilitados por muchas de las prácticas de manejo descritas anteriormente, por la carencia de evidencia para un pan-epizootico en camarones silvestres y por la relativamente rápida aparición del fenómeno en una zona geográfica amplia. Un epizootico YHV que apareció en la costa sureste del Golfo de Tailandia en 1990 se disipó aproximadamente 1.5 años después de su primera aparición catastrófica. A pesar de su disipación, el YHV subsecuentemente se esparció, como un agente extremadamente virulento, a regiones camaroneras hacia el norte y luego hacia el sur dentro de la costa oeste del Golfo hasta que alcanzó la punta sur en 1992. Cada brote regional estaba caracterizado por un período inicial de mortalidad catastrófica seguida por una atenuación.

Al no encontrar una explicación racional sobre lo que estaba ocurriendo, propusimos que el camarón tenía un “mecanismo de reconocimiento” específico, por medio del cual podían adquirir una “tolerancia” al nuevo patógeno viral durante su desarrollo larval. Lo llamamos la “teoría de la tolerancia”, y propusimos que la adquisición de la

tolerancia, para un virus en particular, conduciría a una predominancia de las infecciones inocuas sobre las letales. De acuerdo con la hipótesis, la adquisición de la tolerancia involucra un paso de aglutinamiento viral inicial que conduce a una memoria específica, requerida para el desarrollo subsiguiente de infecciones inocuas. También acorde con la hipótesis, el aglutinamiento viral inicial es independiente de la infección viral y puede aparecer en ausencia de la infección. La adquisición de la tolerancia para cada virus sería específica y no extendible a otros virus (i.e., no había evidencia para tolerancia cruzada). Por ejemplo, los camarones tailandeses eran tolerantes a MBV, pero esta tolerancia no se extendió al YHV cuando este hizo su primera aparición. Si el concepto de la tolerancia es el correcto, abría la posibilidad de desarrollar “tolerinas” que pueden ser usadas de la misma manera que las vacunas. Estos reactivos ayudarían a los camaroneros a evitar mortalidades catastróficas causadas por infecciones virales.

No conocemos el estadio más apropiado para la administración de la tolerina. Sin embargo, puede ser que la exposición inicial en el primer estadio de zoea sea el más apropiado. En este estadio el *P. monodon* comienza a producir hemocitos y asumimos que el desarrollo de la tolerancia involucra procesos relacionados a un auto o no-auto reconocimiento. Tampoco sabemos si se requieren refuerzos para mantener un estado tolerante en periodos muy largos en ausencia de infección.

Usando la hipótesis, explicamos la situación del YHV en Tailandia de la siguiente manera: razonamos que el YHV primero llegó a Tailandia de una fuente externa o como una mutación nueva de un virus previo inocuo. Este nuevo virus golpeó a la población “novata” de camarones cultivados como una tormenta, causando dispersión y



mortalidad catastrófica. Sin embargo, durante este explosivo intervalo, el virus se dispersó ampliamente en el ambiente camaronero, ya que la mayoría de los lotes de larvas de los laboratorios estuvieron expuestos a éste durante los primeros estadios de desarrollo (talvez cuando sus defensas estaban distinguiendo su identidad de su no-identidad). Más tarde se demostró que los primeros estadios larvales eran refractarios a la infección del YHV, pero razonamos que todavía tenían aglutinado el virus y habían adquirido la memoria necesaria para desarrollar infecciones inocuas durante una posterior exposición. Según este razonamiento, el primer epizootico de YHV apareció en la costa sureste del Golfo de Tailandia y luego se dispersó desde allí a las poblaciones “novatas” en otras zonas geográficas. Cada introducción comenzó catastrófica pero se atenuó rápidamente. Es un enigma el periodo de atenuación, que se considera de aproximadamente 1.5 años. Después de este periodo se observó un declive gradual del número de brotes, al punto de que los camarones no volvieron a considerar el problema como “muy serio”.

El concepto predijo que cualquier epizootico viral severo de camarón llevaría a la tolerancia aproximadamente dos años después del brote. También ofrece una explicación para la historia de las infecciones de MBV en varias zonas. En Tailandia, se podría argumentar que el MBV se encontraba en todas partes y que las larvas se expusieron e infectaron rápidamente en los laboratorios. Además, casi todos los camarones serían tolerantes y el virus sería inocuo en ellos. En Taiwan, es posible que el MBV haya llegado en 1987 causando una mortalidad catastrófica a la población “novata” de camarones, que posteriormente se volvieron tolerantes cuando el virus se dispersó, como sucedió en Tailandia. En Australia, parece que el MBV raramente es

