



D-104189

\$30

639.543

Jueves 09/03/2017

Donado.

ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DEL LITORAL
FACULTAD DE INGENIERIA MARITIMA Y CIENCIAS DEL MAR

**“EVALUACION CLINICA DE ENSAYOS INMUNITARIOS EN EL
CAMARON *Penaeus vannamei* ”**

Tesis de grado
Prevía a la obtención del título de:

Acuicultor

Presentada por:

VICENTE RICARDO CEDEÑO CAMPUZANO

Guayaquil-Ecuador
1998

DEDICATORIA

A mis padres :

Vicente y Briseyda

A mis *hermanas*

AGRADECIMIENTO



A mis padres por el tiempo y esfuerzo invertido en mi formación y educación, gracias por toda su confianza y apoyo durante la realización de este trabajo.

A la ESPOL y todos los que conforman la Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar, pues de una u otra manera contribuyeron para la culminación de mis estudios.

Al Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas (CENAIM) por las facilidades brindadas para la realización de este trabajo, un agradecimiento especial para su Director Jorge Calderón, Ph.D.

A la Dra. Jenny Rodríguez por su apoyo y gran paciencia para llevar adelante este proyecto, así como por su ayuda para la corrección del mismo.

A Paola por apoyarme siempre incondicionalmente en todo, gracias por tu cariño y confianza.

A Eric, Ph.D por sus correcciones, ideas y opiniones acertadas que contribuyeron a realizar un buen trabajo.

A Ernesto Valenzuela y Marcelo Muñoz, Acs. gracias por su valioso apoyo, no solo en el laboratorio, sino en todo momento y sobre todo por la amistad y confianza depositada en mí.

A todos mis compañeros tesisistas: Gonzalo, Miguel, Walter, Javier, Marcelo por toda la ayuda prestada y por haber hecho más agradable la estadía en el Centro durante la realización de esta tesis.

A todos los que quizás paso por alto gracias por su ayuda desinteresada, sin la ayuda de cada uno de ustedes este trabajo hubiera sido imposible.

DECLARACION EXPRESA



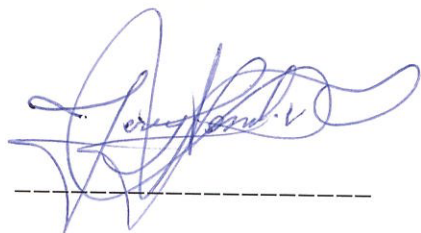
"La responsabilidad por los hechos, ideas y doctrinas expuestos en esta tesis, me corresponden exclusivamente, y el patrimonio intelectual de la misma, a la ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DEL LITORAL"

(Reglamento de Exámenes y Títulos profesionales de la ESPOL)

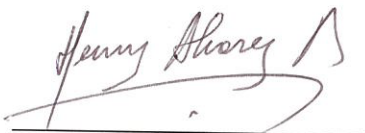


BIBLIOTECA
FAC. ING.
MARITIMA

V. Ricardo Cedeño Campuzano



Presidente del Tribunal



Miembro del Tribunal



BIBLIOTECA
FAC. ING.
MARITIMA



Director de Tesis



Miembro del tribunal

TABLA DE CONTENIDOS.

Tabla de Contenidos.....	i
Abreviaturas.....	iv
Indice de Figuras.....	vii
Indice de Tablas.....	xi
Resumen.....	xii
Introducción.....	1
I ANTECEDENTES.....	3
1.1.Sistema Inmunitario del camarón e inmunopruebas.....	3
1.2.Tipos Hemocitarios y Establecimiento de Hemogramas.....	5
1.3.Metabolismo Oxidativo asociado a la Fagocitosis y cuantificación de Radicales intermediarios de oxígeno tóxicos.....	7
1.4.Actividad Antibacteriana.....	12
1.5.Otros Factores y Proteínas Plasmáticas.....	15
1.5.1.Factor de Coagulación.....	15
1.5.2.Proteínas de Reconocimiento.....	17
1.5.2.1.Proteína fijadora de Beta Glucanos (BGBP).....	18
1.5.2.2.Las Aglutininas o Lectinas.....	18
1.5.3.La α 2-macroglobulina.....	21
1.6.Inmunoestimulación.....	23
1.7.Toxicología y Sistema Inmune.....	25

II MATERIALES Y METODOS.....	28
2.1.Material Biológico.....	28
2.1.1.Camarones y Hemolinfa.....	28
2.1.2.Cepas Bacterianas.....	28
2.2.Técnicas Bacteriológicas.....	28
2.2.1.Medios de Cultivo.....	28
2.2.2.Manejo del stock de Bacterias.....	29
2.3.Técnicas de Inmunoevaluación.....	29
2.3.1.Tratamiento de la muestra para los diferentes ensayos.....	29
2.3.2.Hemogramas.....	30
2.3.3.Protocolo para la Cuantificación del Anión Superóxido.....	30
2.3.4.Protocolo para la Cuantificación de la Actividad Antibacteriana.....	35
2.3.5.Inmunodosificaciones: Protocolo Dot-Blot tipo ELISA.....	37
2.3.6.Protocolo para la Cuantificación de Proteínas Totales.....	40
2.4.Bioensayos.....	42
2.4.1.Ensayos nutricionales.....	42
2.4.2.Ensayos Toxicológicos.....	43
2.5.Tratamiento Estadístico de datos.....	44
III RESULTADOS Y DISCUSION.....	45
3.1.Evaluación de Ensayos Inmunitarios bajo condiciones de estrés nutricional...	45

3.1.1.Primer Bioensayo.....	46
3.1.1.1.Resultados de pruebas inmunitarias del primer bioensayo.....	47
3.1.2.Segundo Bioensayo.....	57
3.1.2.1.Resultados de pruebas inmunitarias del segundo bioensayo.....	58
3.2.Evaluacion de ensayos inmunitarios bajo condiciones de intoxicacion con tilt®.....	70
3.2.1.Resultados de los muestreos.....	70
CONCLUSIONES.....	88
RECOMENDACIONES.....	92
BIBLIOGRAFIA.....	94
ANEXOS.....	101

ABREVIATURAS.

O₂⁻:	Anión Superóxido
H₂O₂:	Peróxido de hidrógeno
Ac:	Anticuerpo
Ac Mc:	Anticuerpos monoclonales
BCIP:	5-Bromo-4-Cloro-3-Indolyfosfato
BGBP:	Proteína de reconocimiento de betaglucanos
BSA:	Suero de Albúmina Bovino
CB:	Control Bacterias
CP:	Control plasma
DMSO:	Dimetil Sulfóxido
DNA:	Acido desoxiribonucleico
D.O.:	Densidad óptica
E.D.T.A.:	Etilén diamino tetra-acético
ELISA:	Enzyme linked-inmunosorbent assay
FC:	Factor de coagulación
kDa:	Kilodaltones

LB:	Luria Bertani
LC50:	Concentración letal 50%
LDCL:	Quimioluminiscencia luminol-dependiente
LPS:	Lipopolisacáridos
LPSBP:	Proteína de reconocimiento de lipopolisacáridos
M:	Molar
MHBSS:	Solución salina modificada de Hank's
MHBSS 1 X:	Solución salina modificada de Hank's con 6mM de Ca^{++} y 13 mM de Mg^{++} .
MHBSS 2 X:	Solución salina modificada de Hank's con 12mM de Ca^{++} y 26 mM de Mg^{++} .
mM:	Milimolar
mOsm:	Miliosmoles
MT:	Método turbidométrico
N:	Normal
NADPH :	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa
NBT:	Nitro blue tetrazolium
nm:	Nanómetros
PAHS:	Hidrocarburos aromáticos policíclicos

P.B.S.:	Tampón Fosfato salino sin Ca^{++} y Mg^{++}
PC:	Proteína de la coagulación
PMA:	Phorbol Myristate acetate
PO:	Fenoloxidasa
ppa:	Enzima activadora de la profenoloxidasa
ppb:	Partes por billón
ppm:	Partes por mil
proPO:	Profenoloxidasa
PV3:	Péptido Antibacteriano de <i>P.vannamei</i>
ROIs:	Radicales intermediarios de oxígeno tóxicos
rpm:	Revoluciones por minuto
SDS:	Sodio dodecil sulfato
T.A.:	Temperatura ambiente
tBHP:	tbutyl hidroperoxide
ul:	Microlitros

INDICE DE FIGURAS

Fig. 1: Esquema de la activación del Sistema profenoloxidasa por medio de LPS, β -1,3-glucanos o cambios homeostáticos. (Tomado de Söderhäll, 1989).....	4
Fig. 2: Tipos hemocitarios de la hemolinfa del camarón <i>P. vannamei</i> . (Tomado de Muñoz, 1996).....	7
Fig.3: Producción de radicales tóxicos de oxígeno por medio de la enzima oxidativa NADPH oxidasa. (Tomado de Muñoz, 1996).....	8
Fig.4: Principio de la cuantificación del anión superóxido en <i>P. vannamei</i> . por medio de la reduccción del nitroblue tetrazolium (NBT). (Después de Muñoz, 1996).....	10
Fig 5: Proteína fijadora de betaglucanos y activación del sistema proPO.....	19
Fig 6: Mecanismos de acción de las aglutininas.....	21
Fig.7: Mecanismo de inhibición de proteasas por medio de la α 2-macroglobulina. (Tomado de Muñoz, 1996).....	22
Fig.8: Protocolo para la cuantificación de anión superóxido.....	33
Fig.9: Protocolo para la cuantificación de la actividad antibacteriana del plasma de <i>P. vannamei</i>	36
Fig. 10: Protocolo para la dosificación de proteínas α 2-macroglobulina, factor de coagulación y aglutinina. (Después de Valenzuela,1996).....	39
Fig. 11: Protocolo para la cuantificación de proteínas totales del plasma de <i>P.vannamei</i>	41
Fig.12. Porcentajes de supervivencia al final del primer bioensayo.....	47

Fig13. Millones de hemocitos totales por ml de hemolinfa de <i>P. vannamei</i> para cada tipo de alimento (final del primer bioensayo), comparados con el tiempo cero.....	48
Fig. 14. Tipos hemocitarios expresados en porcentajes para cada tipo de alimento.....	50
Fig.15. Produccion del O_2^- expresado en Tasas entre el valor de hemocitos estimulados y no estimulados.....	51
Fig.16. Cuantificación de proteínas totales en el plasma. Según el método de Lowry para cada tratamiento alimenticio, comparado con el tiempo cero.....	52
Fig 17: Escala colorimétrica para la calificación de las pruebas de dot-blot.....	53
Figura 18: Resultados de inmunodosificaciones. Pruebas de Dot-Blot para aglutinina, $\alpha 2$ -macroglobulina y factor de coagulación.....	54
Figura 19. Actividad antibacteriana expresada como porcentajes de inhibición del crecimiento bacteriano.....	55
Fig.20: Análisis integrado de los efectores inmunitarios.....	56
Fig 21. Porcentajes de supervivencia en cada tratamiento con sus réplicas.....	58
Fig. 22. Millones de hemocitos.ml ⁻¹ para cada tratamiento (final del segundo bioensayo).....	60
Fig. 23. Tipos hemocitarios expresados en porcentajes para cada tratamiento (medias de los valores registrados en los tanques).....	61
Fig. 24. Producción de anión superóxido expresado en tasas luego del tratamiento en el segundo bioensayo.....	62

Fig. 25. Cantidades de proteínas totales en el plasma para cada tratamiento expresadas en $\mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$	64
Figura 26. Resultados de inmunodosisificaciones. Pruebas de dot-blot para aglutinina, $\alpha 2$ -macroglobulina y factor de coagulación (Final del segundo bioensayo).....	65
Figura 27. Actividad antibacteriana expresada como porcentajes de inhibición del crecimiento bacteriano.....	66
Fig. 28: Análisis integrado de los efectores inmunitarios. Se representa el índice de cada prueba en función de la dieta suministrada (índice parcial) y el índice inmunitario obtenido para cada grupo de animales (índice global).....	68
Fig.29: Resultados de hemogramas del primer muestreo.....	72
a)Millones de hemocitos totales por ml de hemolinfa.	
b)Porcentajes de tipos hemocitarios.	
Fig.30: Resultados de hemogramas del segundo muestreo.....	73
a)Millones de hemocitos totales por ml de hemolinfa.	
b)Porcentajes de tipos hemocitarios.	
Fig.31: Resultados obtenidos con las pruebas de Cuantificación del anión superóxido en los dos muestreos realizados (expresado en tasas).....	75
Fig.32: Resultados obtenidos con las pruebas de Cuantificación del anión superóxido en el Primer muestreo.....	77
Fig.33: Resultados obtenidos con las pruebas de Cuantificación del anión superóxido en el Segundo muestreo.....	77
Fig.34: Cuantificación de proteínas totales (Lowry), expresadas en $\mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ de plasma de camarón.....	79
a) Primer muestreo.	

b) Segundo muestreo.

Fig.35: Inmunodosificaciones de tipo Dot-Blot con el anticuerpo 40E10 (antiaglutinina).80

a) Resultados del primer muestreo.

b) Resultados del segundo muestreo.

Fig.36: Determinación de la actividad antibacteriana.....81

a) Resultados del primer muestreo.

b) Resultados del segundo muestreo.

Fig.37: Inmunodosificaciones de tipo Dot-Blot con el anticuerpo 41B12 (anti α 2-macroglobulina).....82

a) Resultados del primer muestreo.

b) Resultados del segundo muestreo.

Fig.38: Inmunodosificaciones de tipo Dot-Blot para el anticuerpo 42E8 (anti factor de coagulación).....83

a) Resultados del primer muestreo.

b) Resultados del segundo muestreo.

