

Formación de esferoides en camarones penaeidos: Implicaciones patológicas y valor diagnóstico

Spheroids development in penaeid shrimp: pathological implications and diagnostic value

Alexander Varela Mejías¹, Jorge Cuéllar-Anjel²

¹Consultor en Diagnóstico y Sanidad Acuicola, Laboratorio Sea Farmers, Sinaloa, México

²Consultor Internacional en Sanidad Acuicola, Global Consulting Inc., Bogotá, D.C., Colombia

Correspondencia: Alexander Varela Mejías  E-mail: alexander.varela@gmail.com

Ensayo | Essay

Palabras clave

Inmunidad
Camarones penaeidos
Virus
Esferoides
Histopatología
Diagnóstico

RESUMEN | Los camarones penaeidos están expuestos constantemente a infecciones por agentes patógenos. Como respuesta a éstos y a pesar de la aparente simplicidad de su sistema inmune, se han descrito diferentes mecanismos defensivos contra patógenos virales, bacterianos y micóticos, que incluyen complejos procesos de inmunidad celular y humoral. Como parte de esta respuesta, en múltiples ocasiones, se ha reportado la presencia de hiperplasias nodulares del órgano linfoide, denominadas “esferoides del órgano linfoide” (LOS por sus siglas en inglés). Este trabajo presenta una revisión sobre estas estructuras, su descripción histopatológica y la relación que guardan con patologías infecciosas reportadas hasta la fecha. Asimismo, se presentan ejemplos de los principales agentes reportados en su formación. Finalmente, se discute sobre la importancia y limitantes de estas estructuras y su valor diagnóstico mediante técnicas histopatológicas, realizadas en el órgano linfoide y a otras ubicaciones en distintos órganos y tejidos de los camarones (“esferoides ectópicos”).

Keywords

Immunity
Penaeid shrimp
Viruses
Spheroids
Histopathology
Diagnosis

ABSTRACT | Penaeid shrimp are constantly exposed to infections by pathogens. In response to these and despite the apparent simplicity of their immune system, different defensive mechanisms have been described against viral, bacterial and fungal pathogens, including complex processes of cellular and humoral immunity. On multiple occasions, nodular hyperplasia of the lymphoid organ has been reported, in the form of structures called "lymphoid organ spheroids" (LOS). This study presents a review of these structures, their histopathological description and their relationship with infectious pathologies reported to date. Examples of the main viral agents reported in their structures are also presented with different hypothesis about their origin and function. Finally, it discusses the importance and limitations of these structures and their diagnostic value through histopathological techniques, aimed at the lymphoid organ and other locations in different organs and tissues of shrimp ("ectopic spheroids").

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades infecciosas constituyen una de las amenazas más serias para la industria del cultivo de camarón a nivel mundial y se han convertido en una de las principales limitantes para el crecimiento y la sostenibilidad de esta actividad.

Múltiples enfermedades de gran impacto han sido descritas afectando a las producciones de camarones marinos y de agua dulce (Cuéllar-Anjel, 1995; Cuéllar-Anjel *et al.*, 1998; Cuéllar-Anjel *et al.*, 2000; Bondad-Reantaso *et al.*, 2001; Lightner y Pantoja, 2001; Bonami, 2008; Cuéllar-Anjel *et al.*, 2010; Morales-Covarrubias, 2010; Varela y Peña, 2013; Morales y Cuéllar-Anjel, 2014; Morales-Covarrubias *et al.*, 2018; Varela, 2018; Varela, 2019; Varela *et al.*, 2019; Varela y Valverde, 2019), este hecho ha generado un creciente interés por comprender los mecanismos de defensa que poseen estos crustáceos, con el fin de utilizarlos como una estrategia para reducir la susceptibilidad de estos organismos y su capacidad de resistencia hacia diferentes tipos de agentes patogénicos. Dicha estrategia tiene a su vez, la finalidad de desarrollar animales más tolerantes o resistentes ante brotes infecciosos, así como incrementar su capacidad de defensa, con el fin de lograr desarrollar posibles modelos de inmunoestimulación (Cuéllar-Anjel *et al.*, 1999; Barraco *et al.*, 2014; Peña *et al.*, 2014).

Ante los diferentes agentes patógenos, los camarones han desarrollado múltiples estrategias inmunológicas. Actualmente, los principales sistemas de defensa descritos para estos animales se pueden agrupar en mecanismos de reconocimiento de lo “no-propio”, mecanismos de señalización y activación de los hemocitos, respuestas inmunocelulares, producción de moléculas antimicrobianas, sistema enzimático de melanización y defensas antivirales (Lightner, 1996; Vargas-Albores *et al.*, 1996; Anggraeni y Owens, 2000; Shao *et al.*, 2004; Rusaini y Owens, 2010; Barraco *et al.*, 2014; Norouzitallab *et al.*, 2018; Russel *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2020).

Además de los anteriores sistemas, en los penaeidos han sido descritos mecanismos apoptóticos (Sahtout *et al.*, 2001), mediante enzimas denominadas caspasas, las cuales se han detectado en diferentes especies como *Penaeus vannamei* (Rijiravanich *et al.*, 2008), *P. monodon* (Wongprasert *et al.*, 2007) y *P. merguensis* (Phongdara *et al.*, 2006), cuyo papel es eliminar células infectadas por algún virus antes de su propagación.

Para realizar algunas de estas funciones de defensa, los penaeidos poseen un órgano especializado llamado órgano linfoide y conocido también como “órgano Oka”. Este órgano participa activamente en los procesos de captura, aislamiento y eliminación de patógenos mediante fagocitosis (Bell y Lightner, 1988; Owens *et al.*, 1991; Kondo *et al.*, 1994; Duangsuwan *et al.*, 2008a).

El presente trabajo describe la estructura de éste órgano, así como sus funciones y reacciones. Dando énfasis en la formación de esferoides, las diferentes patologías asociadas a ellos y las funciones que cumplen, con el fin de compilar información de utilidad para veterinarios, histopatólogos, biólogos y demás profesionales relacionados al diagnóstico patológico de camarones penaeidos.

Anatomía, ubicación y función del órgano linfoide

Se trata de una estructura bilobulada, localizada en la región anteroventral del hepatopáncreas y posterior a la glándula antenal, siendo parte integral de la porción distal de la arteria subgástrica (Fig. 1) (Bell y Lightner, 1988; Rusaini y Owens, 2010; Barraco *et al.*, 2014). Cada uno de estos lóbulos recibe la hemolinfa a través de dicha arteria y dentro de cada lóbulo se generan abundantes ramificaciones por los cuales circula y es filtrada la hemolinfa (Bell y Lightner, 1988; Duangsuwan *et al.*, 2008a).