encontrado en los laboratorios que se encuentran dispersos geográficamente, así los camarones expuestos son usualmente “novatos” y los brotes son desastrosos. El concepto podría también ser aplicado para explicar lo sucedido con los stocks de *P. monodon* que aparecieron en Tahití con aparente “resistencia” al virus infeccioso de necrosis hipodermal y hematopoiética (IHHNV). Se podría argumentar que los cultivos continuos de *P. stylirostris* en presencia de IHHNV llevaron al desarrollo de la tolerancia, y que el camarón eventualmente se volvió inocuamente infectado. En efecto, cuando posteriormente estos stocks fueron mezclados con *P. stylirostris* “novatos”, el camarón novato murió de infecciones severas de IHHNV, indicando que el camarón “resistente” era realmente portador de un virus que era todavía tan virulento como siempre.

CONTROL DE LA APOPTOSIS: UN MECANISMO PARA LA TOLERANCIA

El concepto de la tolerancia fue desarrollado para explicar observaciones de campo con YHV, de una manera que pareció ser consistente

tolerancia pudiera surgir en el camarón es problemático. En retrospectiva, es desafortunado que usáramos la palabra “tolerancia” para describir este fenómeno, porque invitó a la comparación con un fenómeno inmunológico en vertebrados que es también descrito como “tolerancia”. En efecto, existe poco, si es que hubiera algo, en las dos situaciones que pueda ser comparado. En el caso de la “tolerancia de los mamíferos”, la muerte a veces ocurre como resultado de las reacciones de defensa inmunes del hospedador. Por el contrario, la muerte en los crustáceos resultó en la ausencia de reacciones de defensa. Además, no teníamos mecanismos razonables para explicar como los camarones “novatos” morirían a causa de un virus mientras los tolerantes no. La inspiración vino durante la llegada del siguiente epizootico viral serio en Tailandia.

El epizootico del virus de la Mancha Blanca (WSSV) en Tailandia llegó poco después que el de YHV y causó incluso pérdidas más serias para los camarones.

Pronto se volvió notorio que WSSV era capaz de infectar un gran número de crustáceos diferentes, incluyendo todos los camarones peneidos cultivados y muchas especies diferentes de cangrejos y langostas. Era sorprendente descubrir que muchas de las especies “portadoras” como los cangrejos tenían infecciones virales activas con muchas células infectadas y gran número de viriones pero no demostraban mortalidad (i.e. tenían infecciones inocuas, activas). En retrospectiva, esto era verdad para algunos portadores del YHV. Obviamente, una producción viral alta, por sí

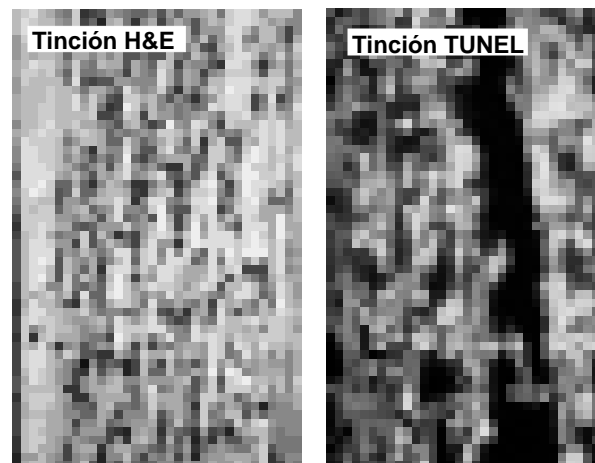


Figura 3. Tejido nervioso infectado con YHV. Los núcleos esféricos son los infectados y corresponden a los núcleos que muestran apoptosis.

para experimentar también con MBV y IHHNV. Sin embargo, encontrar un mecanismo racional por el cual la



misma, no garantizó la muerte. Esto nos llevó a la pregunta si el camarón moribundo podría no estar muriendo de una muerte celular generalizada programada (apoptosis), provocada por

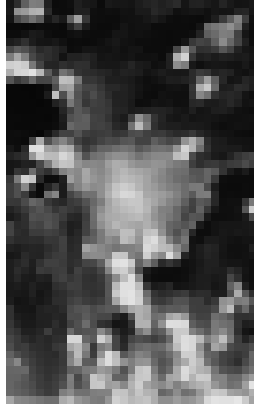


Figura 4. Tejido conectivo infectado con WSSV. La apoptosis es masiva.

una infección viral. La apoptosis, en cambio, nos dió un mecanismo operacional potencial para nuestro concepto de tolerancia. Simplemente, el camarón y probablemente otros crustáceos, morirían de infecciones virales sólo si estas infecciones inducían el mecanismo celular innato de apoptosis. Podíamos entonces proponer que la tolerancia se desarrollaba en situaciones en las que un paso de aglutinamiento viral prematuro daba como resultado una memoria específica que suprimía la apoptosis en infecciones virales subsiguientes o concurrentes.