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Coeficientes de variación de los índices obtenidos.....57

Tabla 2: Coeficientes de variación de los índices obtenidos.....69

RESUMEN

La validación clínica de las pruebas inmunitarias disponibles para el camarón *Penaeus vannamei* se presenta como una necesidad para contar con técnicas confiables que permitan medir la condición del animal bajo diferentes situaciones, e identificar inmunomarcadores.

Para esto en el presente trabajo se realizaron dos tipos de bioensayos. En el primero varios lotes de animales fueron alimentados con diferentes tipos de dieta (estrés de tipo nutricional). En el segundo bioensayo los animales fueron sometidos a la inyección de diferentes dosis del fungicida Tilt[®] (estrés tóxico).

En ambos bioensayos los animales fueron evaluados individualmente con las seis pruebas inmunitarias disponibles: hemogramas, cuantificación del anión superóxido, actividad antibacteriana del plasma e inmunodifusiones ELISA de tipo dot-blot contra tres tipos de proteínas inmunitarias. En paralelo a estos ensayos se realizó la cuantificación de las proteínas totales del plasma del camarón, para contar con un criterio adicional que nos permita discutir los resultados.

Los resultados obtenidos en ambos tipos de bioensayos indican que las pruebas evaluadas poseen suficiente sensibilidad para detectar diferencias en la respuesta inmune según el tipo de condiciones bajo las que se encuentran los animales y pueden ser eficaces en la identificación de indicadores de un estado de mala nutrición o de intoxicación de los camarones.

INTRODUCCION

El rápido desarrollo de la acuicultura del camarón en el Ecuador como una actividad industrial ha estado ligado a progresos zootécnicos y a un incremento en el número de camaroneras. Este gran desarrollo ha conducido a que esta actividad se presente como una de las que mayores fuentes de divisas generan para el país, de aquí que su subsistencia es de gran importancia debido al enorme aporte económico que representa.

Debido a la existencia de un sinnúmero de problemas de orden ecológico y enfermedades que afectan esta industria es de radical importancia el establecimiento de herramientas de diagnóstico sensibles y confiables para la detección precoz de los patógenos y subsecuentemente la elaboración de medidas de prevención y eventualmente de tratamientos adecuados.

Paralelamente a la estrategia de desarrollo de herramientas de diagnóstico de los patógenos, ha sido considerado como una prioridad el desarrollo de pruebas para la evaluación del estado inmunitario del camarón, ya que un animal con cualquier tipo de estrés puede ser conducido a una inmunodeficiencia que lo haría más susceptible a las infecciones. De desarrollarse éstas, se tendría la posibilidad de chequear los animales y en caso de detectar alguna anomalía poder regular paulatinamente las condiciones del estanque, evitando el estrés de los animales y por ende la aparición y propagación de enfermedades.

Además, tales herramientas pueden ser utilizadas para estudiar los mecanismos de defensa de los camarones, entender cómo funcionan y eliminan a los patógenos, conocer qué componentes actúan en caso de infección y también emprender la selección de animales con altas capacidades inmunitarias.

En trabajos realizados en el CENAIM en cooperación con el IFREMER se han desarrollado seis pruebas inmunitarias, sin embargo estas pruebas no han sido clínicamente evaluadas, las pruebas desarrolladas hacen posible al momento determinar *hemogramas* por observación

de muestras frescas en un microscopio óptico provisto de un accesorio de contraste de fases (Muñoz, 1996). En lo referente a mecanismos de defensa celular se puede evaluar el *choque respiratorio* (proceso post-fagocitario de destrucción del invasor, que se caracteriza por una intensa actividad metabólica en la que se generan varios radicales tóxicos de oxígeno) por medio de la cuantificación del anión superóxido (Muñoz, 1996). La *actividad antibacteriana* puede ser detectada y cuantificada por medio de un método turbidométrico cuyo principio se basa en la medición de la turbidez de suspensiones bacterianas con un espectrofotómetro en presencia o ausencia de plasma de camarón (Tapia, 1997). La disponibilidad de anticuerpos monoclonales que reconocen factores plasmáticos como son el factor de coagulación, aglutininas, α 2-macroglobulinas (Rodríguez, 1995) ha permitido realizar pruebas de inmunodosificación de tipo dot-blot (Valenzuela, com. per.). Paralelamente se ha realizado la cuantificación de proteínas plasmáticas totales por medio del método de Lowry (Lowry, 1951) de acuerdo a un protocolo miniaturizado en microplacas (CENAIM).

En el presente trabajo se inicia la validación clínica de estas pruebas de inmunoevaluación. Para ésto, animales fueron alimentados con tres diferentes dietas para posteriormente diferenciar el efecto de éstas sobre la condición inmunitaria de los camarones. Por otra parte, se realizó un bioensayo para ver el efecto de un poluyente (Tilt®) encontrado en el medio, sobre los efectores de la respuesta inmune en el camarón.

1. ANTECEDENTES

1.1 SISTEMA INMUNITARIO DEL CAMARON E INMUNOPRUEBAS

Los crustáceos y todos los artrópodos en general no poseen un sistema inmunitario adaptativo basado en la especificidad y en la memoria, sin embargo son capaces de reaccionar contra los patógenos invasores por medio de mecanismos inmunitarios, celulares y humorales (Söderhäll & Cerenius, 1992) que operan para mantener la integridad del organismo. Este sistema inmune carece de la complementariedad antígeno-anticuerpo característica de los vertebrados, pero puede reaccionar efectivamente para destruir los microbios invasores y agentes parasíticos (Christensen & Napp, 1988).

En los crustáceos como en otros invertebrados casi la totalidad de sus mecanismos de defensa depende de mecanismos no específicos como son fagocitosis, encapsulación, formación de nódulos, coagulación (Smith & Söderhäll, 1986), aglutinación de bacterias y actividad antibacteriana.

La respuesta inmune en los artrópodos se presenta en dos fases, una inmediata no inducible asociada a los efectores celulares (hemocitos), quienes son elementos cruciales en reacciones inmunes como la fagocitosis, eventos de nodulación, encapsulación, además catalizan el proceso de coagulación y almacenan las enzimas de la cascada profenoloxidasa (responsable de la melanización). Es ampliamente reconocido que las reacciones celulares en invertebrados están en su mayoría acompañadas por melanización. La enzima clave en la síntesis del pigmento melanina es la fenoloxidasa, la cual está presente en la sangre de los artrópodos (hemolinfa) como una proenzima inactiva, profenoloxidasa (proPO). Esta proenzima es activada por componentes de la pared celular microbial como los β -1,3-glucanos de hongos, los lipopolisacáridos (LPS) de bacterias Gram negativas o los peptidoglicanos de bacterias Gram positivas (Johansson & Söderhäll, 1989).

Aunque la cutícula forma una barrera estructural y química, es necesario un eficiente sistema interno de defensa inmune que pueda evitar el ingreso de los microorganismos a la cavidad del cuerpo a través de las heridas o durante la muda. Así un importante proceso en los crustáceos acuáticos es el rápido sellado de las heridas para prevenir pérdidas de hemolinfa y también evitar el ingreso de microorganismos, lo que depende de la reacción de coagulación, que en los crustáceos, es una reacción de defensa rápida y eficiente que implica la reticulación de una proteína plasmática, el factor de coagulación, por acción de una enzima celular tipo transglutaminasa (Söderhäll & Cerenius, 1992)

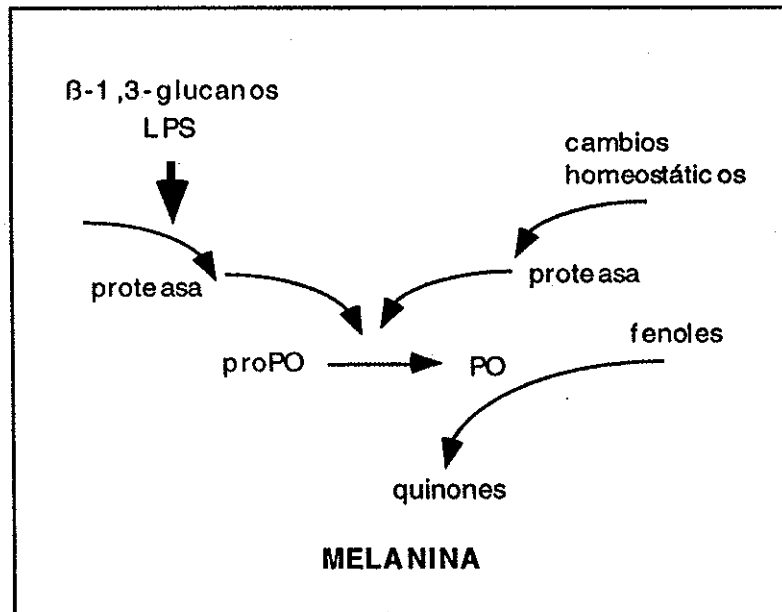


Fig. 1: Esquema de la activación del Sistema profenoloxidasas por medio de LPS, B-1,3-glucanos o cambios homeostáticos. (Tomado de Soderhäll, 1989).

Aparte de estas reacciones inmediatas de defensa los artrópodos tienen inmunidad humoral mediante proteínas y péptidos antibacterianos con propiedades microbicidas contra bacterias Gram +, Gram - y hongos. (Johansson & Söderhäll, 1989). En los artrópodos esta inmunidad humoral puede ser inducible, como en el caso de los insectos (segunda fase) o constitutiva como en el limulus (cangrejo herradura).

Comparado con los conocimientos adquiridos en ganadería y veterinaria, la adquisición y disponibilidad de criterios para la evaluación del estado de salud del camarón, o de otros

invertebrados en general, son prácticamente inexistentes. Investigaciones en esta área han sido dedicadas a estudios ecotoxicológicos en peces (Bainy, A.C.D., 1996) y bivalvos (Bachère *et al.*, 1995; Anderson, 1994).

En los camarones peneidos varios ensayos están disponibles y pueden ser utilizados en la evaluación del estado fisiológico de estos animales. Por ejemplo la capacidad de los hemocitos de producir ROIs (reactivos intermediarios de oxígeno tóxicos) durante el choque respiratorio asociado a la fagocitosis puede medirse mediante el empleo de técnicas como son la quimioluminiscencia o la reducción del NBT (nitroblue tetrazolium). Dichas técnicas pueden ser empleados como ensayos funcionales para evaluar el potencial inmune a nivel celular y a nivel del organismo. Sin embargo estas técnicas deben ser validadas por medio del análisis de variabilidades individuales en relación a parámetros fisiológicos como edad, sexo, estadio de muda (Bachère *et al.*, 1995).

A continuación se describirán ciertos efectores y mecanismos de defensa, los medios con los que se cuenta para estudiarlos y su posible utilización en la evaluación del estado inmune del camarón.

1.2. TIPOS HEMOCITARIOS Y ESTABLECIMIENTO DE HEMOGRAMAS

Tres tipos de hemocitos circulantes pueden ser aislados de la hemolinfa de crustáceos y pueden ser separados por centrifugación en gradiente de Percoll. Los tres tipos de hemocitos pueden ser diferenciados por criterios morfológicos, ultraestructurales (microscopía electrónica), funcionales, antigénicos (mediante anticuerpos monoclonales), e histoquímicos con diferentes técnicas de tinción para células (Bachère *et al.*, 1995 a ; Bachère *et al.*, 1995 b ; Söderhall & Cerenius, 1992).

Cada tipo de hemocito cumple funciones determinadas como parte de los mecanismos de inmunidad celular. Los hemocitos granulares se caracterizan por poseer grandes gránulos, núcleo pequeño y excéntrico, inclusiones citoplasmáticas así como un retículo

endoplasmático liso y ribosomas libres en el citoplasma. Estos hemocitos son el depósito de las enzimas que constituyen el sistema proPO en los crustáceos (Söderhall & Smith, 1983 *fide* Muñoz 1996). Los hemocitos semigranulosos poseen un núcleo esférico o en forma de herradura y poseen muchos gránulos pequeños de forma redondeada, estos hemocitos se encuentran asociados a procesos de activación del sistema proPO en crayfish, además cumplen funciones de fagocitosis, encapsulación y nodulación en peneidos (Johansson & Söderhall, 1989, Söderhall & Cerenius, 1992). Los hemocitos hialinos presentan un núcleo central redondeado, ausencia de gránulos o en muy poco número. En el cangrejo de río estarían implicados en procesos de fagocitosis (Johansson & Söderhall, 1989) en tanto que en los peneidos cumplirían un rol en la coagulación (Omori, 1989 *fide* Muñoz, 1996).

En el hombre el hemograma constituye el primer examen de evaluación de salud de un individuo, los hemogramas permiten determinar el número y proporción de las diferentes células sanguíneas.

En los crustáceos la elaboración de un hemograma puede realizarse con técnicas que van desde la diferente fijación de colorantes, hematoxilina-eosina (Tsing, 1989), hasta técnicas muy sofisticadas como citometría de flujo.

La citometría de flujo es un poderoso método para el análisis debido a que la medición cuantitativa de multiparámetros sobre gran número de células individuales puede ser hecho sin la necesidad de hacer un "pool" de células de diferentes individuos. Además, la citometría de flujo permite clasificar un gran número de células en un corto tiempo y la automatización evita mucho la subjetividad inherente en microscopía. La citometría de flujo se ha utilizado para analizar la cinética de los hemocitos a través del ciclo de muda del camarón *P. japonicus* (Sequeira *et al*, 1995).