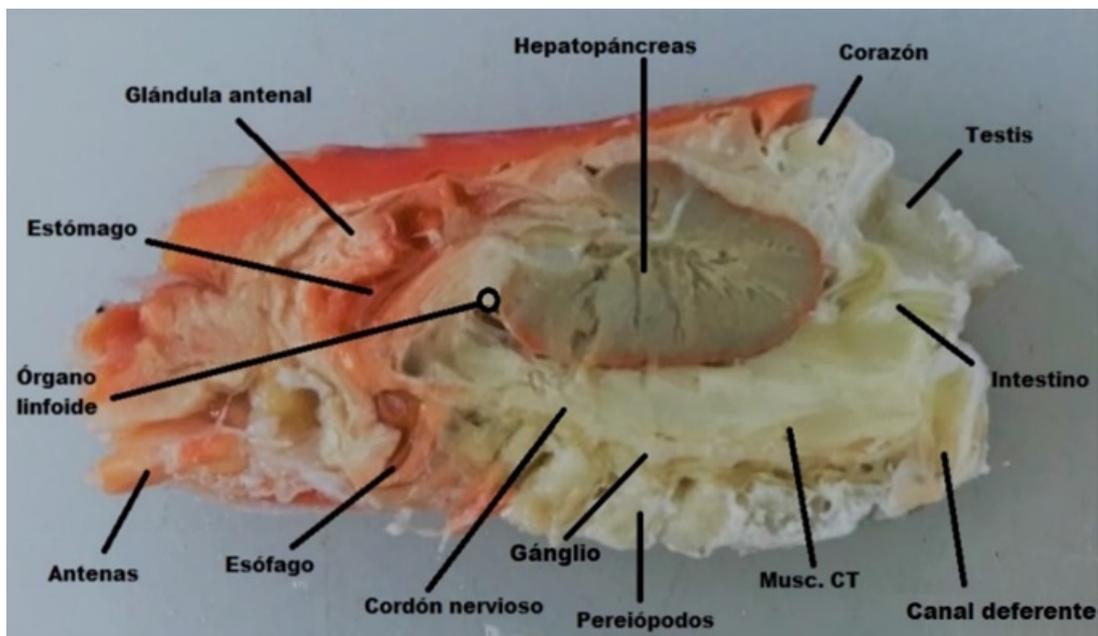


Figura 1. Corte sagital del cefalotórax de un camarón adulto, mostrando la distribución de los principales órganos, incluyendo el órgano linfoide. El espécimen está orientado con la parte frontal dirigida hacia la izquierda de la imagen.

Dado sus pequeñas dimensiones, el órgano linfoide es difícil de observar a simple vista o de ser disectado mediante preparados en fresco, sobre todo en animales pequeños, como juveniles y postlarvas. En cortes histológicos se aprecia como un tejido altamente vascularizado, conformado por finas arteriolas rodeadas de senos hemales; éstas poseen una capa interna de células endoteliales, rodeadas de tejido estromático, unidas por tejido conectivo y senos hemales (Fig. 2) (Bell y Lightner, 1988; Shao *et al.*, 2004; Duangsuwan *et al.*, 2008a; Duangsuwan *et al.*, 2008b).

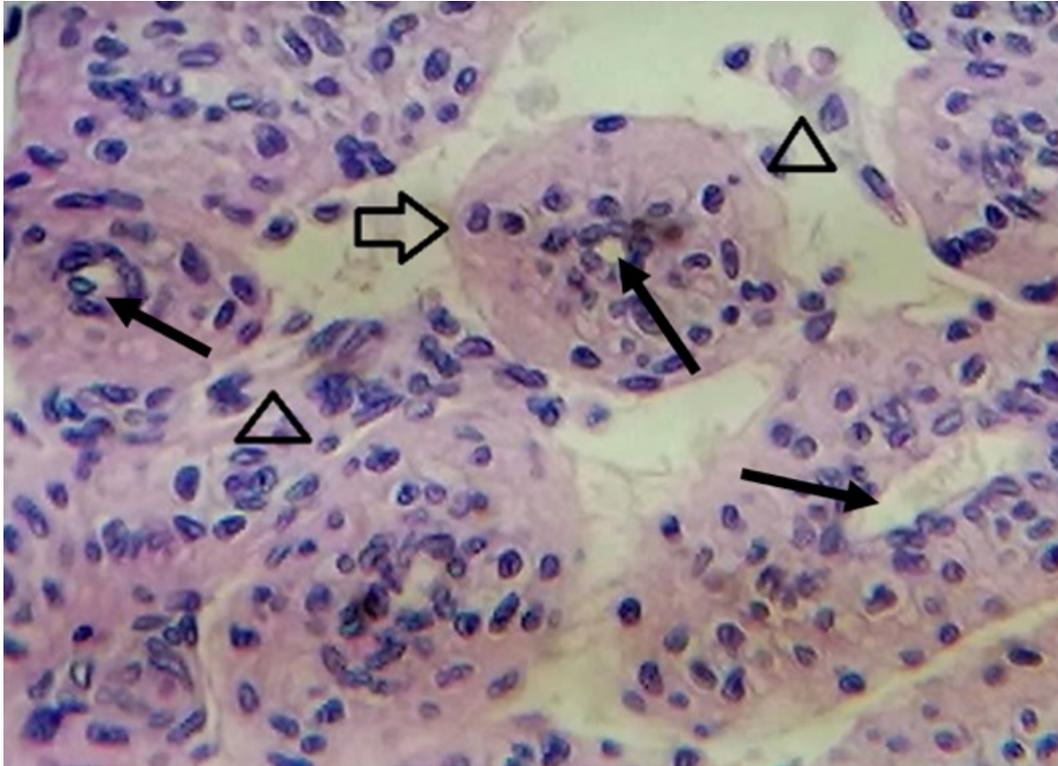


Figura 2. Sección histológica de un órgano linfoide sin alteraciones. Se observan túbulos en corte transversal (flechas) rodeados de células endoteliales ligeramente basofílicas. El centro de cada túbulo posee un conducto (flechas delgadas). Externo a ellas, se observan células estromáticas y senos hemales (cabezas de flecha). Tinción H&E, 200X.

Formación de esferoides

Adicionalmente a las funciones de filtración y fagocitosis, se ha observado que, bajo infecciones naturales o experimentales causadas por algunos agentes patogénicos, se produce la formación de hiperplasias nodulares del órgano linfoide (HNOL), conocida como “esferoides” del órgano linfoide (LOS, por sus siglas en inglés). Estas estructuras también pueden ser detectadas en otros tejidos y órganos del camarón, en cuyo caso reciben el nombre de “esferoides ectópicos” o “esferoides metastásicos” (figura 3) (Lightner *et al.*, 1987; Owens *et al.*, 1991; Nadala *et al.*, 1992; Hasson *et al.*, 1999; Andrade *et al.*, 2008).

El reporte de esferoides en camarones no es reciente. Lightner *et al.* (1987) en su descripción inicial, se refirió a ellos como “*esferoides hiperplásicos y metastásicos del órgano Oka*”, detectándolo en *P. monodon* y *P. penicillatus* silvestres capturados en Taiwán. Fueron catalogados en ese entonces como parte de un síndrome idiopático al que llamó *Oka organ hypertrophy and metastasic* (OHM, por sus siglas en inglés). En dicho reporte, indicó que el órgano linfoide de algunos camarones estaba altamente hipertrofiado y con formaciones de masas celulares en ausencia de un conducto central. De manera adicional, indicó que dichos esferoides en ocasiones se dissociaban del órgano linfoide, presentándose en forma ectópica en otras regiones anatómicas u órganos como branquias, gónadas, corazón, glándula antenal y músculo. Esta observación lo llevó a sugerir que existía una posible relación entre la presencia de estas estructuras esferoidales y afecciones infiltrativas crónicas.

Anatomopatológicamente, los esferoides han sido descritos por diferentes autores como estructuras que implican cambios en la conformación y funcionalidad normal del órgano linfoide. Para su estudio, se han desarrollado escalas de clasificación de estos cambios, definiéndolos en fases según su desarrollo y evolución (Rusaini y Owens, 2010).