Para cumplir con nuestro concepto, el sistema de aglutinamiento prematuro tendría que ser capaz de tener una memoria específica para una amplia variedad de proteínas virales siempre cambiantes. Así, probablemente sería complejo y sofisticado; tal vez no menos que el sistema de respuesta variable de anticuerpos en vertebrados. También, estaría basado ampliamente en una membrana lo que reduce o elimina el rol de los factores humorales (como anticuerpos). Tal vez esa es la razón por la que los anticuerpos no han sido

encontrados en crustáceos e insectos. Los complejos sistemas de reconocimiento basados en membranas, que incluyen moléculas evolutivamente relacionadas a los anticuerpos, son encontradas en las plantas.

La idea del involucramiento de la apoptosis es atractiva, especialmente porque se conoce que la inhibición de los genes de la apoptosis (IAP) ocurre en el grupo de los baculovirus. Es significativo que la existencia de estos genes virales pruebe que las células de los insectos puedan responder a infecciones virales iniciando la apoptosis, al menos bajo algunas circunstancias.

Además, la complejidad de la ruta apoptótica ayudaría a explicar los fenómenos que aparecen asociados con enfermedades virales del camarón. Por ejemplo, sabemos que las infecciones del MBV en Tailandia son inocuas en su mayoría, pero pueden convertirse en fatales si los camarones son sometidos a mucho estrés. También tenemos información no publicada de que las infecciones inocuas de YHV y WSSV pueden ser transformadas en infecciones letales si se aplican niveles suficientes de estrés. En algunos casos el tipo de estrés es importante. Por ejemplo, las infecciones letales de YHV pueden ser inducidas en camarones infectados inocuamente por bajos niveles de oxígeno disuelto o un cambio repentino de pH, pero no por un shock de salinidad. Estos fenómenos indican que el grado de protección contra la muerte ofrecida por la tolerancia tiene límites y que el camarón con infecciones inocuas todavía tiene riesgos. También son consistentes con el hecho de que la ruta apoptótica es compleja, involucrando algunas rutas de inducción o supresión.

A pesar de que la apoptosis es un proceso clave en el desarrollo de órganos y tejidos para organismos

multicelulares, esto debe haber sido un desarrollo secundario en la evolución. Si la apoptosis primero surgió en los organismos unicelulares, debe haber tenido ventajas en la limitación de la dispersión de patógenos en una población. Sin embargo, una vez que fue reclutada para la diferenciación en los organismos multicelulares, su rol en la defensa tuvo que ser substancialmente modificado. En efecto, puede ser ventajoso o perjudicial para un hospedador vertebrado durante la interacción con patógenos. En nuestro modelo, la apoptosis viral inducida está ampliamente dispersa, los crustáceos silvestres serían ventajosos para la población de crustáceos y desventajosos para la cepa viral inducida. Partiendo de esto, se podría interpretar que los crustáceos usan la apoptosis para defenderse contra los virus y que los virus desarrollan genes IAP para vencer este mecanismo de defensa del hospedador. Ese es seguramente el punto de vista tradicional, pero ahora creemos que no es el correcto. Incluso así, en una población dispersa y silvestre, un huésped que muere enseguida es improbable que disperse mucho un patógeno. En el sistema de cultivo de camarón, por el contrario, los animales son sembrados a altas densidades no naturales en todos los estadios, y las cepas virales altamente virulentas pueden dispersarse rápidamente. Una ventaja para la población de camarón silvestre es una desventaja para el camaronero.

RESISTENCIA NO VIRAL: UNA ALTERNATIVA EVOLUCIONARIA.

En un intento por racionalizar los fenómenos de acomodación a la sobrevivencia de los crustáceos, hemos llegado a la conclusión de que puede ser la manifestación de una respuesta distinta a los patógenos virales, que han surgido en la línea evolucionaria de los crustáceos (y tal vez de los artrópodos). Parece estar caracterizado más por la



acomodación activa que por la resistencia viral. Esto es fundamentalmente diferente de la respuesta de resistencia que se ha desarrollado en la línea de los vertebrados, e incluso de la respuesta de los mismos crustáceos a los patógenos bacteriales y de hongos. Toda la evidencia indica que la respuesta de los crustáceos a las bacterias y los hongos está basada en la resistencia celular activa similar a la que ocurre en los vertebrados. En una inspección más cercana, una respuesta de la acomodación viral puede ofrecer algunas ventajas al hospedador viral, en relación a la limitación del desarrollo de la virulencia patógena. La selección para una mayor virulencia requiere la presión sobre la resistencia del hospedador. Removiendo esa presión debe retardarse su desarrollo.