En el camarón *P. vannamei* se ha ensayado con éxito la técnica de la microscopía óptica con contraste de fases para clasificar los hemocitos. Los hemocitos granulosos son fácilmente diferenciables por la presencia de gránulos. Sin embargo, los otros hemocitos no son fáciles

de identificar y se presentan como una serie continua de dos tipos extremos: los hialinos, con muy poca refringencia que se traduce en una coloración azul marino y, los semigranulosos más refringentes y de un color celeste. Esta técnica presenta las ventajas de ser rápida, sencilla y de no requerir de ningún tratamiento especial para las células (Muñoz, 1996).

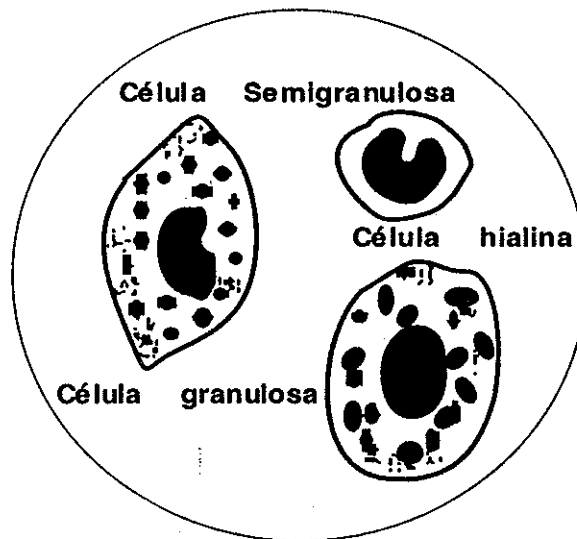


Fig. 2: Tipos hemocitarios de la hemolinfa del camarón *P. vannamei*. (Tomado de Muñoz, 1996).

1.3. METABOLISMO OXIDATIVO ASOCIADO A LA FAGOCITOSIS Y CUANTIFICACION DE RADICALES INTERMEDIARIOS DE OXIGENO TOXICOS

El choque respiratorio es un proceso propio de las células fagocitarias maduras. La fijación de una partícula no ingestible en la superficie celular cambia en pocos segundos la condición de la célula, la lleva de un estado metabólico latente a un estado que se manifiesta con un incremento en la actividad metabólica celular. Esta transición está asociada con una serie de cambios característicos, de los cuales el más importante es el incremento en el consumo de oxígeno. El evento inicial del choque respiratorio es aparentemente la activación de una enzima oxidativa (NADPH oxidasa) capaz de capturar moléculas libres de oxígeno y

convertirlas en una serie de radicales de oxígeno, entre éstos el anión superóxido, O_2^- , peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y otros radicales tóxicos (Klein J., 1982) Figura 3.

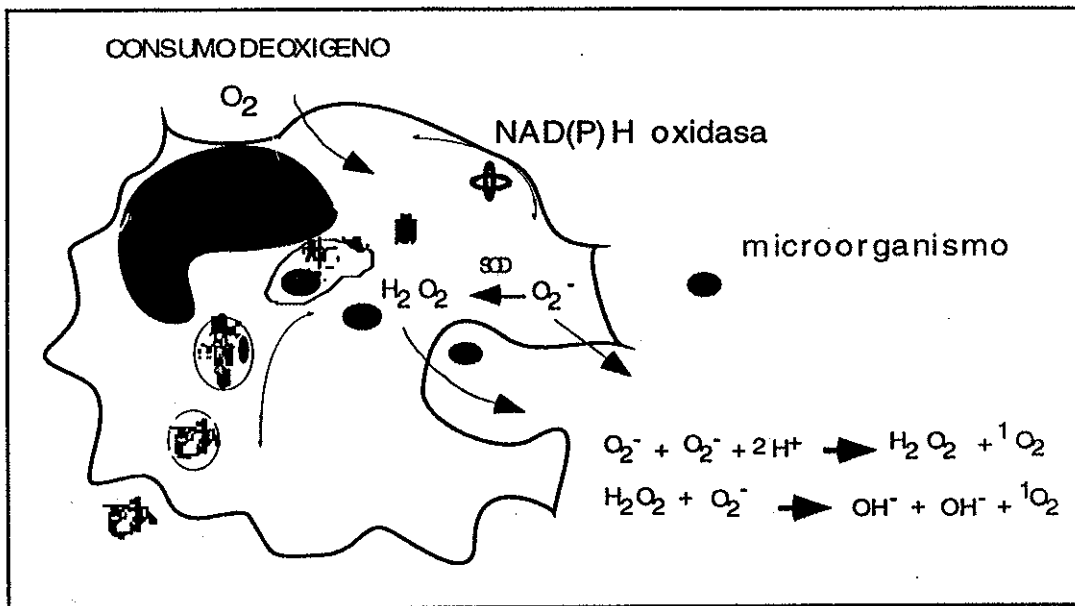


Fig.3: Producción de radicales tóxicos de oxígeno por medio de la enzima oxidativa NADPH oxidasa. (Tomado de Muñoz, 1996).

En los mamíferos los fagocitos, que incluyen neutrófilos, eosinófilos, basófilos y monocitos tienen un rol en la defensa del huésped y están involucrados en la digestión de material extraño o tejido dañado. Todos los fagocitos sanguíneos contienen gránulos ricos en enzimas lisosomales, los cuales se degranulan durante la fagocitosis. En adición a esta degranulación y liberación de enzimas hidrolíticas estas células son capaces de entrar en el estado metabólico conocido como "choque respiratorio u oxidativo" (Pipe, 1992).

La activación del choque respiratorio puede ser iniciado por procesos fisiológicos incluyendo fagocitosis de partículas como bacterias, zimosan o por agentes solubles como el phorbol myristate acetate (PMA) (Pipe, 1992).

Varios ensayos de detección de reactivos intermediarios de oxígeno tóxicos (ROIs) han sido usados para medir respuestas inmunotoxicológicas y reacciones parásito huésped. Entre los métodos más populares para cuantificar ROIs están los basados en la reducción del Nitroblue tetrazolium (NBT) y la quimioluminiscencia luminol dependiente (LDCL) (Anderson, 1994).

El NBT puede ser utilizado para ensayos cualitativos o cuantitativos del O_2^- generado por los hemocitos. Adicionalmente para cuantificar el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) extracelular producido por hemocitos, se puede utilizar la oxidación del rojo de fenol como un indicador. (Song y Hsieh, 1994).

Los oxiradicales, tales como anión superóxido (O_2^-), pueden reducir el NBT amarillo soluble en agua, a formazán de color azul oscuro insoluble. Esta reacción puede ser observada en los hemocitos bajo el microscopio óptico o puede ser cuantificada espectrofotométricamente después de la extracción y solubilización del formazán de las células (Anderson, 1994).

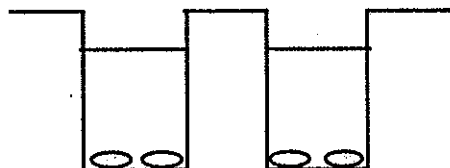
En invertebrados existen muy pocos reportes concernientes a la liberación de metabolitos de oxígeno a partir de los hemocitos. En los moluscos se han reportado algunos resultados contradictorios. Cheng concluyó que los hemocitos de la almeja *Mercenaria mercenaria* no producen metabolitos reactivos de oxígeno y desconfía sobre la liberación de enzimas lisosomales con actividad microbiciida. Sin embargo, otros reportes en especies de bivalvos y gasterópodos han demostrado la liberación de varios componentes del choque respiratorio (Pipe, 1992).

Principio de cuantificación del anión superóxido

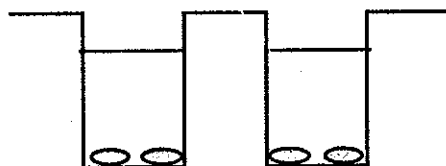
- Reacción para la obtención de formazán a partir del anión superóxido (O_2^-)



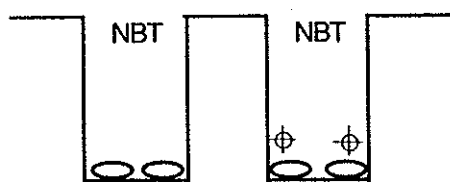
1. Se adicionan las células. Preparación del primocultivo de hemocitos.



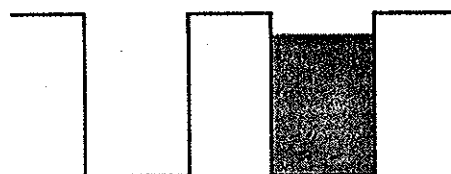
2. Se adiciona el estimulante para su respectivo tratamiento.



3. Reacción de NBT con el anión superóxido producido por las células.



4. Formazán solubilizado



- Células fijas.
- Anión superóxido
- Estimulante
- Formazán solubilizado

Fig.4: Principio de la cuantificación del anión superóxido en *P.vannamei* por medio de la reducción del nitroblue tetrazolium (NBT). (Después de Muñoz, 1996).

El ensayo de reducción del NBT ha sido exitosamente aplicado en estudios de producción de ROIs por hemocitos de la ostra *Crassostrea virginica* (Anderson, 1994) así como en otras especies como scallops (LeGall *et. al*, 1991, *fide* Anderson, 1994) y mejillones (Pipe, 1992, *fide* Anderson, 1994). La generación de anión superóxido por hemocitos del mejillón *Mytilus edulis* fue investigada y los resultados demostraron que los hemocitos eran capaces de liberar cantidades de O_2^- y de H_2O_2 que podían ser medidas, cuyas cuantificaciones se basan en la reducción del NBT, pudiendo utilizarse la oxidación de rojo de fenol para cuantificar el H_2O_2 . Un incremento en la liberación de metabolitos reactivos de oxígeno puede ser inducido por la adición de estimulantes solubles o particulados (Pipe, 1992).

⚡ Diferencias en la actividad de reducción del NBT fue examinada en varios bivalvos: la ostra del este, *Crassostrea virginica*, la almeja de concha suave *Mya arenaria*, la almeja de concha dura *Mercenaria mercenaria* y el mejillón *Geukensia demissa* (Anderson, 1994).

En crustáceos, Bell y Smith (1993) examinaron la producción de anión superóxido por células hialinas del cangrejo de playa *Carcinus maenas* y estudiaron las características de este fenómeno *in vitro*. Se logró determinar que las células hialinas producen aniones superóxido cuando son estimuladas con una gran variedad de moléculas inductoras (PMA, Lipopolisacáridos, fitohemaglutinina, concanavalina A) lo que podría indicar un gran número de receptores en la membrana del fagocito.

Especies reactivas de oxígeno generadas por el camarón tigre *Penaeus monodon* fueron analizadas por los métodos mencionados anteriormente realizando adicionalmente una comparación del efecto de inmunoestimulantes como PMA, zimosan, β -glucanos sobre la generación de especies reactivas de oxígeno. Se determinó que los β -glucanos ejercían el más fuerte efecto seguido por zimosan y PMA tanto en la producción de O_2^- como H_2O_2 aunque en este último se registraron grandes variaciones individuales en los animales (Song & Hsieh, 1994).

La reducción del nitroblue tetrazolium es un ensayo utilizado rutinariamente para determinar la actividad oxidativa de los macrófagos y de células fagocíticas de diferentes animales durante el proceso de fagocitosis. La implementación de este ensayo en *P.vannamei* (Muñoz, 1996) puede proporcionar una herramienta interesante para evaluar la respuesta inmunitaria del camarón y entregar información aplicable a la acuicultura de peneidos.

1.4. ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

Se han registrado para invertebrados numerosas moléculas que matan células extrañas o microorganismos, tales factores son usualmente no específicos y sus efectos varían desde desinfección general hasta lisis de enlaces peptidoglicanos (lisozimas) (Chisholm & Smith, 1992).

En los crustáceos los conocimientos sobre inmunidad humoral son muy limitados y la información disponible es muy escasa, por lo que se debe recurrir a conocimientos adquiridos en otros artrópodos (insectos y limulus) para entender este tipo de reacciones de defensa en los crustáceos. Los insectos han sido evolutivamente exitosos, se estima que el 90% de las especies conocidas en el reino animal pertenecen a esta clase. Este éxito se puede atribuir a varias razones entre las cuales podemos listar las potentes reacciones antibacterianas de defensa (Cociancich *et al*, 1994).

En los crustáceos las observaciones de actividad antibacteriana están restringidas a unas pocas especies económicamente importantes, entre las cuales están, camarones (Adams, 1991, *fide* Chisholm & Smith, 1995), la jaiba azul *Callinectes sapidus* (McCumbre & Clem, 1977, *fide* Chisholm y Smith, 1992), los cangrejos de río *Pacifastacus leniusculus* (Nyhlén & Unestam, 1980, *fide* Chisholm y Smith, 1992), *Panulirus argus*, *P. interruptus*, *Homarus americanus* y el cangrejo de playa *Carcinus maenas* (Chisholm y Smith, 1992), otro crustáceo donde la actividad antibacteriana ha sido reportada es el camarón tigre *P. monodon* (Adams, 1991, *fide* Noga *et al.*, 1996).

La presencia de actividad antibacteriana en los hemocitos del cangrejo de playa (*Carcinus maenas*) fue investigada por Chisholm y Smith (1992) utilizando una selección de bacterias gram positivas y gram negativas, encontrándose que la actividad antibacteriana contra estos dos tipos de bacterias residía exclusivamente en los hemocitos granulares. A pesar de que la actividad antibacteriana reside en la misma población celular que almacena el sistema profenoloxidasa, parece no haber relación entre la actividad antibacteriana y la actividad fenoloxidasa en si, sin embargo otros componentes del sistema proPO podrían estar involucrados. El estudio realizado demostró que el factor (o los factores) antibacteriano existe en los hemocitos y está ausente del plasma, también se pudo conocer que el factor (o factores) es independiente de los iones de calcio (Ca^{++}), estable al calor y activo a alta concentración.