Estos esferoides aparecen como estructuras bien delimitadas, con diámetros variables, pero que comúnmente oscilan entre 50 y 150 μm ; presentan forma esférica a ligeramente irregular, están constituidos por células hipertrofiadas, sin arquitectura ni orden definido y se encuentran intercalados entre áreas de túbulo normales, presentando algunas veces diferentes grados de vacuolización y evidencia de necrosis caracterizada por picnosis y cariorexix. Inicialmente, se asoció esta presencia de vacuolas dentro de los esferoides con infección por el virus de la vacuolización del órgano linfoide (LOVV por sus siglas en inglés) (Brock y Main, 1994).

Es común clasificarlos en categorías según su grado de desarrollo; en las fases iniciales de formación, son débilmente basofílicos, están formados por masas homogéneas de células poco diferenciadas, conteniendo pocas o ninguna célula necrótica o restos celulares. Evolucionan en forma gradual, produciendo un incremento en el número de células necróticas y restos celulares, así como una baja o moderada cantidad de células vacuolizadas, para finalmente presentar un incremento en la basofilia y picnosis (Owens *et al.*, 1991; Shao *et al.*, 2004; Duangsuwan *et al.*, 2008a).

Mediante histología de rutina con tinciones de Hematoxilina y Eosina (H&E), es fácil distinguir las tres fases de desarrollo del esferoide (Tabla 1). Durante la fase inicial, se presentan masas homogéneas de células poco diferenciadas, débilmente basofílicas contrastando con un entorno predominantemente eosinofílico. En la fase media se presentan algunos núcleos picnóticos y fragmentados, que incrementan gradualmente su basofilia. Posteriormente, en la etapa final, se observa un evidente dominio de la basofilia y necrosis celular, caracterizada por picnosis y cariorexix, así como vacuolizaciones cada vez en mayor cantidad y presencia de restos celulares y posibles cuerpos de inclusión (Owens *et al.*, 1991; Hasson *et al.*, 1999; Anggraeni y Owens, 2000; Lightner *et al.*, 2004; Poulos *et al.*, 2006; Duangsuwan *et al.*, 2008b).

Tabla 1. Tipos de esferoides según su estadio de desarrollo

Fase	Etapa	Características
1	Formación	Constituidos por masas regulares de células poco diferenciadas, sus núcleos aparecen hipertrofiados, con marginación cromatínica, levemente basofílicos
2	Encapsulación	Se observa una capa de células aplanadas, rodeando al esferoide, se puede presentar cariopicnosis y zonas necrosadas y en algunos casos se observan cuerpos de inclusión
3	Degeneración	Fase final de degradación, aumenta la cantidad de cariopicnosis, necrosis y posibles cuerpos de inclusión, se incrementan las vacuolizaciones, las cuales predominan en la estructura

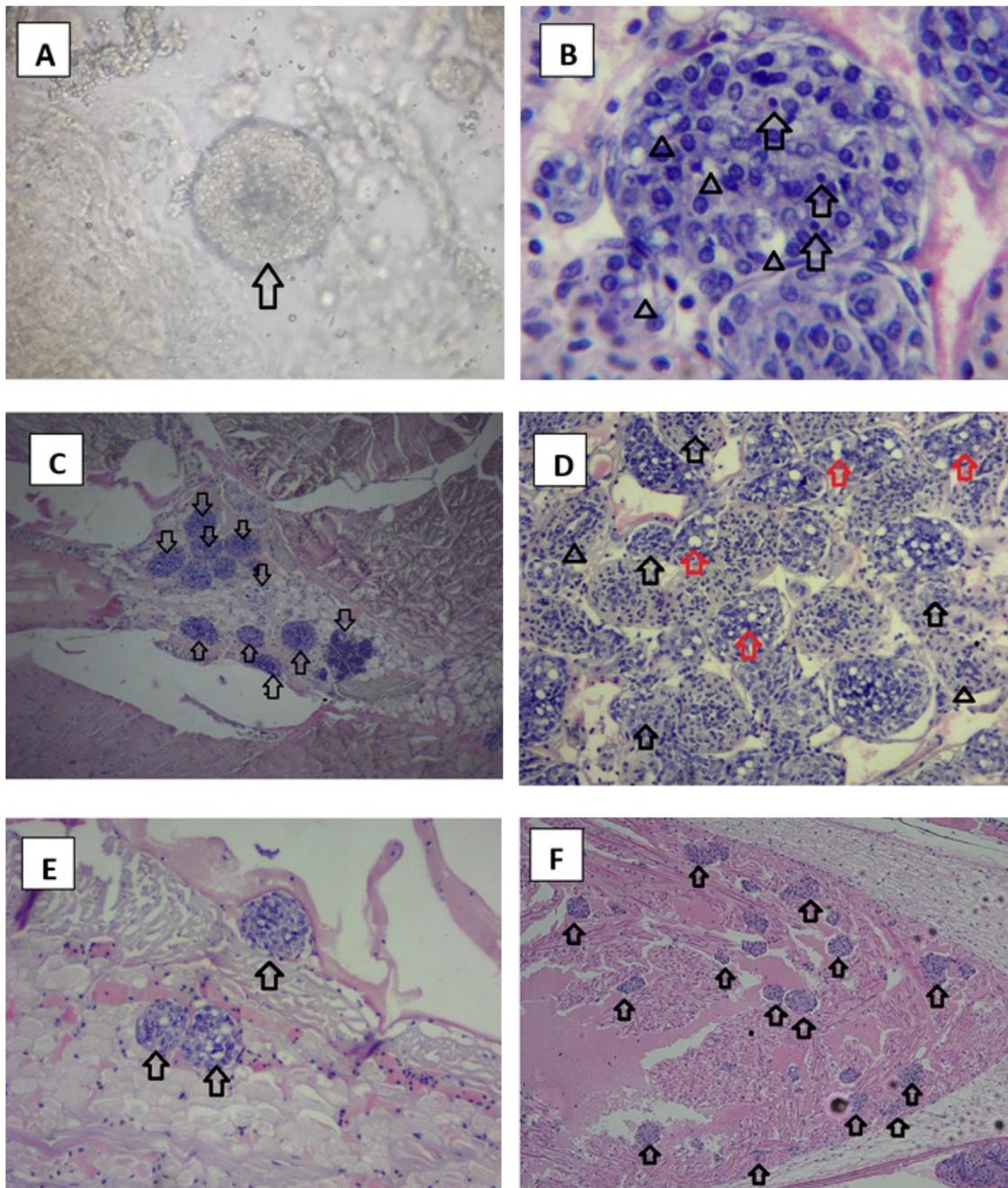


Figura 3. Micrografías de esferoides en secciones histológicas de camarones juveniles y preadultos *P. vannamei*. a) Esferoide en órgano linfoide, observación en fresco, sin tinción 400X. b) Esferoides en órgano linfoide en fase 3, fuertemente basófilo, se observan núcleos picnóticos (flechas) y vacuolizaciones (cabezas de flecha), 500X. c) Múltiples esferoides ectópicos (flechas) en tejido conectivo esponjoso, adyacente a la glándula antenal, 100X. d) Corte de órgano linfoide con presencia de esferoides fase 1 (flechas negras) y 3 (flechas rojas), así como algunos túbulos linfoides normales (cabeza de flecha), 200X. e) Esferoides ectópicos en fase 3 en tejido conectivo esponjoso, región perigástrica. 200X. f) Corte de corazón de camarón adulto, con una alta presencia de esferoides en tejido miocárdico (flechas), 200X. Todos los cortes (excepto 2a), presentan Tinción H&E.