Imaginemos una población de crustáceos enfrentando un nuevo patógeno viral o un nuevo mutante virulento, pero armado con la capacidad de la acomodación. La primera aparición del virus podría causar una mortalidad propagada. Sin embargo, la presencia de grandes cantidades del virus en el ambiente rápidamente llevarían a la exposición de estadios jóvenes en desarrollo cuyas células lo captarían y lo recordarán. Entonces, las infecciones inocuas propagadas se desarrollarían y la incidencia de mortalidad masiva decrecería. Al mismo tiempo, no habría presión en la población del virus para la selección de mutantes con virulencia más alta. En efecto, los mutantes con virulencia incrementada realmente estarían en desventaja con la cepa existente, ya que tenderían a limitar su propia dispersión porque causarían mortalidad. La situación entraría a una fase nueva y de larga duración de adaptación selectiva hospedador/virus durante la cual las variaciones genéticas en el hospedador y el virus se favorecerían si resultaran en una mejor acomodación mutua (i.e., la reducción de cualquier efecto

negativo de la infección en el crecimiento y la reproducción, especialmente cuando están expuestos a varios factores de estrés). Todo esto ocurriría sin la presión de resistencia en el patógeno. Con el tiempo, el hospedador y el patógeno alcanzarían un punto de casi total compatibilidad. Tal vez la homología de secuencia entre los genes del baculovirus IAP y los genes del hospedador es una indicación de algunos aspectos de esta interacción mutua. Existe alguna evidencia de que un alto grado de compatibilidad ya ha sido logrado con los virus del camarón, como el MBV para *P. monodon* en Tailandia.

El *Penaeus monodon* en Tailandia parece tener incluso un grado más alto de compatibilidad con el IHHNV que con el MBV. Lightner argumenta, convincentemente, que el IHHNV es endémico en el *P. monodon* y que fue importado del hemisferio occidental con stocks experimentales vivos que no fueron sometidos a cuarentena correctamente. Posteriormente infectaron los *P. stylirostris* con consecuencias devastadoras. A pesar de la naturaleza endémica del IHHNV en *P. monodon*, nunca ha sido reportado como la causa de la mortalidad propagada en los estanques de camarones en Tailandia. En efecto, en una ocasión cuando encontramos claras lesiones sólo en la glándula antenal, el camarón era normal y parecía no sufrir efectos nocivos. Sin embargo, con un examen por medio de hibridación in situ con una sonda de diagnóstico de ADN, se encontró que estos camarones tenían infecciones muy fuertes de IHHNV y en muchos más tejidos de lo que parecían por las pocas lesiones visualmente aparentes. Obviamente estos camarones fueron capaces de tolerar un alto nivel de producción viral sin efectos nocivos.

No es posible, ni es nuestra intención aquí comparar los méritos evolucionarios de la acomodación viral versus la resistencia. Los consideramos

como desarrollos alternativos de un origen común, tal como los ampliamente diferentes aparatos ópticos que en las diferentes líneas de animales se han desarrollado probablemente de un sistema fotoreceptor ancestral común. No sería sabio sugerir que un desarrollo existente es "mejor" o "más primitivo" que el otro. Por las mismas razones, no podemos especular por qué una respuesta dividida a los patógenos podría haber surgido en los crustáceos. Además, cualquier especulación evolucionaria tendría que tomar en cuenta que la interacción camarón/virus que tiene lugar en el medio natural es radicalmente diferente de la que tiene lugar en los sistemas de cultivo.

En conclusión, nuestra hipótesis es que la tolerancia a las infecciones virales en los crustáceos es la manifestación de un sistema activo para la acomodación que está basado en un aglutinamiento de membranas involucrando memoria específica, que lleva a la supresión de la apoptosis viral provocada y a infecciones inocuas y persistentes. Esta teoría puede ser probada fácilmente. Predice que los camarones (otros crustáceos y tal vez otros artrópodos también) mostrarán evidencia de una apoptosis extensiva cuando estén muriendo de infecciones virales. También predice que la exposición de estadios larvales jóvenes a partículas virales inactivadas o subunidades de proteínas virales ("tolerinas" como oposición a las vacunas), seguida de desafíos posteriores con virus activos, resultarían más en infecciones inocuas que en mortalidad. Esto podría ser de gran importancia para los camaroneros. Casi todas las pérdidas masivas sufridas por los camaroneros en el mundo en la década anterior han surgido de epizootias virales. Otros patógenos son tratables con manejo apropiado o terapia. Cualquier vía de trabajo con potencial para resolver los problemas virales debería buscarse ansiosamente. 