Mientras la actividad antibacteriana asociada a hemocitos ha sido descrita en diferentes invertebrados (la mayoría en insectos), son pocos los estudios que han descrito esta actividad en invertebrados marinos (Lehrer & Ganz, 1990, *fide* Chisholm & Smith, 1994).

En el cangrejo de playa la actividad antibacteriana probó ser 90% efectiva en 60 minutos contra *Psychrobacter immobilis* (apenas 10% de sobrevivencia) y se mantuvo estable al calor e independiente de cationes divalentes. La actividad antibacteriana reside exclusivamente en las células granulares y datos preliminares indican que la respuesta es de carácter no lítico (Chisholm & Smith, 1992; Chisholm, 1993). Desafortunadamente hay muy poca similitud entre los resultados obtenidos en *C. maenas* y reportes preliminares de actividad antibacteriana en otros crustáceos, especialmente con respecto a la ubicación de esta actividad (hemocitos, plasma o hepatopáncreas), fuerza de la respuesta y los mecanismos de acción contra bacterias susceptibles. A la fecha no se puede afirmar si la actividad antibacteriana no lítica, observada en células de *C. maenas* puede estar presente en otras especies de crustáceos (Chisholm & Smith, 1995).

La hemolinfa del crustáceo brachiuro *Callinectes sapidus* posee actividad bactericida y es altamente inhibitoria contra bacterias aisladas de su caparazón. La actividad microbiciada en la hemolinfa del cangrejo azul es activa contra varios organismos Gram negativos. Ha sido recientemente demostrado que la mayoría de las bacterias residentes sobre el caparazón del cangrejo azul son susceptibles a esta actividad antibacteriana. Esta actividad contra bacterias que habitan la superficie del caparazón del cangrejo azul sugiere que la hemolinfa juega un rol de defensa contra la flora endógena (Noga *et al.*, 1996).

La enfermedad del caparazón es común en crustáceos decápodos y se caracteriza por ser un síndrome que produce varios tipos de lesiones erosivas en el caparazón (Johnson, 1983; Sinderman & Lightner, 1988, *fide* Noga *et al.*, 1994). La prevalencia de esta enfermedad ha sido asociada a ambientes estresantes, tales como lugares de acuicultura intensiva, o sitios polucionados. Estudios en el cangrejo azul han demostrado que si los niveles de actividad antibacteriana son bajos es más probable el desarrollo de la enfermedad del caparazón. Noga y colaboradores (1994). han determinado que en las áreas riverinas era más común observar la presencia de la enfermedad, ésto se atribuyó a que dichas áreas son las más polucionadas debido a que recibían todas las descargas de desechos (Noga *et al.*, 1994).

Los sistemas de defensa de los invertebrados marinos son por naturaleza altamente sensibles a cambios homeostáticos. Debido a ésto, en años recientes, ha surgido considerable interés en explorar la capacidad inmune como un biomarcador para cambios o perturbaciones ambientales (Smith & Johnston, 1992, *fide* Chisholm & Smith 1994). En Escocia Chisholm & Smith (1994) investigaron el efecto de la temperatura ambiental sobre la actividad antibacteriana en el cangrejo de playa *C. maenas*. A pesar de las amplias variaciones en los valores derivados de cada parámetro, los resultados mostraron una poderosa actividad microbiciada que estuvo presente para todos los meses excepto en Febrero y Agosto que coincidía con los meses de temperatura más baja y más alta del año respectivamente. Esto enfatiza la importancia de los factores ambientales sobre la capacidad

inmune, un fenómeno de interés no sólo para el cultivo comercial de mariscos sino también para el uso de parámetros inmunes como biomarcadores de perturbaciones ambientales.

En el camarón *P. vannamei* la actividad antibacteriana de la hemolinfa puede ser cuantificada por medio de un método turbidométrico cuyo principio se basa en la medición de la turbidez de suspensiones bacterianas en un espectrofotómetro, en presencia o ausencia de plasma de camarón (Tapia, 1996).

1.5. OTROS FACTORES Y PROTEINAS PLASMATICAS

Aparte de la hemocianina, proteína respiratoria que es cuantitativamente la más importante de las proteínas circulantes en crustáceos, otros componentes con potenciales funciones inmunes tales como el factor de coagulación, $\alpha 2$ -macroglobulina y aglutinina han sido identificados en el camarón *P. japonicus*. Su caracterización y aislamiento preliminar ha sido facilitado por el uso de anticuerpos monoclonales específicos preparados para esta especie de camarón (Rodríguez, 1995), mostrando además que algunas de las proteínas son originadas o secretadas por diferentes poblaciones de hemocitos.

El hecho de contar con anticuerpos monoclonales hacen factible su utilización en inmunodiosificaciones, las mismas que permitirían explorar las cualidades de estas proteínas como inmunomarcadores.

1.5.1. Factor de Coagulación

Como los artrópodos tienen un sistema circulatorio abierto, las heridas deben cerrarse rápidamente para evitar pérdidas de sangre y el ingreso de microorganismos patógenos que causen una infección, esta reacción constituye la coagulación.

Aunque la hemolinfa de los artrópodos es fácilmente sujeta a agregación de hemocitos y coagulación del plasma, muy poca atención ha sido puesta en estudios sobre estos procesos, con excepción del grupo *Limulidae* (*Subphylum Chelicerata*) (Söderhall & Cerenius, 1992).

La coagulación ha sido ampliamente estudiada en los cangrejos herradura (*Limulus polyphemus* y *Tachypleus tridentatus*) en los que todas las proteínas necesarias para la reacción de coagulación están localizadas dentro de las vesículas de los amebocitos. Las bacterias que entran en la cavidad del cuerpo a través de una herida pueden liberar LPS de sus paredes celulares, y estos polisacáridos pueden inducir una liberación exocitótica de la cascada de coagulación en el plasma. Una vez liberados en el plasma los LPS pueden inducir la activación del sistema de coagulación, que comprende una cascada de serinas proteasas y un coagulógeno (Armstrong, 1985 *fide* Söderhall & Cerenius, 1992).

En crustáceos tres tipos de procesos de coagulación han sido definidos: agregación de hemocitos (tipo A), completa gelación del plasma (tipo C) y un intermediario entre estos dos tipos (tipo B). En el tipo A la coagulación está caracterizada porque la hemolinfa se mantiene fluida y sólo los factores celulares se aglutinan sin coagulación del plasma. En el tipo B está involucrada la agregación celular junto con una limitada coagulación del plasma y en el tipo C la lisis de los corpúsculos explosivos causa coagulación del plasma con poca agregación celular (Tait, 1911, *fide* Martin *et al.*, 1991).

La gelación del plasma se produce por polimerización y reticulación del factor de coagulación, proceso que depende de la acción de una enzima celular, semejante a una transglutaminasa, activada por cambios homeostáticos (Bruner-Lorand *et al.*, 1996, *fide* Muñoz, 1996) requiriendo de la presencia de calcio (Ca^{++}) (Durliat & Vrankx, 1976; Kopacek *et al.*, 1993, *fide* Muñoz, 1996).

La presencia de una proteína plasmática de coagulación es uno de los más controversiales problemas de serología en decápodos. Los datos a menudo son inconsistentes y varían de acuerdo a las especies en consideración. Una electroforesis llevada a cabo en suero y plasma del crayfish *Astacus leptodactylus* muestra en el plasma la presencia de un componente que juega un rol en la coagulación, debido a que éste desaparece después de la gelación del plasma (Durliat, Vrankx, 1976). Una proteína responsable de la formación

del coágulo fue aislada del plasma del cangrejo de río *Pacifastacus leniusculus*. La proteína llamada proteína de la coagulación (PC), es una lipoglicoproteína, que consiste de dos subunidades de 210-kDa, asociadas covalentemente por puentes disulfuro. La PC probó ser un sustrato para la transglutaminasa (Kopacek, Hall, Söderhall, 1993). La PC ha sido aislada y parcialmente secuenciada en *P. vannamei* y *P. californiensis* (Vargas, com. per.).

En *P. japonicus* una proteína plasmática de 180 kDa, ha sido identificada y purificada como un factor de coagulación, existiendo además el anticuerpo monoclonal 42E8 contra ella. Este anticuerpo es también reactivo contra el plasma de *P. vannamei* (Rodríguez *et al*, 1995, *fide* Bachère *et al*, 1995).

1.5.2. Proteínas de reconocimiento

Dado que los invertebrados no sintetizan anticuerpos, otras moléculas deben ser responsables del reconocimiento del no-propio (non-self).

Las proteínas de reconocimiento en los artrópodos, son moléculas del sistema inmunitario encargadas del reconocimiento de partículas extrañas. Estas proteínas identifican residuos glucídicos que se encuentran en las paredes celulares de microorganismos, como los β -1,3-glucanos (β GBP), lipopolisacáridos (LPS) y peptidoglicanos. Aunque las LPS o los β -glucanos pueden activar directamente la cascada de coagulación y el proPO en el cangrejo herradura, la presencia de proteínas de reconocimiento puede ayudar en la activación de dichos sistemas (Vargas-Albores, *et al.*, 1996).

En los crustáceos, dos tipos de proteínas parecen estar involucradas en los procesos de reconocimiento: aglutininas o lectinas que reaccionan con lipopolisacáridos bacteriales (LPS) y proteínas de fijación a los β -1,3-glucanos (β GBP). Sin embargo estas proteínas de por sí no son capaces de destruir material extraño y otros sistemas de defensa están también involucrados.

1.5.2.1. Proteína fijadora de Beta glucanos (βGBP)

En el cangrejo de río, *P. leniusculus*, ha sido purificada del plasma una βGBP activadora del sistema proPO (Duvic & Söderhall, 1990).

Una proteína de reconocimiento de β-glucanos (βGBP) ha sido identificada del plasma del camarón café *P. californiensis* utilizando un antisuero policlonal contra una βGBP del cangrejo de río (*P. leniusculus*). La proteína fue purificada por cromatografía de inmunoafinidad y sus propiedades moleculares y biológicas han sido descritas. La βGBP del camarón café es una proteína monomérica con una masa molecular de 100 kDa, similar a las βGBP descritas para otros crustáceos. Esta proteína es capaz de mejorar la activación del sistema profenoloxidasa inducido por laminarina (Vargas-Albores *et al*, 1996).

1.5.2.2. Las aglutininas o lectinas

Lectinas humorales presentes en la mayoría de los fluidos del cuerpo de los invertebrados son los principales candidatos para cumplir un rol en el reconocimiento de polisacáridos y glicoconjugados. Las lectinas humorales pueden aglutinarse o fijarse y así inmovilizar parásitos o microbios mediando la subsecuente fagocitosis, encapsulación y melanización. Esto ha demostrado que las lectinas humorales de los invertebrados pueden funcionar como opsoninas (Vasta, 1990).

Las lectinas pueden ser de tipo constitutivo e inducible, siendo constitutivos si están presentes siempre en la hemolinfa e inducibles si a más de estar presentes aumentan su cantidad frente a un estímulo. Rowley y Ratcliffe (1980, *fide* Tapia 1997) determinaron que las aglutininas no inducidas presentes en la langosta *Locusta migratoria* contribuían en la eliminación de microorganismos invasores fomentando una aglutinación acelerada, formándose grandes masas bacteriales, ideales para la fagocitosis y formación de nódulos (Chadwick & Dunphy, 1986 *fide* Tapia, 1997).

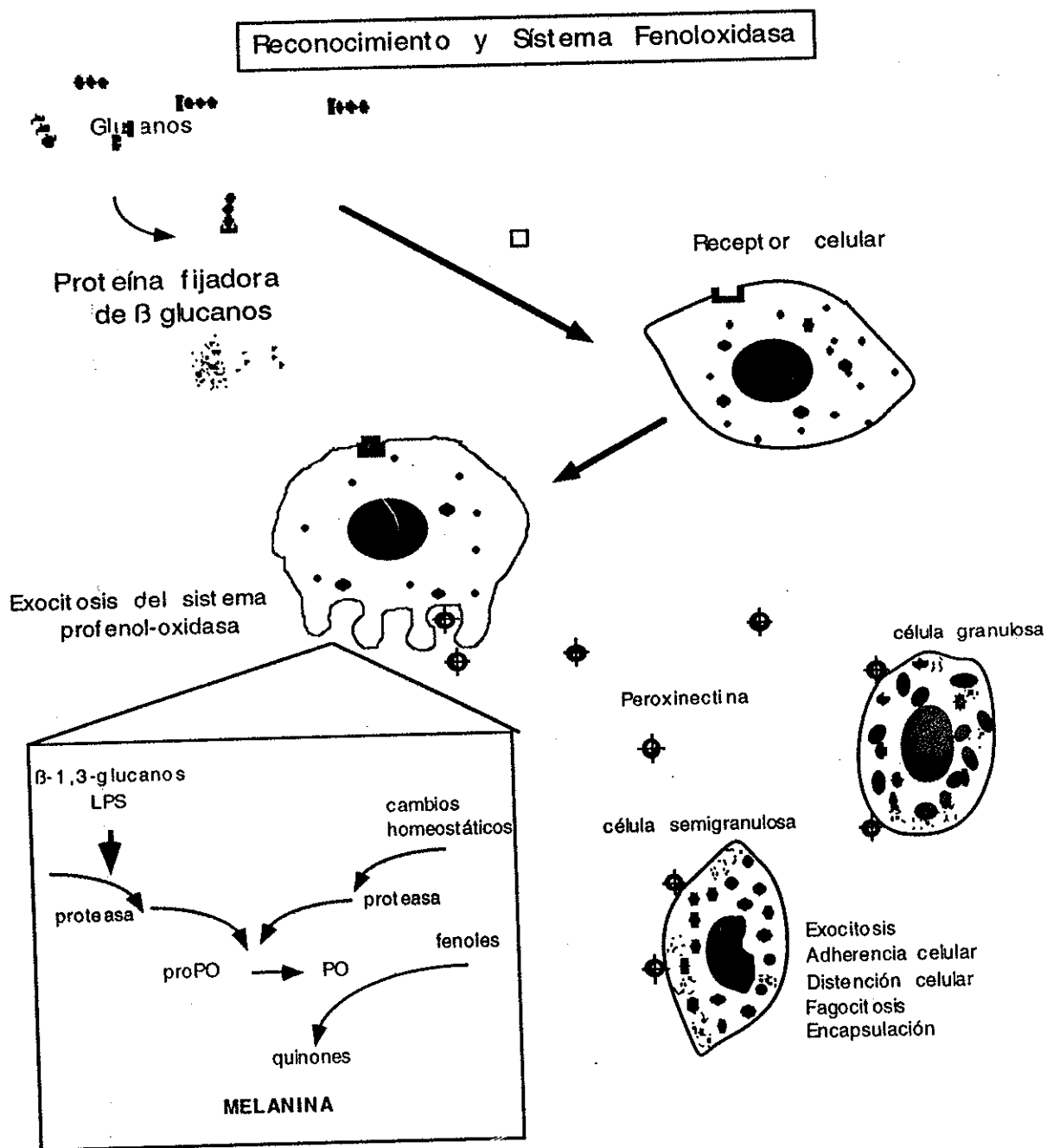


Fig 5: Proteína fijadora de betaglucanos y activación del sistema Profenoloxidasa.