Agentes patogénicos asociados con la formación de esferoides

Existen varios agentes patógenos reportados en la literatura científica, que han sido asociados con la formación de esferoides (Tabla 2). Para estos patógenos, se dispone de numerosos reportes y de evidencia científica, que argumenta una correlación entre la presencia del agente infeccioso y la formación de esferoides, a través de análisis con métodos como la histología de rutina y la hibridación *in situ* (Owens *et al.*, 1991; Bonami *et al.*, 1992; Nadala *et al.*, 1992; Spann *et al.*, 1995; Lightner, 1996; Cuéllar-Anjel *et al.*, 1998; Hasson *et al.*, 1999; Anggraeni y Owens, 2000; Alday-Sanz, 2002; Van de Braak, 2002; Rodríguez *et*

al., 2003; Lightner *et al.*, 2004; Wu y Muroga, 2004; Cowley *et al.*, 2005; Poulos *et al.*, 2006; Rajendran *et al.*, 2006; Tang *et al.*, 2007; Duangsuwan *et al.*, 2008b; Cuéllar-Anjel *et al.*, 2010; Pantoja y Lightner, 2014; Zhang *et al.*, 2014; Peña y Varela, 2015; Prasad *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2017; OIE, 2018).

Tabla 2. Agentes patógenos asociados con la presencia de esferoides en camarones penaeidos.

Agente	Acrónimo	Genoma	Fuentes
Virus del síndrome de Taura	TSV	ssRNA	Lightner, 1996; Cuéllar-Anjel <i>et al.</i> , 1998; Hasson <i>et al.</i> , 1999;; OIE, 2018
Virus de la cabeza amarilla	YHV	ssRNA	Lightner, 1996; Duangsuwan <i>et al.</i> , 2008b
Virus de la mionecrosis infecciosa	IMNV	dsRNA	Lightner <i>et al.</i> , 2004; Poulos <i>et al.</i> , 2006; Cuéllar-Anjel, 2015; Prasad <i>et al.</i> , 2017; OIE, 2018
<i>Penaeus vannamei</i> Nodavirus	PvNV	ssRNA	Tang <i>et al.</i> , 2007; Pantoja y Lightner, 2014
Rhabdovirus de los camarones penaeidos	RPS	dsRNA	Nadala <i>et al.</i> , 1992; Lightner, 1996
Virus de la vacuolización del órgano linfoide	LOVV	dsRNA	Bonami <i>et al.</i> , 1992; Lightner, 1996; Anggraeni y Owens, 2000
Virus del órgano linfoide	LOV	ssRNA	Spann <i>et al.</i> , 1995
Nodavirus de la mortalidad encubierta	CMNV	ssRNA	Zhang <i>et al.</i> , 2014; Zhang <i>et al.</i> , 2017
Virus de Mourilyan	MoV	ssRNA	Cowley <i>et al.</i> , 2005; Rajendran <i>et al.</i> , 2006
Virus del síndrome de las manchas blancas	WSSV	dsDNA	Rodríguez <i>et al.</i> , 2003; Wu y Muroga, 2004
Parvovirus linfoidal	LPV	ssDNA	Owens <i>et al.</i> , 1991; Lightner, 1996
<i>Vibrio</i> spp. (infecciones sistémicas)		dsDNA	Alday-Sanz, 2002; Van de Braak, 2002; Peña y Varela, 2015 y 2016.

DISCUSIÓN

Desde los primeros reportes de esferoides, se sugería la posible participación de agentes infecciosos sin lograr en ese momento su identificación (Lightner *et al.*, 1987). Tal como se observa en la Tabla 2, la mayoría de agentes relacionados con la formación de LOS son patógenos virales, cuyo genoma está compuesto por RNA, tanto de cadena sencilla como de cadena doble.

El primer reporte de esferoides para América se originó en animales obtenidos en Mazatlán, Sinaloa, México (Bonami *et al.*, 1992), asociados a un Togavirus. Desde entonces, la lista de reportes y patógenos asociados a esferoides ha crecido globalmente.

Los trabajos en que se han reportado la formación de esferoides como respuesta a infecciones por virus cuyo genoma está conformado por DNA, tales como el Parvovirus linfoidal (Owens *et al.*, 1991; Lightner, 1996) y el virus WSSV, son menos frecuentes (Rodríguez *et al.*, 2003; Wu y Muroga, 2004).

Incluso, en el caso del WSSV, su relación con la formación de esferoides no concuerda con cientos de observaciones realizadas a partir de muestras histopatológicas procesadas entre los años 2006 y 2019, en

animales infectados naturalmente por WSSV en Costa Rica, Colombia, Ecuador, México y Panamá (Cuéllar-Anjel y Varela; datos no publicados), en los cuales ha sido común detectar alteraciones que incluyen lesiones de tipo degenerativo, como la presencia de cuerpos de inclusión, necrosis (picnosis y cariorrexis), pero sin observar correlación con la presencia o ausencia de esferoides, tanto en el órgano linfoide como ectópicos.

La generación de esferoides por infecciones de WSSV, tampoco ha sido reportada como un hallazgo por otros autores, entre ellos Lightner (1996), Lightner y Pantoja (2001) y Morales-Covarrubias (2010). De igual manera, los esferoides no se encuentran descritos como una lesión tipificada para esta enfermedad en el Manual de las Pruebas de Diagnóstico para los Animales Acuáticos de la OIE (2018).

Los esferoides, como mecanismos para controlar patógenos, pueden actuar en asociación con otros sistemas como el desarrollo de apoptosis de células infectadas, evitando así la propagación del agente hacia otros tejidos. Éstos cuerpos apoptóticos han sido reportados en esferoides por Anggraeni y Owens (2000).

Interesantemente, Wang *et al.* (2004) y Cuéllar-Anjel *et al.* (2012), reportan la existencia de genes anti-apoptosis en el genoma del WSSV o sugieren su existencia como parte del proceso de patogénesis de dicho virus. De hecho, el WSSV posee un gen que codifica para la proteína anti-apoptótica AAP-1, también llamada WSSV449 u ORF 390 (Wang *et al.*, 2004), la cual se puede unir a una caspasa del camarón *P. monodon*, logrando inhibir la actividad pro-apoptótica y demostrando así una actividad anti-apoptótica para este virus (Leu *et al.*, 2008).

Del mismo modo, en *P. vannamei* se han reportado genes codificantes de nuevas caspasas, llamadas Lvcaspase 2, 3, 4 y 5. Cuando Lvcaspase 2, 3 y 5 son silenciadas, se incrementa notablemente la expresión de una de las proteínas del WSSV, la VP28, la cual participa en la fijación del virus a la célula hospedadora (Wang *et al.*, 2013). Este planteamiento, sin embargo, no está exento de controversia, ya que la inducción de la apoptosis en camarones durante infecciones virales, también ha sido reportada.

En especímenes de *P. monodon* infectados por WSSV (Sahtout *et al.*, 2001; Wongprasert *et al.*, 2003) o por YHV (Khanobdee *et al.*, 2002), se ha observado un incremento elevado y progresivo de la apoptosis, afectando tejidos y órganos, atribuyendo a ésta, la causa más probable de las mortalidades. En *P. japonicus* infectados por WSSV, la apoptosis también es muy alta, generando destrucción masiva de los tejidos diana (Wu y Muroga, 2004).

Esto parece indicar que en las infecciones por virus, los animales pueden presentar diferentes respuestas. En algunos casos, durante infecciones virales severas, se activan mecanismos epigenéticos inductores de apoptosis, buscando evitar la propagación del virus. En otros casos se puede con lo cual se produce elevada propagación de los agentes virales y como resultando la muerte de los camarones por una elevada tasa de apoptosis en los órganos y tejidos. Las razones por las cuales se toma una u otra ruta, aún no están claras y requieren de mayores investigaciones. Pero es posible, que se deban a interacciones entre el virus, el ambiente y el hospedador, considerando las particularidades de cada uno para el brote específico. Del mismo modo, se desconoce si la formación de esferoides se presenta en forma constante ante cada infección de los virus a los que se ha relacionado, o si su generación es caso dependiente.

Por otro lado, la formación de esferoides por infecciones bacterianas es también controversial y carece de estudios suficientes para explicar su desarrollo en estos casos. Alday-Sanz (2002) y van de Braak (2002), señalan que en infecciones experimentales con cepas de *Vibrio*, lograron observar este tipo de respuesta inmune. Esto, sin embargo, ha sido cuestionado por Rusaini y Owens (2010), quienes sostienen que en dichas investigaciones no se realizaron comparaciones histopatológicas con los grupos testigo. Además, no se realizaron análisis para determinar el estatus de los animales con respecto a posibles infecciones previas al desaffo bacteriano.

Por su parte, Peña y Varela (2015), realizando infecciones intramusculares experimentales de *P.*

vannamei con cepas de *V. parahaemolyticus*, reportaron esferoides como parte de los hallazgos histopatológicos en este desafío bacteriano. En un estudio posterior realizado por los mismos autores (2016), en muestras de animales capturados en granjas, se detectaron nuevamente estas estructuras. Infortunadamente en estos trabajos, tampoco se realizaron comparaciones histopatológicas contra grupos testigo, ni corroboración de ausencia de infecciones por otros patógenos, previas al desafío. Estas condiciones no permiten establecer una correlación irrefutable entre presencia de esferoides y la infección bacteriana.

Cuéllar-Anjel (no publicado) también observó presencia de esferoides en órgano linfoide y/o ectópicos, durante procesos infecciosos severos asociados con la enfermedad de la necrosis aguda del hepatopáncreas (AHPND) durante los años 2015 y 2016, presentes en poblaciones de *P. vannamei* en cultivos semi-intensivos en Centroamérica. Pese a ello, esta presencia simultánea de esferoides e infecciones bacterianas, no confirma ni descarta *per se* la asociación entre ellas, pudiendo ser casos de coinfecciones por diferentes agentes patógenos. Sobre todo, considerando que la presencia de esferoides, típicamente se asocia con patologías sistémicas, siendo el AHPND una enfermedad entérica. Tampoco se puede descartar que la presencia de una de estas patologías como AHPND, pueda exacerbar otra patología preexistente, por ejemplo, de origen viral, para su expresión.

Adicionalmente, en análisis histopatológicos realizados a camarones que han enfrentado infecciones sistémicas naturales o experimentales por otros géneros de bacterias, como *Spiroplasma penaei* (Nunan *et al*, 2005; Heres *et al*, 2011), se reportan lesiones en el órgano linfoide, tal como formación de nódulos hemocíticos, melanización, necrosis y presencia bacteriana difusa. Del mismo modo, Hasson *et al* (2009) en estudios realizados para infecciones por *Streptococcus* sp., reportan una marcada vasculitis del órgano linfoide, reemplazando a las arteriolas normales con hemocitos altamente vacuolizados, con núcleos marginados, alterando fuertemente la estructura del órgano, pero sin detectar esferoides.

La descripción histopatológica de los esferoides, presenta cierta consistencia según diferentes autores, respecto a la progresión de la severidad de las lesiones desde las fases iniciales, hasta las fases terminales (Owens *et al*, 1991; Hasson *et al*, 1999; Anggraeni y Owens, 2000; Shao *et al*, 2004; Duangsuwan *et al*, 2008b). Todas son caracterizadas por alteraciones severas en el órgano linfoide.

Sin embargo, estas mismas concordancias y similitudes impiden utilizar los esferoides como lesiones patognomónicas de determinadas enfermedades, ya que no es posible distinguir mediante histopatología de rutina, cuándo los esferoides han sido causados por uno u otro patógeno. Por ejemplo, en Costa Rica se presentaron casos recurrentes en una prevalencia aparente menor al 5% de animales con presencia de esferoides en órgano linfoide, hallazgo que llevó a la realización de pruebas de mayor especificidad, incluyendo análisis por reacción en cadena de polimerasa (PCR). Estas pruebas de PCR arrojaron resultados negativos para todos los agentes considerados en ese momento, por lo que se consideró la formación de esferoides como una condición idiopática (Varela, 2016).

Interesantemente, durante los últimos cinco años, se ha observado un importante incremento en la incidencia de camarones con esferoides en varias regiones de Latinoamérica, incluyendo países de Norte y Centroamérica (Varela; Cuéllar-Anjel; datos no publicados). Hasta la fecha, no se ha logrado asociar esta presencia “reciente” de esferoides, con ningún patógeno descrito previamente, siendo aún una condición idiopática. Estos animales presentan una elevada presencia de esferoides, afectando severamente el órgano linfoide con hiperplasia e hipertrofia, alterando su estructura normal. Es común observarlos también en otros tejidos y órganos (ectópicos), entre ellos corazón, glándula antenal, tejido conectivo perigástrico, lóbulos hematopoyéticos, adyacente al tejido epitelial y conectivo subcuticular, branquias, región oral, base de los pereiópodos y pedúnculos oculares. No se ha observado presencia de estos esferoides en gónadas.

En algunas ocasiones, los camarones afectados también presentan mionecrosis de tipo coagulativo, así como picnosis en las células del cordón nervioso ventral. Sin embargo, dado que estas últimas lesiones no se observan en todos los animales afectados por este “Síndrome proliferativo de esferoides”, podrían estar o

no asociados con el mismo. Se requieren más investigaciones al respecto para dilucidar la relación entre éstos.

Los esferoides presentes tanto en el órgano linfoide, como los ectópicos, deben considerarse entonces como indicadores de exposición actual o pasada a infecciones por agentes patógenos, pero su observación en cortes histopatológicos con tinciones de rutina, no permite identificar al agente causal de dichas lesiones hiperplásicas, generando una limitante como soporte en el diagnóstico. Es en estos casos, que se debe complementar el análisis con el historial clínico de los camarones en estudio, así como la información de la granja o región, los agentes reportados previamente y, de ser posible, el uso de técnicas moleculares.

Las implicaciones patogénicas de la formación de esferoides en camarones penaeidos, posiblemente estén en función de la severidad y frecuencia de las lesiones, dado que se trata de estructuras degenerativas y necróticas (Hasson *et al*, 1999). Sin embargo, si se considera que la formación de esferoides conlleva a un acortamiento de los túbulos linfoides (Duangsuwan *et al*, 2018b), se sugiere una pérdida de funcionalidad del órgano, o al menos una reducción de la eficacia en su actividad fagocítica y de filtración de la hemolinfa.

CONCLUSIONES

La presencia de esferoides, tanto en el órgano linfoide como ectópicos, se ha considerado como parte de las reacciones generadas por el sistema inmune, siendo un posible mecanismo para aislar agentes infecciosos detectados en cuadros sistémicos, a través de filtración permanente de la hemolinfa (equivalente a ganglios linfáticos en mamíferos). Estos esferoides facilitarían la degradación y reabsorción de células circulantes infectadas en un ambiente cerrado, reduciendo así los riesgos de liberación de partículas potencialmente infectantes y limitando la propagación de patógenos hacia el resto del organismo o hacia otros camarones de dicha población.