Algunas aglutininas tienen la propiedad de aglutinar eritrocitos y son conocidas como hemaglutininas, otras aglutinan microorganismos secuestrándolos de la hemolinfa para facilitar la actividad de fagocitosis de los hemocitos (Liszewski & Atkinson, 1993 *fide* Muñoz, 1996).

Una lectina ha sido purificada de la hemolinfa de la larva de la mosca *Sarcophaga peregrina*, obtenida después del daño de la pared de su cuerpo. Esta lectina aglutinaba marcadamente células rojas sanguíneas (Komano, Mizuno, Natori, 1980).

La presencia de actividad hemaglutinante en la hemolinfa del cangrejo de herradura fue reportado por Noguchi al inicio de siglo (Noguchi 1903). Hasta ahora varias lectinas han sido purificadas de la hemolinfa de varios crustáceos. Más recientemente, en *limulus* algunas aglutininas han sido aisladas como componentes simples de los hemocitos donde están almacenados en grandes gránulos. Después de la degranulación de los hemocitos estas lectinas juegan al parecer un rol en la agregación de organismos invasores y posiblemente en la opsonización de células extrañas (Muta & Iwanaga, 1996).

En el plasma del camarón *P. monodon* se aisló una lectina llamada monodin, esta es una glicoproteína. El anticuerpo contra monodin interactúa con el extracto de varios tejidos y el suero de otros camarones (Ratanapo, Chulavatnatol, 1990). En el camarón *P. californiensis* se aisló una aglutinina que podía adherirse a lipopolisacáridos bacteriales (Vargas-Albores, Guzmán, Ochoa, 1993).

En *P. japonicus* el anticuerpo monoclonal 40E10 reconoce una aglutinina (Rodríguez, 1995), y al parecer este anticuerpo es heterólogo, pues ha demostrado ser capaz de reconocer factores similares en *P. vannamei* y *P. monodon* (Rodríguez, com.per.)

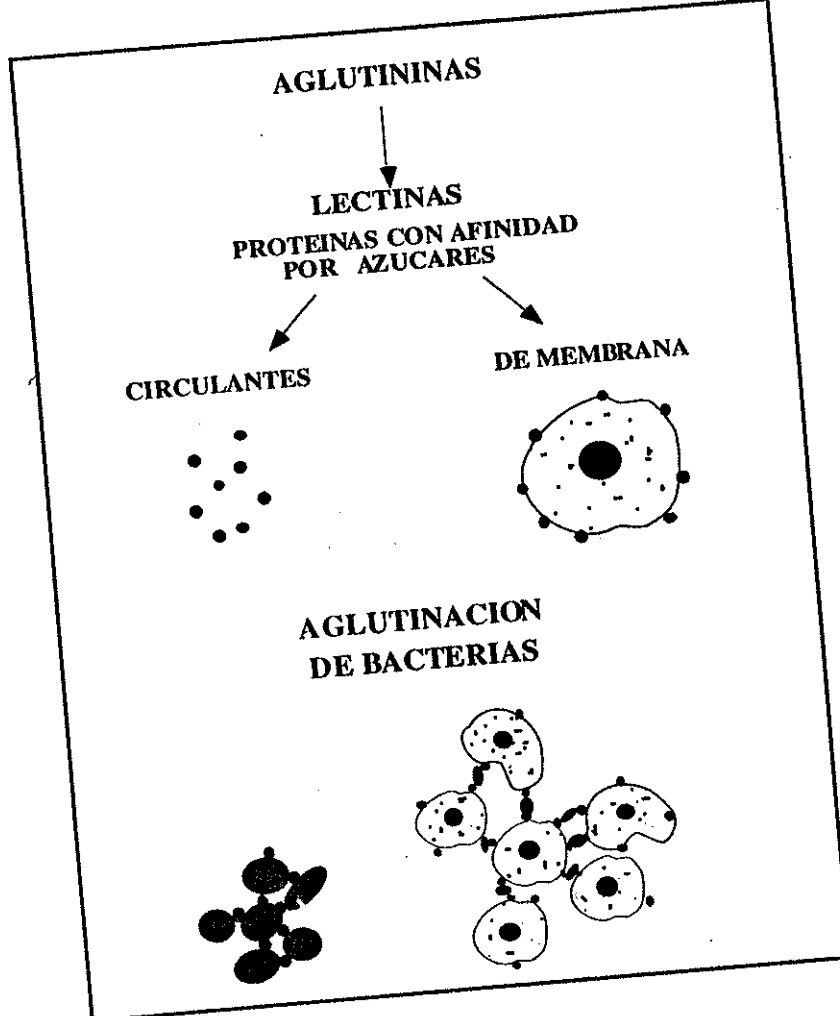


Fig 6: Mecanismos de acción de las aglutininas.

1.5.3. La $\alpha 2$ -macroglobulina

La $\alpha 2$ -macroglobulina es una proteína ampliamente distribuida en el reino animal presente tanto en crustáceos como en mamíferos. La función de la $\alpha 2$ -macroglobulina no es totalmente conocida. Se trata de un inhibidor de proteasas que forma complejos, por medio de un puente tioester interno, con una amplia variedad de endoproteinasas (Van Leuven, 1982 *fide* Bachère *et al*, 1995).

Inhibición de proteasas por medio de la α_2 -macroglobulina.

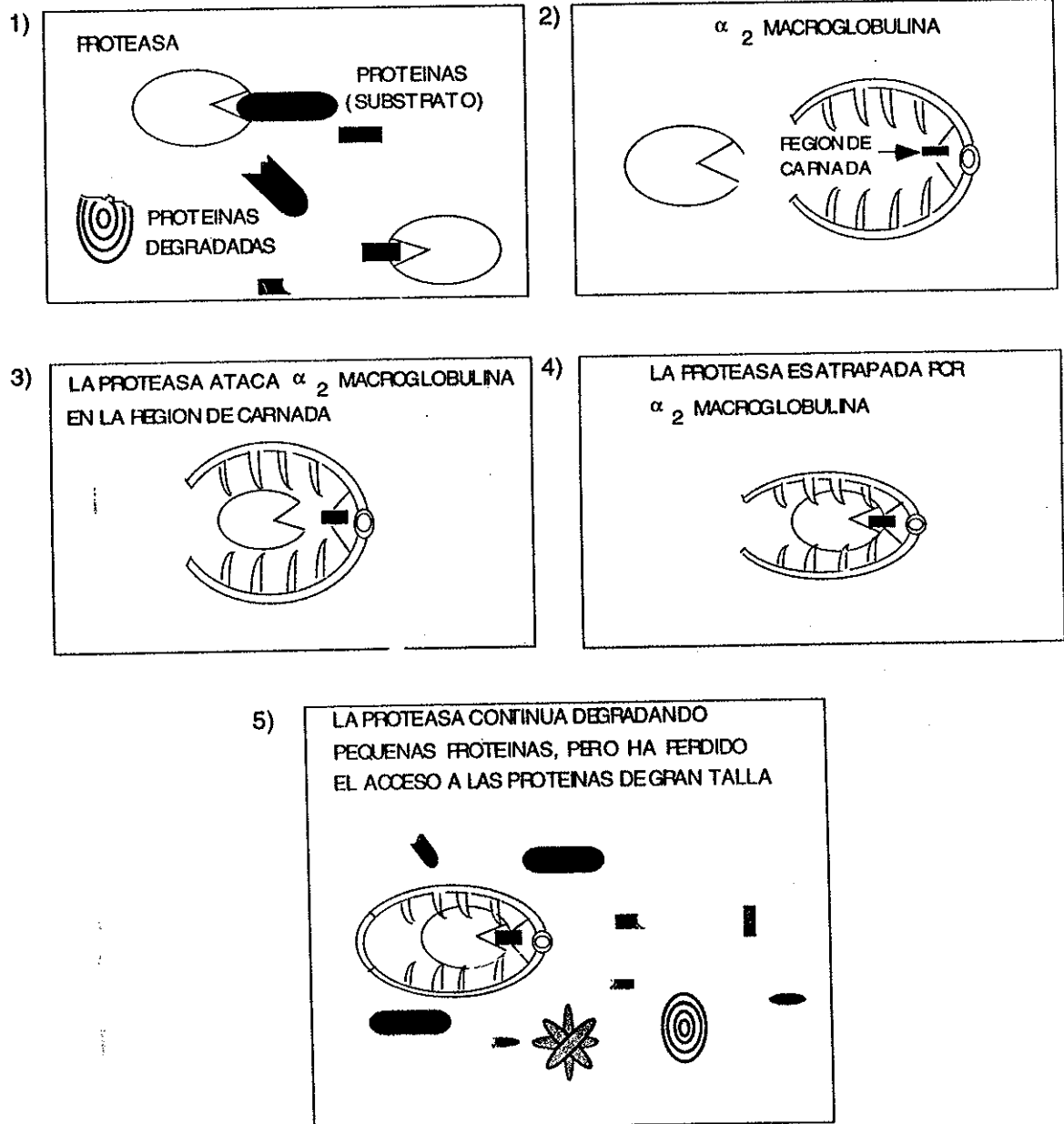


Fig.7: Mecanismo de inhibición de proteasas por medio de la α_2 -macroglobulina. (Tomado de Muñoz, 1996).

En los mamíferos la α_2 -macroglobulina tiene un sitio de reconocimiento que permite su endocitosis por vía de receptores celulares. Así la α_2 -macroglobulina se une a las

defensinas, pequeños péptidos catiónicos con propiedades antimicrobiales y citotóxicas producidas durante la defensa del huésped, y el complejo así formado es internalizado en los macrófagos (Panyutich & Ganz, 1991 *fide* Bachère *et al*, 1995). Estas evidencias sugieren que la molécula juega un rol clave en la regulación de procesos inflamatorios y de defensa. Este rol regulatorio es también sugerido en el fenómeno de citólisis evidenciado en el cangrejo herradura. Este sistema hemolítico del cangrejo herradura ha sido comparado con el sistema complemento de los mamíferos (Armstrong *et al*, 1993 *fide* Bachère *et al*, 1995).

En el cangrejo de río esta proteína tendría la capacidad de reticularse con el factor de coagulación. De esta manera la $\alpha 2$ -macroglobulina estaría presente en el coágulo, donde su rol consistiría en inhibir las proteasas liberadas por agentes patógenos. Aunque no ha sido totalmente demostrado esta proteína intervendría en la regulación del sistema proPO, neutralizando las proteasas que lo activan, controlando de esta manera los daños que este sistema podría provocar en los tejidos del huésped (Hall, 1992, *fide* Muñoz, 1996).

El anticuerpo monoclonal 41B12 reconoce una forma monomérica de 170 kDa en el plasma de *P. japonicus*, las reacciones cruzadas de este anticuerpo monoclonal contra la $\alpha 2$ -macroglobulina del *P. leniusculus* sugiere que el monómero de 170 kDa es una $\alpha 2$ -macroglobulina (Rodríguez *et al*, 1995).

1.6. INMUNOESTIMULACION

El desarrollo exitoso de vacunas y antibióticos ha sido por muchos años una alternativa para el control de enfermedades en humanos y animales domésticos. Los camarones y otros invertebrados tienen un sistema inmune menos desarrollado que los peces. Aunque ha sido reportado que los camarones pueden llegar a ser inmunes después de una "vacunación" por exposición a preparaciones de bacterias muertas (utilizadas como inmunoestimulantes) (Adams, 1991, *fide* Reviews in Fisheries Sciences) habría que anotar que los camarones son principalmente dependientes de mecanismos inmunes no específicos para su resistencia a infecciones (Söderhall & Cerenius, 1992 *fide* Reviews in Fisheries Sciences).