Histopatológicamente, existe un consenso en clasificar a los esferoides en función de su grado de desarrollo, el cual es directamente proporcional al incremento de los procesos de degeneración o degradación de los tejidos implicados. Esto supone un daño, posiblemente irreversible, sobre el órgano linfoide e incluye procesos de hiperplasia nodular, hipertrofia tisular inicial, picnosis, apoptosis, vacuolización y, finalmente, una reducción de la longitud de los túbulos que conllevaría a la disminución del área funcional del órgano, afectando posiblemente la capacidad de participación en la respuesta inmune en los camarones afectados.

La presencia de esferoides, tanto en el órgano linfoide como ectópicos, ha sido asociada con mayor frecuencia, a agentes infecciosos virales sistémicos, con un predominio de especies virales cuyo genoma está conformado por RNA, en tanto que la formación de estas estructuras ante virus de DNA aún no está del todo clara y genera algunas controversias.

La participación de los esferoides como respuesta durante infecciones bacterianas sistémicas, no ha sido corroborada en forma contundente o mediante estudios sistemáticos. Los resultados publicados por diferentes fuentes, no son siempre concordantes entre ellos. Por esta razón, no se descarta que la presencia de esferoides en estos casos reportados pudiera estar relacionada con la incidencia de infecciones virales previas no detectadas y el tema sigue siendo motivo de dudas y estudios, requiriendo por tanto de mayores investigaciones para su aclaración.

La detección de esferoides *per se*, únicamente nos indica la exposición actual o pasada de infecciones por agentes patogénicos, pero debido a las características anatomopatológicas similares en infecciones con todos los agentes etiológicos asociados con estas lesiones, no son útiles aún para realizar un diagnóstico confirmativo. Para ello, se requiere de análisis diferenciales como la detección de lesiones histopatológicas en otros tejidos, que permitan distinguir lesiones diferentes según sean los agentes patógenos causales y, a

la utilización de técnicas de apoyo como la hibridación *in situ* con sondas específicas para el agente, o la PCR, de alta sensibilidad y especificidad.

La presencia de esferoides en una muestra, debe catalogarse en principio, como una lesión idiopática. Pero debe dar siempre una señal de alarma, requiriendo que se dé continuidad a estudios para identificar la causa de estas lesiones. La presencia de esferoides puede estar relacionada con riesgos potenciales sobre las poblaciones afectadas, o, por el contrario, ser remanentes de infecciones controladas o causadas por agentes de baja virulencia previamente presentes. En ambos casos, se debe disponer de una identificación concluyente, que permita definir las acciones a seguir según el caso particular.

Por último, es importante aclarar que los esferoides no son una enfermedad; son parte de la respuesta de un camarón contra la presencia de determinados agentes patógenos, como los mencionados en este documento. Este tipo de respuesta, podría llegar a reducir la funcionalidad de algún órgano o tejido afectado, en caso de presentar demasiados esferoides (ej.: órgano linfóide y corazón). Asimismo, la formación de esferoides implica forzosamente un gasto energético por parte de los camarones, lo cual también se debe considerar.

REFERENCIAS

- Alday-Sanz, V; Roque, A; Turnbull, J, F. (2002). Clearing mechanisms of *Vibrio vulnificus* biotype I in the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Disease of Aquatic Organisms*. 48:91–99.
- Andrade, T, P, D; Redman, R, M, Lightner, D, V. (2008). Evaluation of the preservation of shrimp samples with Davidson's AFA fixative for infectious myonecrosis virus (IMNV) *in situ* hybridization. *Aquaculture*, 278:179-183.
- Anggraeni, M, S; Owens, L. (2000). The haemocytic origin of lymphoid organ spheroid cells in the penaeid prawn *Penaeus monodon*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 40(1):85-92.
- Barracco, M, A; Perazzolo, L, M; Rosa, R, D. (2014). Avances en la Inmunología del Camarón. p. 237-306. En: Morales, V. y J. Cuéllar-Anjel (eds.). 2014. Guía Técnica – Patología e Inmunología de Camarones Penaeidos. OIRSA, Panamá, República de Panamá. 382 pp.
- Bell, T, A; Lightner, D, V. (1988). A handbook of normal penaeid shrimp histology. Baton Rouge, Louisiana, USA: World Aquaculture Society. 114 pp.
- Bonami, J, R. (2008). Shrimp viruses. In: Edited by Mahy B. W. J. and van Regenmortel M. H. V. Encyclopedia of Virology, Elsevier, Oxford. 567-576 pp.
- Bonami, J, R; Lightner, D, V; Redman, R, M; Poulos, B, T. (1992). Partial characterization of a togavirus (LOVV) associated with histopathological changes of the lymphoid organ of penaeid shrimps. *Disease of Aquatic Organisms*. 14:145-152.
- Bondad-Reantaso, M, G; Mc Gladdery, S, E; East, I; Subasinghe, R, P. (2001). Asia Diagnostic Guide to Aquatic Animal Diseases. FAO Fisheries Technical Paper No. 402, Supplement 2. Rome, FAO. 2001. 240 p.
- Brock, J.A. y K.L. Main. (1994). A guide to the common problems and diseases of cultured *Penaeus vannamei*. The Oceanic Institute. Honolulu, Hawaii. 242 pp.
- Cowley, J, A; McCulloch, R, J; Rajendran, K, V; Cadogan, L, C; Spann, K, M; Walker, P, J. (2005). RT-nested PCR detection of Mourilyan virus in Australian *Penaeus monodon* and its tissue distribution in healthy and moribund prawns *Disease of Aquatic Organisms*. 66:91–104.

- Cuéllar-Anjel, J. (1995). Aproximación a las principales enfermedades en camarones cultivados en Colombia. *Boletín Científico de la Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales (U.D.C.A.)* Santafé de Bogotá, D.C., Colombia. 1:14-15.
- Cuéllar-Anjel, J; Brock, J. A; Aranguren, L, F; Bador, R, F; Newmark, F; Suárez, J, A. (1998). A survey of the main diseases and pathogens of penaeid shrimp farmed in Colombia. Book of abstracts of the World Aquaculture Society Conference "Aquaculture '98", Las Vegas, USA. p. 14.
- Cuéllar-Anjel, J. (1999). Enfermedades más comunes en camarones Penaeidos. Libro de resúmenes del "II Curso Internacional de Acuicultura". Universidad Nacional de Colombia, facultades de Medicina Veterinaria y de Zootecnia. Bogotá, Colombia. 176 p.
- Cuéllar-Anjel, J; Aragón, L, C; Aranguren, L, F; Vidal, O, M. (1999). The immune profile in healthy white shrimp *Penaeus vannamei* according to molt stage, sex and weight. Book of abstracts of the World Aquaculture Society Conference, Sydney 99, Australia. p. 26.
- Cuéllar-Anjel, J; Pacheco, V; Diez, J; De León, E; Vega, Z; Salazar, H. (2000). Main diseases of farmed penaeid shrimp in Panama. Book of abstracts of the 4th Latin-American Aquaculture Congress and Exhibition. Panamá, Rep. de Panamá. p. 22.
- Cuéllar-Anjel, J., Corteel, M; Galli, L; Alday-Sanz, V; Hasson, K. W. (2010). Principal Shrimp Infectious Diseases, Diagnosis and Management. In: *The Shrimp Book*. 2010. Alday-Sanz, V. (Ed.). Nottingham University Press, U.K. ISBN 978-1-904761-59-4. pp. 930.
- Cuéllar-Anjel, J; White-Noble, B; Schofield, P; Chamorro, R; Lightner, D, V. (2012). Report of significant WSSV-resistance in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, from a Panamanian breeding program. *Aquaculture*, 368-369. pp. 36–39. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.08.048>.
- Cuéllar-Anjel, J. (2015). Mionecrosis infecciosa. The center for Food Security & Public Health, / Institute for International Cooperation Animal Biologics. Iowa State University.
- Duangsuwan P, Phoungpetchara I, Tinikul Y, Poljaroen J, Wanichanon C, Sobhon P. (2008a). Histological and three dimensional organizations of lymphoid tubules in normal lymphoid organ of *Penaeus monodon*. *Fish & Shellfish Immunology* 24:426–35.
- Duangsuwan, P; Tinikula, Y; Chotwiwatthanakun, C; Vanichviriyakit, R; Sobhon, P. (2008b). Changes in the histological organization and spheroid formation in lymphoid organ of *Penaeus monodon* infected with yellow head virus. *Fish & Shellfish Immunology* 25:560–569.
- Hasson, K; Lightner, D, V; Mohny, L; Redman, R; White, B. (1999). Role of lymphoid organ spheroids in chronic Taura syndrome virus (TSV) infections in *Penaeus vannamei*. *Disease of Aquatic Organisms*. 38:93-105.
- Hasson, K, W; Wyld, E; Fan, Y; Lingsweiller, S, W; Weaver, S, J; Cheng, J; Varner, P, W. (2009). Streptococcosis in farmed *Litopenaeus vannamei*: a new emerging bacterial disease of penaeid shrimp. *Disease of Aquatic Organisms*. 86:93–106.
- Heres, A; Redman, R; Lightner, D, V. (2011). Histopathology of *Spiroplasma penaei* Systemic Infection in Experimentally Infected Pacific White Shrimp, *Penaeus vannamei*. *The Israeli Journal of Aquaculture - Bamidgah*, IIC:63.2011.589, 7 pages.
- Khanobdee, K; Soowannayan, C; Flegel, T. W; Ubol, S; Withyachumnarnkul, B. (2002). Evidence for apoptosis correlated with mortality in the giant black tiger shrimp *Penaeus monodon* infected with