Los inmunoestimulantes son compuestos químicos que activarían el sistema inmune de los animales haciéndolos más resistentes hacia infecciones por virus, bacterias, hongos y parásitos. En el hombre los inmunoestimulantes han sido estudiados como herramientas contra el cáncer humano debido a la activación de células sanguíneas blancas, quienes reconocerían y destruirían células tumorales. Un gran número de diferentes productos han mostrado tener un efecto inmunoestimulador y actúan sobre el sistema inmune en diferentes formas, algunos inmunoestimulantes han sido producidos por síntesis química a partir de productos naturales como modelos estructurales, y otros puramente sintéticos que se crearon con otros propósitos han mostrado poseer propiedades inmunoestimuladoras. Se ha conocido por muchos años que los fragmentos de las paredes de microorganismos hacen a los animales más resistentes a infecciones microbianas (Reviews in Fisheries Sciences, 1996).

A pesar de la falta de información sobre la importancia de estas sustancias en invertebrados, en acuicultura los inmunoestimulantes han sido utilizados antes de conocidas situaciones de estrés (manipulación, cambio de temperatura o ambiente, cambio del tipo de alimentación, etc) o cuando hay algún incremento en la exposición a microorganismos patógenos y parásitos (blooms en el ambiente), o durante las fases en que los organismos son más susceptibles a infecciones (cambios de estadios de los animales).

A continuación se describe los resultados obtenidos por Sung (1996) quien ha realizado pruebas inmunitarias como determinación de la actividad del plasma contra *E. coli*, la actividad fenoloxidasa y la producción del anión superóxido de los hemocitos del camarón, para evaluar el efecto de tres inmunoestimulantes. Dichos estimulantes fueron "antígeno" vibrio (células de vibrios muertas por calor) , β -1,3-1,6-glucanos extraídos de *Sacharomyces cerevisiae*, y zymosan, un β -1,3-glucano-proteína-lípido compuesto extraído de las paredes de *S. cerevisiae*. Como conclusión Sung determinó que: (1) algunas reacciones microbicidas pueden estar involucradas en la eliminación de vibrios invasores de la hemolinfa del camarón, (2) los tres inmunoestimulantes tienen la capacidad de entrar al

camarón vía tratamientos de inmersión, conduciendo así a la activación de factores relacionados al plasma y a los hemocitos, así como reforzando las actividades de producción de PO y de O_2^- , y (3) esta mejora en las reacciones microbidas exhibe una rápida respuesta que es de corta duración (Sung *et al*, 1996), estos resultados corroboran los obtenidos por la misma autora utilizando los β -glucanos como inmunoestimulantes, utilizando la actividad P.O. para estudiar el efecto del estimulante (Song *et al*, 1994).

1.7. TOXICOLOGIA Y SISTEMA INMUNE

Las condiciones ambientales (particularmente en ambientes acuáticos) se han visto amenazadas desde el inicio de la revolución industrial, debido a la cantidad de descargas liberadas al medio. Estas alteraciones de las condiciones ambientales al parecer estarían relacionadas o ejercerían influencia sobre la capacidad inmune de los animales, es por esta razón, que en la actualidad ha adquirido mucha importancia el estudio de los efectos de los contaminantes ambientales sobre el sistema inmune en diversos grupos de vertebrados e invertebrados (Bainy *et al.*, 1996).

En Peces.

Bainy y colaboradores han realizado la comparación entre algunos parámetros prooxidantes y antioxidantes en eritrocitos, branquias, hígado y riñón, considerando tilapias (*Oreochromis niloticus*) provenientes de una granja y de un sitio polucionado. No observaron alteraciones hematológicas de la sangre pero el estrés oxidativo de los eritrocitos se caracterizó por un incremento en la demanda de oxígeno y disminución del tiempo de inducción por *t*-butyl hidroperoxide, *t*-BHP evidenciando una alta susceptibilidad al daño oxidativo. Todos los resultados proveen datos útiles para futuras investigaciones de sitios acuáticos polucionados y suministran una base de datos en los que se ha relacionado la presencia de poluentes a efectos biológicos a nivel molecular (Bainy *et al.*, 1996).

En Insectos.

Se han hecho progresos en estudios relacionados con toxicidad del oxígeno y patologías provocadas por numerosos contaminantes ambientales. Las respuestas a los oxidantes son diversas y pueden causar en los insectos peroxidación de lípidos, oxidación de proteínas y enzimas, potencialmente pueden causar también oxidación del DNA. El desafío oxidativo es calmado por componentes antioxidantes, principalmente por la inducción de enzimas antioxidantes que son cruciales para detener la cascada de radicales de oxígeno y la reacción en cadena de la peroxidación de lípidos (Ahmad, 1995).

En Bivalvos

La mayoría de los estudios sobre modulación del sistema inmune por poluentes ha sido concentrado esencialmente sobre el efecto de metales pesados, hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) y antibióticos (Bachère, *et al*) La literatura común acerca del efecto de contaminantes sobre componentes específicos del sistema inmune de los bivalvos fue revisado junto con el efecto sobre la susceptibilidad a infecciones por Pipe & Coles (1995). Sin embargo hay escasos datos científicos para soportar la hipótesis de que la contaminación induce la supresión del sistema inmune conduciendo a un incremento en la susceptibilidad a las infecciones.

La inmunidad en bivalvos comprende mecanismos celulares y humorales (Cheng, 1989). Debido a que los bivalvos y gastrópodos poseen un sistema circulatorio abierto, se han realizado estudios para determinar si los iones de Cu^{++} o Cd^{++} podrían comprometer ciertos aspectos de la inmunidad celular o humoral de la ostra *Crassostrea virginica*. Los resultados han mostrado que la exposición *in vivo* a ciertos metales pesados, así como la alteración de la salinidad y temperatura podrían comprometer los mecanismos de defensas de los moluscos. Se ha podido determinar así mismo que los metales solos o en sus formas queladas podían inhibir la liberación de lisozima en el suero (Cheng, 1989).

Algunos datos obtenidos por Pipe y Coles (1995) han mostrado mortalidades altas en mejillones sometidos a *Vibrio. tubiashi* después de una exposición a Cu^{++} , demostrando

una clara inmunosupresión, e indicando que el sistema inmune de los moluscos bivalvos es modulado por cambios ambientales. A pesar de estos resultados más estudios son necesarios para medir la inmuno competencia y la importancia de sus relaciones con respecto a la supresión del sistema inmune.

En Crustáceos.

Durante los últimos años se ha incrementado la atención en los efectos ambientales provocados por el uso de los pesticidas en agricultura y selvicultura ya que estos pueden eventualmente entrar en los cursos de agua en los ecosistemas de arroyos, estanques, ríos y lagos. Se ha encontrado por ejemplo que los cangrejos pueden ser afectados, con la enfermedad del caparazón. Esta patología es común en crustáceos de ambientes polucionados y coincide con un decrecimiento en la actividad antibacteriana del suero (Noga, 1994).

El crustáceo *Gammarus lacustris* ha sido probado con los pesticidas más comúnmente utilizados en la agricultura noruega, entre estos el fungicida Tilt ®250 EC. Los resultados con tilt mostraron que este, fue tóxico para la especie probada (Baekken, Aanes, 1991).

Adicionalmente en una serie de experimentos de laboratorio Hessen y colaboradores (1994) determinaron que pesticidas como el propiconazole tenía un LC 50 entre las concentraciones de 3.2 - 10 mg/l sobre *Daphnia magna* y *D.pulex* . Estos patrones de toxicidad fueron confirmados luego de experimentos cerrados de 12 días de duración (Hessen, Källqvist, Abdel-Hamid, Berge, 1994).

2. MATERIALES Y METODOS

2.1. MATERIAL BIOLÓGICO

2.1.1. Camarones y Hemolinfa

Los animales juveniles de *Pennaeus vannamei* empleados en los bioensayos fueron obtenidos de la camaronera Fuentes localizada en la zona de Palmar, provincia del Guayas.

La hemolinfa fue extraída de animales en intermuda, para ésto se utilizaron jeringuillas de 1 ml. (Insulin Syringe 26 G 1/2) cargadas con un volumen de 100 microlitros de solución anticoagulante (citrato de sodio al 10%). Las muestras de hemolinfa fueron mantenidas en hielo, manteniendo condiciones de asepsia. Luego de la extracción, la hemolinfa diluida V/V con anticoagulante fue transferida a microtubos (0,5 ml virgin polyprop, Cambridge Scientific, Co.).

2.1.2. Cepas Bacterianas

Se utilizó la cepa de *Escherichia coli* (*Escherichia coli* D31) la cual es una cepa comercial traída al país desde Francia por la Dra. Evelyne Bachère.

2.2. TÉCNICAS BACTERIOLOGICAS

2.2.1. Medios de cultivo

Los medios utilizados para la realización del ensayo de actividad antibacteriana fueron de dos tipos: sólidos y líquidos.

Medios sólidos:

Lennox L Agar (LB Agar) (Sigma Chemical Company, L2897). Este medio fue utilizado para la siembra de *E. coli*. Una vez preparado se esterilizó por 15 minutos a 121°C y quince libras de presión.

Medios líquidos:

Lennox L Broth Base (LB Broth Base), (Gibco BRL, 12780-029). Este medio fue empleado para el cultivo de *E. coli*. Se debió ajustar la concentración de cloruro de sodio al 1% a fin de proveer una osmolaridad cercana a la de la hemolinfa y que sea a la vez apta para la bacteria *E. coli*. El medio fue esterilizado por 15 minutos a 121°C y 15 libras de presión.

2.2.2. Manejo del Stock de bacterias

Las cepas empleadas fueron mantenidas a -80°C en tubos de congelación (Criotubos Nunc, 1,8ml). La manipulación de estas cepas fue realizada en una cámara de flujo laminar para evitar la contaminación de las mismas. A partir de la cepa congelada se sembró por agotamiento en una caja petri con ayuda de un asa de platino, luego se incubó por 8 horas para permitir el crecimiento de las colonias. Una colonia aislada fue sembrada en 4 ml. de medio líquido y se dejó incubar toda la noche. Antes de realizar las pruebas se repicó las bacterias en caldo de cultivo fresco y se les permitió crecer por dos horas para realizar posteriormente el cálculo de la concentración a partir de la lectura de D.O. obtenida en el espectrofotómetro (Shimadzu corporation, modelo UV-2100). Una vez obtenida la concentración se realizó los cálculos de las diluciones necesarias para obtener una concentración de 40 millones de bacterias/ml.

2.3. TECNICAS DE INMUNOEVALUACION

2.3.1. Tratamiento de la muestra para los diferentes ensayos

- Se cuantificó la cantidad de hemolinfa y la cantidad de citrato presente en la jeringuilla de extracción.
- Se separó la cantidad necesaria para la pruebas de cuantificación del anión superóxido (150 ul por muestra).
- El sobrante de la mezcla se igualó volumen a volumen con citrato.

-Se separaron 10 ul. de hemolinfa que se utilizaron para la realización de los conteos hemocitarios y hemogramas.

-Se procedió a centrifugar las muestras a 3000 rpm por 10 minutos.

-Se separó el sobrenadante de los hemocitos con ayuda de una pipeta y las muestras de plasma así obtenidas se guardaron en congelación a -80°C para utilizarlas en los ensayos de inmunodosificaciones (dot-blot) y en la determinación de la actividad antibacteriana así como en la cuantificación de proteínas totales.

2.3.2.Hemogramas

-Se realizó el hemograma según el método descrito por Muñoz (1996).

Para facilitar el conteo en caso de que existan muchos hemocitos en la muestra, mantenerlos con un buen aspecto morfológico y evitar la agregación celular, se diluyó 10ul de hemolinfa total en 10ul de formaldehído al 10%. Las muestras de hemolinfa con formaldehído, pueden ser analizadas hasta el día siguiente de su obtención, por lo cual fueron almacenadas a 4°C permaneciendo en tubos cerrados para impedir la evaporación.

-Se colocaron 10 ul de la muestra tratada con formaldehído en el hemocitómetro (Cámara de Neubauer, Erma), y se determinó el número y los tipos hemocitarios en un microscopio óptico, provisto de un dispositivo de contraste de fases (Olympus BH2, objetivo A20 PL). Se estimaron los conteos de acuerdo al número de hemocitos. ml^{-1} que existían en la muestra de hemolinfa.

2.3.3.Protocolo para la cuantificación del anión superóxido

El protocolo seguido fue el descrito por Muñoz (1996):

-Se colocaron las muestras de hemolinfa en los respectivos hoyos de una placa de microtitulación (50 ul por hoyo). En cada hoyo se adicionó un volumen igual de Solución Salina Modificada de Hanks 2X (Ca^{++} 12 mM, Mg^{++} 26 mM) (MHBSS 2X).

-Luego se dejó incubar durante 30 minutos para permitir la fijación de las células en la microplaca.

-Una vez que las células se fijaron a la placa se eliminó el sobrenadante y se adicionó, cuidadosamente 50 ul de MHBSS 1X (Ca^{++} 6 mM, Mg^{++} 13 mM) en todos los hoyos.

-Luego en los hoyos que sirvieron de control para evaluar la actividad básica de los hemocitos se añadieron 50 ul de MHBSS 2X. y en los hoyos que sirvieron para evaluar la respuesta de las células a un estimulante se añadieron 50 ~~ul~~ de PMA ($30\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) preparado en MHBSS 2X.

-Se colocaron en todos los hoyos 50 ul de NBT al 0,24%, preparado en MHBSS 0X (sin cloruro de Ca^{++} y Mg^{++}). La concentración final de Ca^{++} y Mg^{++} en cada hoyo fue de 6 mM y 13 mM respectivamente.

-Se incubaron las placas a temperatura ambiente, durante 2 horas (tiempo requerido para la reducción del NBT) en un lugar protegido de la luz debido a que el NBT es fotosensible.