- yellow head virus. *Disease of Aquatic Organisms*, 48:79-90.
- Kondo, M; Itami, T; Takahashi, Y; Fujii, R; Tomonaga, S. (1994). Structure and function of the lymphoid organ in the Kuruma prawn. *Developmental and Comparative Immunology*, 18 (suppl. 1), S109.
- Leu, J. H; Wang, H. C; Kou, G. H; Lo, C. F. (2008). *Penaeus monodon* caspase is targeted by a white spot syndrome virus anti-apoptosis protein. *Developmental and Comparative Immunology*. 32:476-486.
- Lightner, D, V. (1996). A Handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures for diseases of cultured penaeid shrimp. USA: World Aquaculture Society. 256 pp.
- Lightner, D, V. (2011). Virus diseases of farmed shrimp in the Western Hemisphere (the Americas): A review. *Journal of Invertebrate Pathology*, 106:110-130.
- Lightner, D, V; Hedrick, R, P; Fryer, J, L; Chen, S, N; Liao, I, C; Kou, G, H. (1987). A survey of cultured penaeid shrimp in Taiwan for viral and other important disease. *Fish Pathology* 22(3):127-140.
- Lightner, D, V; Pantoja, C, R. (2001). Manual para el Diagnóstico de Enfermedades del Camarón. United States Department of Agriculture - Programa de Reconstrucción Huracán Mitch. USDA/CSREES/USAID/UAZ).
- Lightner, D, V; Pantoja, C, R; Poulos, B, T; Tang, K, F, J; Redman, R, M; Pasos de Andrade, T; Bonami, J, R. (2004). Infectious myonecrosis: new disease in Pacific white shrimp. *Global Aquaculture Advocate*, 7, 85.
- Liu, S; Zheng, S, C; Li, Y, L; Li, J; Liu, H, P. (2020) Hemocyte-Mediated Phagocytosis in Crustaceans. *Frontiers in Immunology*, 11:268. Doi: 10.3389/fimmu.2020.00268
- Morales-Covarrubias, M, S. (2010). Enfermedades del camarón: detección mediante análisis en fresco e histopatología. Editorial Trillas. México, D.F. 130 p.
- Morales-Covarrubias, M, S; Cuellar-Anjel, J; Varela-Mejías, A; Elizondo-Ovares, C. (2018) Shrimp Bacterial Infections in Latin America: A Review. *Asian Fisheries Science* 31S: 76–87. In: Bondad-Reantaso, M; Arthur, R; FAO Technical Assistance Efforts to Deal with Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) of Cultured Shrimp. Philippines.
- Morales, V; Cuéllar-Anjel, J. (eds.). (2014). Guía Técnica de Patología e Inmunología de Camarones, 2da Edición. Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria (OIRSA), Organización del Sector Pesquero y Acuícola del Istmo Centroamericano (OSPESCA) y Sistema de la Integración Centroamericana (SICA). Panamá, Rep. de Panamá. ISBN 978-9962-8500-7-6. Versión Digital en Formato PDF. ISBN 978-9962-8500-8-3. pp. 382.
- Nadala, E, C, B; Lu, Y; Loh, P, C; Brock, J, A. (1992). Infection of *Penaeus stylirostris* (Boone) with a Rhabdovirus Isolated from *Penaeus* spp. *Gyoby Kenkyu*, 27(3):143-147.
- Norouzitalab, P; Baruah, K; Vanrompay, D; Bossier, P. (2018). Teaching Shrimps Self-Defense to Fight Infections. *Trends in Biotechnology*. 37(1):16-19, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.05.007>
- Nunan, L, M; Lightner, D, V; Oduori, M, A; Gasparich, G, E. (2005). *Spiroplasma penaei* sp. nov., associated with mortalities in *Penaeus vannamei*, Pacific white shrimp. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55:2317–2322.
- OIE (Organización Mundial de Sanidad Animal). (2019). Manual de las Pruebas de Diagnóstico para los Animales Acuáticos. URL: <https://www.oie.int/es/normas/manual-acuatico/acceso-en-linea/>

- Owens, L; De Beer, S; Smith, J. (1991). Lymphoidal parvovirus-like particles in Australian penaeid prawns. *Disease of Aquatic Organisms*, 11:129-134.
- Pantoja, C; Lightner, D, V. (2014). Enfermedades virales. p. 99-164. En: Morales, V. y J. Cuéllar-Anjel (eds.). 2014. Guía Técnica – Patología e Inmunología de Camarones Penaeidos. OIRSA, Panamá, Rep. de Panamá. 382 pp.
- Peña, N; Varela, A. (2015). Análisis histopatológico en *Litopenaeus vannamei* infectado con *Vibrio parahaemolyticus*. Costa Rica. *Revista Agronomía Mesoamericana*. 26(1):43-53.
- Peña, N; Cordero, R; Varela, A. (2014). Productos naturales como estimuladores del sistema inmunológico de *Litopenaeus vannamei*, infectado con *Vibrio parahaemolyticus*. Ecuador, *Revista Industria Acuicola*, 10(2):8-21.
- Peña, N; Varela, A. (2016). Prevalencia de las principales enfermedades infecciosas en *Litopenaeus vannamei* cultivado en el Golfo de Nicoya, Costa Rica. Chile, *Revista de Ciencias Marinas y Oceanografía*, 51(3): 553-564.
- Phongdara, A.; Wanna, W.; Chotigeat, W. (2006). Molecular cloning and expression of caspase from white shrimp *Penaeus merguensis*. *Aquaculture*, 252:114-120.
- Prasad, K, P; Shyam, K, Banu, H; Jeena, K; Krishnan, R. (2017). Infectious Myonecrosis Virus (IMNV), An alarming viral pathogen to Penaeid shrimps. *Aquaculture* 477:99-105.
- Poulos, B, T; Tang, K, F, J; Pantoja, C, R; Bonami, J, R; Lightner, D, V. (2006). Purification and characterization of myonecrosis virus of penaeid shrimp. *Journal of Invertebrate Pathology*, 87:987-996.
- Rajendran, K, V; Cowley, J, A; McCulloch, R, J; Walker, P, J. (2006). A TaqMan real-time RT-PCR for quantifying Mourilyan virus infection levels in penaeid shrimp tissues. *Journal of Virology Methods*, 137(2): 265-271.
- Rijiravanich, A; Browdy, C. L; Withyachumnarnkul, B. (2008). Knocking down caspase-3 by RNAi reduces mortality in Pacific white shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* challenged with a low dose of white-spot syndrome virus. *Fish & Shellfish Immunology*, 24:308-313.
- Rodríguez, J; Bayot, B; Amano, Y; Panchana, F; de Blas, I; Alday, V; Calderón, J. (2003). White spot syndrome virus infection in cultured *Penaeus vannamei* (Boone) in Ecuador with emphasis on histopathology and ultrastructure. *Journal of Fish Disease*. 26(8):439-50.
- Rusaini; Owens, L. (2010). Insight into the lymphoid organ of penaeid prawns: A Review. *Fish & Shellfish immunology* 29:367-377.
- Russel, R; Alenton, R; Koiwai, K; Nakamura, R; Thawonsuwan, J; Kondo, H; Hirono, I. (2019). A Hint of Primitive Mucosal Immunity in Shrimp through *Marsupenaeus japonicus* Gill C-Type Lectin. *Journal of Immunology*, 203 (8) 2310-2318, DOI: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1900156>.
- Spann, K, M; Vickers, J, E; Lester, R, J, G. (1995). Lymphoid organ virus of *Penaeus monodon* from Australia. *Disease of Aquatic Organisms*, 23:127-134.
- Sahtout, A. H; Hassan, M. D; Shariff, M. (2001). DNA fragmentation, an indicator of apoptosis, in cultured black tiger shrimp *Penaeus monodon* infected with white spot syndrome virus (WSSV). *Disease of Aquatic Organisms*, 44:155-159.

- Spann, K, M; McCulloch, R, J; Cowley, J, A; East, I, J; Walker, P, J. (2003). Detection of gill-associated virus (GAV) by *in situ* hybridization during acute and chronic infections of *Penaeus monodon* and *P. esculentus*. *Disease of Aquatic Organisms*, 56:1–10.
- Tang, K, F; Pantoja, C, R; Redman, R, M; Lightner, D, V. (2007). Development of *in situ* hybridization and RT-PCR assay for the detection of a nodavirus (PvNV) that causes muscle necrosis in *Penaeus vannamei*. *Disease of Aquatic Organisms*, 75(3):183-190, Doi: 10.3354/dao075183.
- Varela, A. (2016). Nodavirus de la mortalidad encubierta (CMNV) en camarones marinos de cultivo. Nota técnica. *Revista Repertorio Científico, Universidad Estatal a Distancia*, 19(1):33-40.
- Varela, A. (2018). Incidencia detectada del *Baculovirus penaei* en muestras de post larvas de camarón importadas en Costa Rica. *Revista Repertorio Científico, Universidad Estatal a Distancia*, 21(2):14-21.
- Varela, A. (2019). Patologías que afectan el hepatopáncreas de camarones de cultivo en América y su diagnóstico mediante histopatología diferencial, *Revista AquaTIC*, 50:13-30.
- Varela, A; Peña, N. (2013). El Virus del Síndrome de las Manchas Blancas (WSSV): una revisión y su impacto en la camaronicultura costarricense. *Revista Ciencias Veterinarias. Escuela de Medicina Veterinaria. Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad Nacional de Costa Rica*, 28(2):51-69.
- Varela, A; Valverde, J. (2019). *Baculovirus penaei* como factor de riesgo para infecciones bacterianas en hepatopáncreas de *Penaeus vannamei*. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 30(1):377-386.
- Varela, A; Peña, N; Aranguren, L, F. (2019). Microsporidiosis hepatopancreática causada por *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) en camarones de cultivo. *Revista Panorama Acuícola*. 24(2):42-48.
- Van de Braak, C, B, T; Botterblom, M, H, A; Taverne, N; Van Muiswinkel, W, B; Rombout, J, H, W, M; Van Der Knaap, W, P, W. (2002). The roles of haemocytes and the lymphoid organ in the clearance of injected *Vibrio* bacteria in *Penaeus monodon* Shrimp. *Fish & Shellfish Immunology*, 13:293–309.
- Vargas-Albores, F; Jiménez-Vega, F; Söderhäll, K. (1996). A plasma protein isolated from brown shrimp (*Penaeus californiensis*) which enhances the activation of prophenoloxidase system by beta-1, 3-glucan. *Developmental and Comparative Immunology*, 20:299-306.
- Wang, Z; Hu, L; Yi, G; Xu, H; Qui, Y; Yao, L. (2004). ORF390 of white spot syndrome virus genome is identified as a novel anti-apoptosis gene. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 325 (3):899-907.
- Wang P, H; Gu, Z, H; Wan, D, H; Liu, B, D; Huang, X, D; Weng, S, P; Yu, X, Q; He, J, G. (2013). The shrimp IKK-NF- κ B signaling pathway regulates antimicrobial peptide expression and may be subverted by white spot syndrome virus to facilitate viral gene expression. *Cellular & Molecular Immunology*, 10: 423-36.
- Wang, L; Zhi, B; Wu, W; Zhang, X. (2008). Requirement for shrimp caspase in apoptosis against virus infection. *Developmental & Comparative Immunology*, 32:706-715.
- Wongprasert, K; Khanobdee, K; Glunukarn, S. S; Meeratana, P; Withyachumnarnkul, B. (2003). Time-course and levels of apoptosis in various tissues of black tiger shrimp *Penaeus monodon* infected with white-spot syndrome virus. *Disease of Aquatic Organisms*, 55:3-10.
- Wu, J. L; Muroga, K. (2004). Apoptosis does not play an important role in the resistance of ‘immune’ *Penaeus japonicus* against white spot syndrome virus. *Journal of Fish Disease*, 27:15-21.

Wongprasert, K; Sangsuriya, P; Phongdara, A; Senapin, S. (2007). Cloning and characterization of a caspase gene from black tiger shrimp (*Penaeus monodon*)-infected with white spot syndrome virus (WSSV). *Journal of Biotechnology*, 131:9-19.

Shao, M, Y; Zhang, Z, F; Kang, K, H; Chen, Z, T; Kim, J, M. (2004). The study on the cytology and histochemistry of lymphoid organ spheroids in *Penaeus chinensis*. *Aquaculture*, 240:463-471.

Zhang, Q; Liu, S; Yang, H; Liu, S; Zhu, L; Yang, B; Jin, J; Ding, L; Wang, X; Liang, Y; Wang, Q; Huang, J . (2014). A new nodavirus is associated with covert mortality disease of shrimp. *Journal of General Virology*, 95:2700–2709.

Zhang, Q, Xu, T; Wan, X; Liu, S; Wang, X; Li, X; Dong, X; Yang, B; Huang, J. (2017). Prevalence and distribution of covert mortality nodavirus (CMNV) in cultured crustacean. *Journal of Virus Research*. 233:113-119.

Recibido: 12-05-2020

Aprobado: 20-08-2020

Versión final: 30-08-2020