-Se eliminó el sobrenadante de la microplaca y se adicionó luego 200 ul de metanol en cada hoyo para detener la reacción y realizar un primer lavado. Se realizaron dos lavados más con 200 ul de metanol al 70 %.

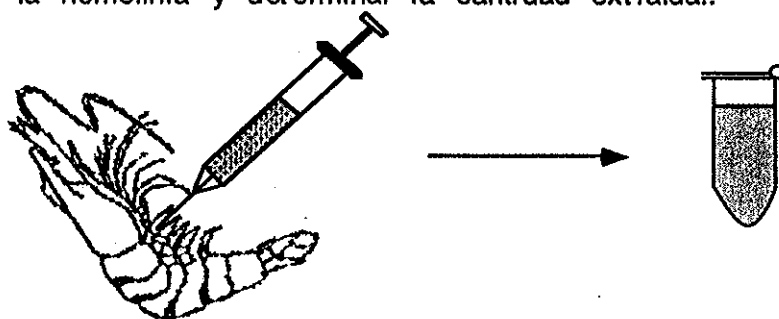
-Se dejó luego secar completamente la placa a temperatura ambiente.

-Para solubilizar el formazán intracelular se utilizaron 120 ul de KOH (hidróxido de potasio) 2M y 140 ul de DMSO (Dimethyl Sulfoxide).

-Utilizando una micropipeta multicanal se disolvió completamente el formazán.

Los resultados obtenidos en las pruebas de NBT son presentados como tasas, estas se obtuvieron dividiendo las lecturas obtenidas de los hemocitos estimulados para las lecturas de los hemocitos sin estimulación.

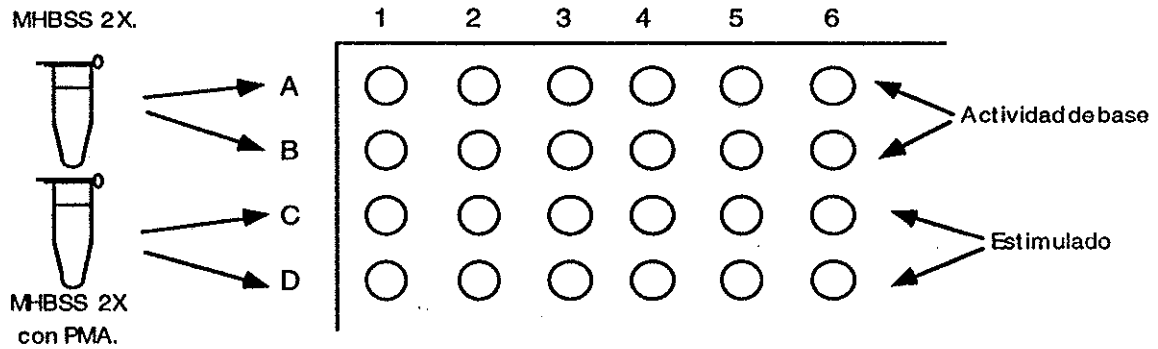
- Extraer la hemolinfa y determinar la cantidad extraída..



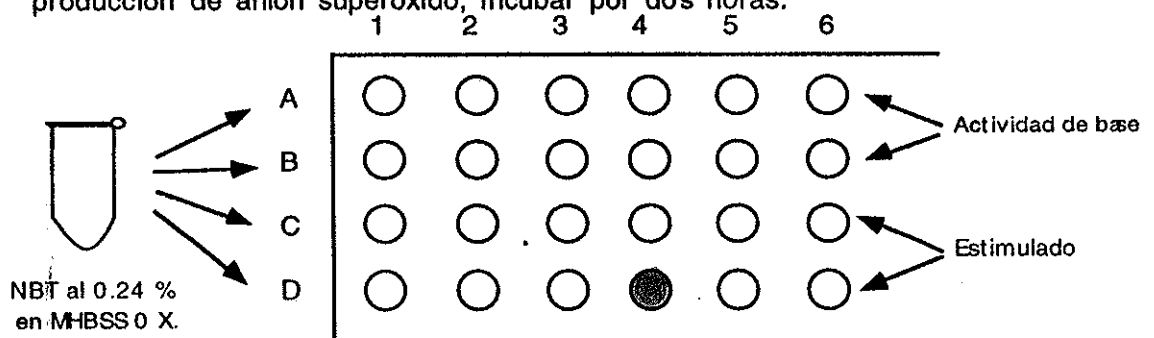
-
- Diagram illustrating the assay layout. The layout consists of three main components: HemolInfa. (left), a central grid of wells (middle), and MBSS 2X (right). The central grid is an 8x12 array of wells, labeled A through H (rows) and 1 through 12 (columns). Arrows indicate the flow of the assay: HemolInfa. is added to the grid, and MBSS 2X is added to the grid.

-
- Diagram illustrating the layout of a 96-well plate. The plate is organized into 12 columns (numbered 1 to 12) and 8 rows (labeled A to H). A test tube labeled "MBSS 1X." is shown on the left, with an arrow indicating the addition of medium to the wells.

- Para obtener la estimulación deseada se adicionan 50 ul del estimulante (PMA) en MHBSS 2X en los hoyos estimulados y en los de control se adicionan solo 50 ul de MHBSS 2X.



- Finalmente se adiciona 50 ul de NBT al 0,24% a toda la placa para revelar la producción de anión superóxido, incubar por dos horas.



- Eliminar el sobrenadante.
- Lavar con metanol.
- Solubilizar con KOH (120ul) y DMSO (140ul).
- Leer a 620 nm.

Fig.8: Protocolo para la cuantificación de anión superóxido

2.3.4. Protocolo para la cuantificación de la actividad antibacteriana

Se siguió el protocolo descrito por Tapia (1997).

-En una microplaca (Corning Glass Work, Flat Bottom, 25850) se mezclaron (por triplicado) 10 ul de la muestra de plasma (5 ul de plasma y 5 ul de anticoagulante) con 10 ul de suspensión bacteriana de *E. coli* D31 (0,03 D.O. a 540 nm).

-Se dejó incubar por 1 hora a temperatura ambiente.

-Se llevó un control de crecimiento bacteriano sustituyendo la hemolinfa por 10 ul de una solución de agua de mar al 70%, esterilizada mediante filtración (Gelman Sciences 4320, 0,2 um) e igualada volumen a volumen con anticoagulante.

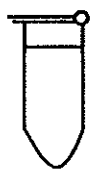
-También se consideró un control del plasma para cada muestra con 10 ul de medio de cultivo reemplazando la suspensión bacteriana.

-Después de la incubación se añadió a todos los pozos 200 ul de medio de cultivo, completando un volumen final de 220 ul por hoyo.

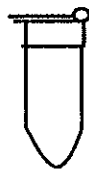
-Se efectuó inmediatamente la lectura en el espectrofotómetro de microplacas (Labsystems Multiskan Bichromatic 348) a una longitud de onda de 540 nm, el resultado así obtenido fue considerada como el tiempo 0 equivalente al blanco, el mismo que fue restado de la lectura obtenida luego de 8 horas de crecimiento bacteriano.

-Mediante un cálculo simple se obtuvo el porcentaje de inhibición del crecimiento bacteriano de cada muestra, considerando al control bacteriano como el 100% del crecimiento. El porcentaje de inhibición de las muestras se obtuvo substrayendo el crecimiento bacteriano del valor que representa el 100%.

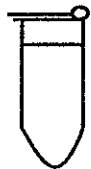
METODO TURBIDOMETRICO



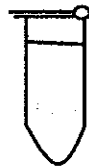
Medio de cultivo LB



SOLUCION S
Agua de mar 70%+ Citrato de Na 10%
(V/V)



Escherichia coli
 40×10^6 bact / ml.



Plasma(50%plasma+50%citrato)

-Llenar la placa siguiendo el siguiente esquema:



M

10 ul plasma
+
10 ul E. coli



CP

10 ul de plasma
+
10 ul de LB



CB

10 ul de Sol. S
+
10 ul de E. coli

- Incubar por una hora a temperatura ambiente (25°C)
- Añadir 200 ul de LB a todos los hoyos



LB

	1	2	3	4	5	6	
	M1	M2	M3			CB	→ Contr of bact
A	●	●	●	○	○	○	
B	●	●	●	○	○	○	
C	●	●	●	○	○	○	
D	●	●	●				→ ControPlasma

-Leer en el espectrofotómetro a 540 nm. al tiempo cero y luego a las 8 horas..

Fig.9: Protocolo para la cuantificación de la actividad antibacteriana del plasma de *P.vannamei*..

M: Muestra

CP: Control plasma

CB: Control Bacteria

2.3.5. Inmunodosificaciones: Protocolo dot blot tipo ELISA

-Dos μ l de plasma diluido (1/50 en tampón fosfato salino (PBS) 800 mOsm) fueron depositados en membranas de nitrocelulosa. Las membranas fueron secadas a temperatura ambiente durante 30 minutos.

-Las membranas fueron saturadas por incubación con PBS (NaCl 150 mM, KCl 3 mM, KH_2PO_4 2,5 mM, Na_2HPO_4 8,5 mM, pH 7,2) conteniendo leche descremada al 5% ($\text{p} \cdot \text{v}^{-1}$) agitando suavemente por 60 minutos, T.A.

-Se realizó 3 lavados de 3 minutos c/u con PBS conteniendo 0,1% de Tween 20 (PBS-Tween 20)

-Se depositó el primer anticuerpo y se incubó por 60 minutos a temperatura ambiente. Los anticuerpos monoclonales utilizados fueron:

Anticuerpo purificado anti α 2-macroglobulina dilución 1/1000 (en PBS-Tween 0,1%-leche 0,5%).

Anticuerpo purificado anti factor de coagulación dilución 1/1000 (en PBS-Tween 0,1%-leche 0,5%).

Sobrenadante de cultivo contra aglutinina sin diluir.

-Se realizó 3 lavados de 3 minutos con PBS-Tween 20 (0,1%)

-Se depositó el segundo anticuerpo (conjugado a la fosfatasa alcalina) y se incubó por 45 minutos: dilución empleada del anticuerpo 1/10.000 en PBS conteniendo Tween-0,1% y Leche al 0,5 %.

-Se realizó 3 lavados de 3 minutos con PBS-Tween 20 (0,1%)

-Se incubó con el sustrato recientemente preparado:

- BCIP (25 mg de 5-Bromo-4-Cloro-3-Indolylfosfato en 0,5 ml de dimethyl-formamida).....33 ul.
- NBT (25 mg de Nitro Blue Tetrazolium en 1 ml de agua deionizada).....66 ul.
- Tampón Fosfatasa Alcalina (Na Cl 100mM, Mg Cl₂ 5mM, Tris base 100mM, pH 9,5).....10 ml.

-La reacción enzimática fue detenida a los 30, 60 y 90 minutos, para α 2-macroglobulina, factor de coagulación, y aglutinina, respectivamente; lavando la membrana con 50 ul. de una dilución de 2 mM de EDTA.

*Concentración de los anticuerpos monoclonales (primer anticuerpo) utilizados para cada factor:

- Anti α 2-macroglobulina (purificado): 1,4 ng/ μ l
- Anti factor de coagulación (purificado): 84 ng/ μ l
- Anti aglutinina (sobrenadante de cultivo): 1858 ng/ μ l

DOT BLOT

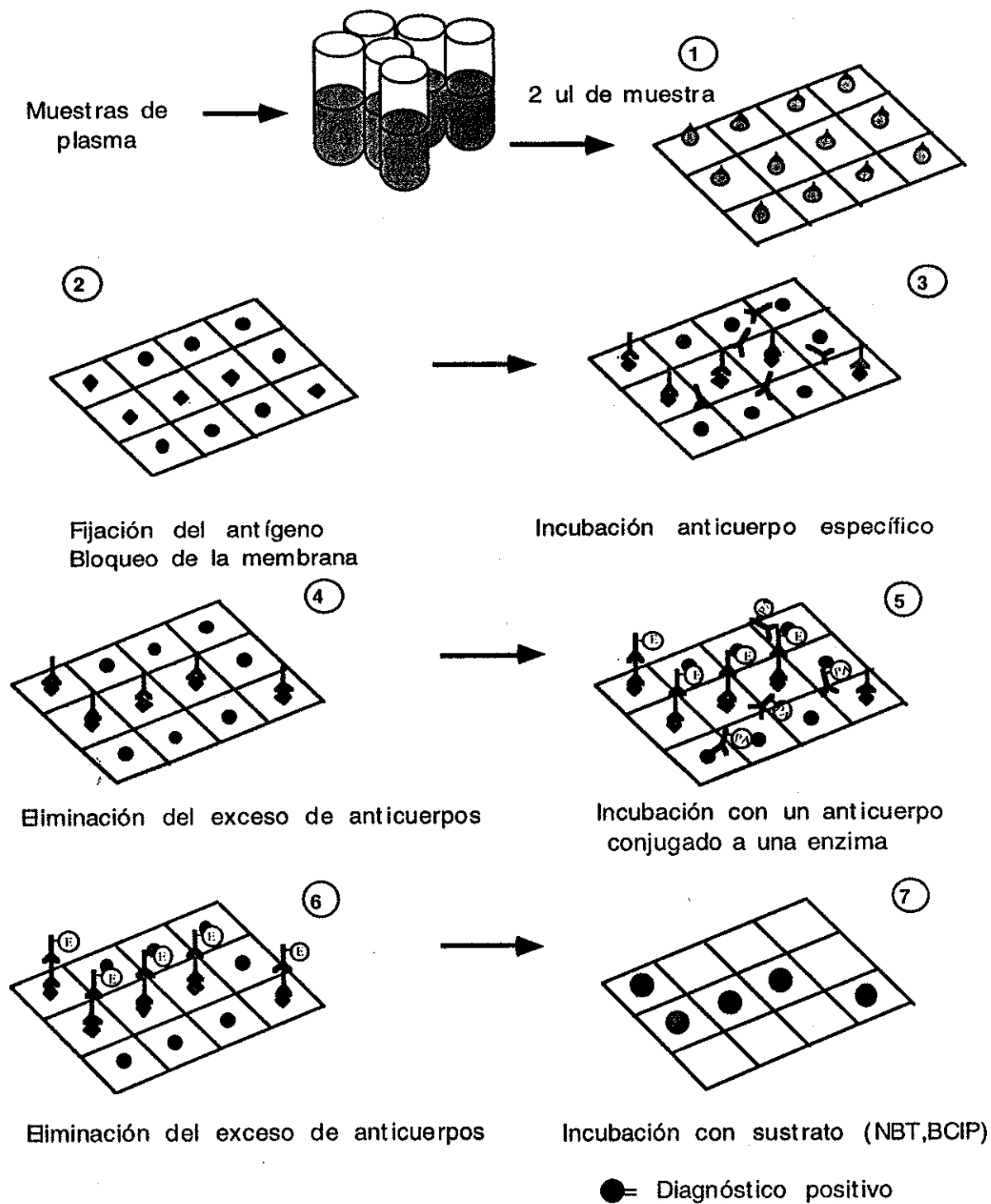


Fig. 10: Protocolo para dosificación de proteínas alfa 2 macroglobulina, factor de coagulación y aglutinina.

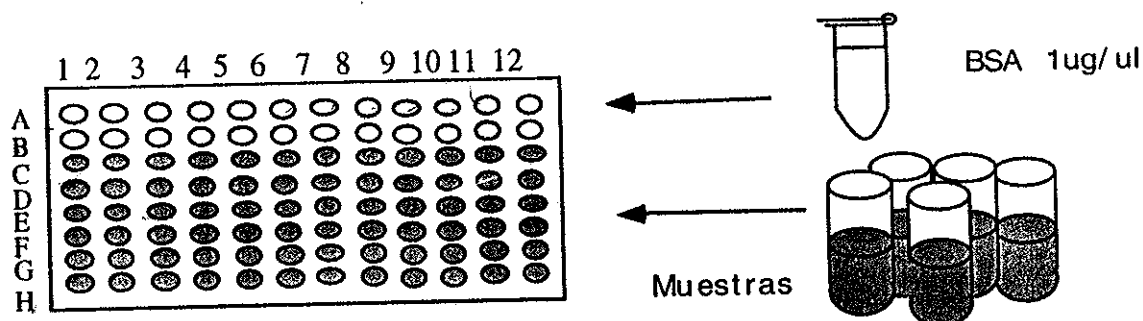
(Después de Valenzuela,1996)

2.3.6. Protocolo para la Cuantificación de Proteínas Totales

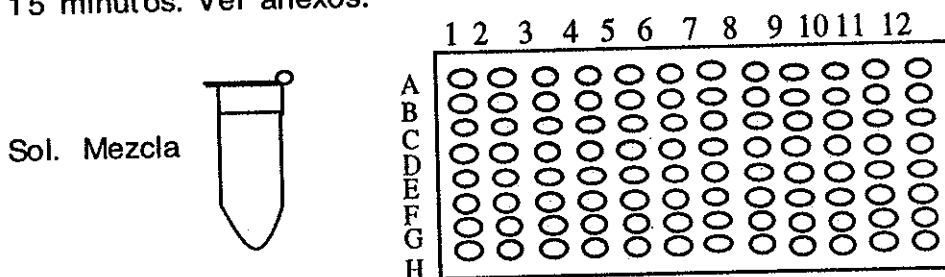
- Antes de la cuantificación, las muestras se diluyeron en agua destilada (1/50).
- Se realizó el llenado de una serie de hoyos de la microplaca (Corning Glass Work, Flat Bottom, 25850) con BSA (Suero de albúmina bovina) preparado a una concentración 1ug/ul. Este llenado de la placa se efectuó de una manera progresiva (0, 2, 4, 6, 8,, 20 ul) y se completó a un volumen de 20 ul con agua destilada. El objetivo de este llenado progresivo es determinar una curva estandar que nos permita luego analizar los resultados.
- En otra serie de hoyos se colocaron (por duplicado) 20ul de cada una de las muestras de plasma diluidas.
- Se agregó a toda la placa 20ul de solución preparada con la siguiente formulación: 91% solución A, 4,5% de solución B, y 4,5% de solución C.
- Solución A: Na_2CO_3 al 10% preparado en una solución de NaOH 0,5 N ó 0,5 M.
- Solución B: $\text{Cu SO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ al 1% en agua destilada.
- Solución C: Tartrato de Sodio y Potasio al 1% en agua destilada.
- Se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente.
- Se colocó 60 ul/hoyo de una solución al 10% de Fenol de Ciocalteus (Reactivo de Folin).
- Se esperó el tiempo suficiente (5-10 minutos) para que se de la reacción, en el hoyo determinada por el cambio de coloración de amarillo a azul.
- La lectura se realizó en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nm.

PROTOCOLO PARA CUANTIFICACION DE PROTEINAS (LOWRY)

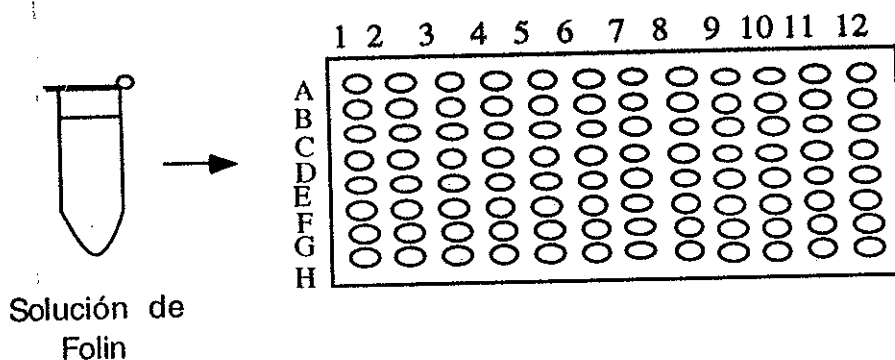
-Llenar progresivamente con BSA 2,4,6,.....20 ul. y completar a 20 ul. con agua destilada. Colocar 20 ul. de las muestras de plasma dilución 1/100.



-Añadir 20 ul. por celda de la solución mezcla formada por: Sol. A + Sol. B + Sol. C (Relación 15 ml. de Sol. A : 0,75 de Sol. B y Sol. A). Dejar incubar por 15 minutos. Ver anexos.



-Finalmente añadir 60 ul. por hoyo de Sol. de Folin diluída 1/10 en Agua Destilada. Dejar reaccionar hasta que se pierda el color amarillo.



-Leer en el espectrofotómetro a 540 nm.

Fig. 11: Protocolo para la cuantificación de proteínas totales del plasma de *P.vannamei*.

agua sea homogénea en todos los tanques, no se consideró necesario realizar un control diario de parámetros físico-químicos.

Una vez iniciado el bioensayo los camarones fueron alimentados con tres tipos de dietas. Las dietas consistían de:

Alimento balanceado comercial (50% de proteína).

Alimento balanceado comercial (22% de proteína).

Alimento natural constituido de 60% de calamar, 12% de ostra, 12% de almeja y 16% de mejillón (dieta empleada para animales de maduración del CENAIM).

El porcentaje de biomasa suministrada diariamente fue del 4% distribuido en dos raciones del 2% cada una (suministradas en la mañana y en la tarde).

A los quince días de iniciado el bioensayo se realizó la evaluación de la respuesta inmune en los animales, la misma que fue determinada por medio de: la cuantificación de la producción de anión superóxido O_2^- mediante la técnica de reducción del NBT, el hemograma, el ensayo antibacteriano turbidométrico, y las inmunodosisificaciones por dot-blot. No se consideró indispensable monitorear el peso final de los animales, debido a que en el CENAIM ya existe información sobre la relación calidad de la dieta-crecimiento y por otra parte a que estos datos no aportarían información fundamental para el análisis de los resultados obtenidos con las pruebas de inmunoevaluación que eran el objetivo principal del trabajo.

Un grupo de animales (20 camarones) fueron estudiados con las pruebas inmunitarias antes de iniciar cada bioensayo, luego del primer periodo de aclimatación. Este grupo fue denominado T0 (tiempo cero).

2.4.2. Ensayos toxicológicos

Diseño experimental

En este bioensayo se inyectaron dosis de 1-10-100 ppb de Tilt® para evaluar el efecto de este fungicida sobre la respuesta inmune de los camarones. Para ésto, los camarones fueron distribuidos aleatoriamente en 9 tanques, tres grupos (de dos tanques cada uno) fueron inyectados con 100 ul. de 1, 10 y 100 ppb de Tilt®. El cuarto grupo de animales (de dos tanques) fue inoculado con 100 ul. de solución salina, para llevar un control del efecto de la inyección. Los animales del noveno tanque no fueron manipulados para llevar un control de mortalidad. Los tanques empleados eran rectangulares y de una capacidad de 500 litros, la aeración fue constante y el recambio de agua continuo. Antes de iniciar el bioensayo se dejó a los animales aclimatarse durante 6 días. Durante todo el bioensayo fueron alimentados con una biomasa diaria del 4% de un balanceado comercial conteniendo 50% de proteína, el cual fue suministrado en dos raciones diarias una en la mañana y la otra en la tarde (cada ración correspondiente al 2% de la biomasa).

A los seis días de la inyección se procedió a la extracción de la hemolinfa para realizar las primeras pruebas (muestreo 1), posteriormente pasados trece días de la inyección se realizó la segunda extracción de hemolinfa para las pruebas finales (segundo muestreo).

2.5. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE DATOS

Los datos obtenidos durante la realización de los ensayos fueron analizados mediante un análisis de varianza (ANOVA) y un test de Rango Múltiple de Duncan (Super Anova) a un nivel de confianza del 95%.

3.RESULTADOS Y DISCUSION

3.1.EVALUACION DE ENSAYOS INMUNITARIOS BAJO CONDICIONES DE ESTRES NUTRICIONAL

Varios ensayos inmunitarios están disponibles para el camarón *P. vannamei*, algunos permiten cuantificar factores circulantes en la hemolinfa y otros, estimar actividades inmunitarias.

Para la dosificación de factores circulantes se cuenta con los siguientes ensayos:

-El hemograma, el cual permite cuantificar el número y diferenciar las proporciones o porcentajes de los tipos de hemocitos o elementos figurados de la hemolinfa.

-Tres inmunopuebas dot-blot de tipo ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) empleando los anticuerpos monoclonales (Ac Mc), específicos contra el factor de coagulación (42E8), α 2-macroglobulina (41B12), y una posible aglutinina (40E10) de *P.japonicus* (Rodríguez, 1995). Estas pruebas permiten también cuantificar estos tres factores circulantes en el plasma de *P. vannamei* (Valenzuela, Rodríguez, com.pers.).

-Cuantificación del anión superóxido (O_2^-) generado durante el choque respiratorio, por medio de la reducción del NBT (nitroblue tetrazolium) (Muñoz, 1996).

-Determinación de la actividad antibacteriana del plasma, cuantificada por un método turbidométrico, basado en la medición de la disminución de la turbidez de suspensiones bacterianas, en presencia de plasma de camarón (Tapia,1997).

Con el objetivo de contar con un criterio extra, que nos permita analizar mejor los resultados obtenidos, con las pruebas de inmunodosificaciones de factores circulantes en el plasma, se dosificó en paralelo la cantidad de proteínas totales presentes en las muestras de plasma de camarón, por medio del método de Lowry (1951) adaptado a microplacas (Nieto, com.per.)

El presente trabajo buscó determinar si las herramientas arriba citadas, son capaces de reflejar fluctuaciones en los parámetros inmunitarios de camarones sometidos a diferentes condiciones de alimentación. Para ésto se realizaron dos bioensayos en los que se emplearon camarones con un peso aproximado de 7g, siendo estos previamente aclimatados en tanques exteriores por un período de 10 días antes de iniciar el ensayo. Las dietas o alimentos consistían de:

Alimento 1: Balanceado comercial 22% de proteína.

Alimento 2: Balanceado comercial 50% de proteína.

Alimento 3: Dieta congelada constituida de calamar, ostra, mejillón y almeja.

(Ver materiales y métodos 2.4)

3.1.1. Primer bioensayo

Para estimar la condición inmunitaria de los animales, antes de iniciar el bioensayo se sometió a un grupo de camarones a los ensayos de inmunoevaluación, en esta fase se realizaron sólo tres pruebas, cuantificación del anión superóxido, actividad antibacteriana y hemogramas, ya que las tres pruebas dot-blot de tipo ELISA se encontraban todavía en fase de optimización. Además se realizó la cuantificación de proteínas totales del plasma. Los datos obtenidos con estos animales son presentados como el tiempo cero (T0).

Problemas de alta mortalidad fueron observados en varios tanques experimentales, lo que condujo a detener el ensayo a los 15 días de su inicio, sometiéndose cada animal a la extracción de su hemolinfa para emplearla en los ensayos inmunitarios.

3.1.1.1. Resultados de pruebas inmunitarias del primer bioensayo

Supervivencia.

Los resultados de supervivencia para cada tipo de alimento (con sus tres réplicas) son presentados en el siguiente gráfico (Figura 12):

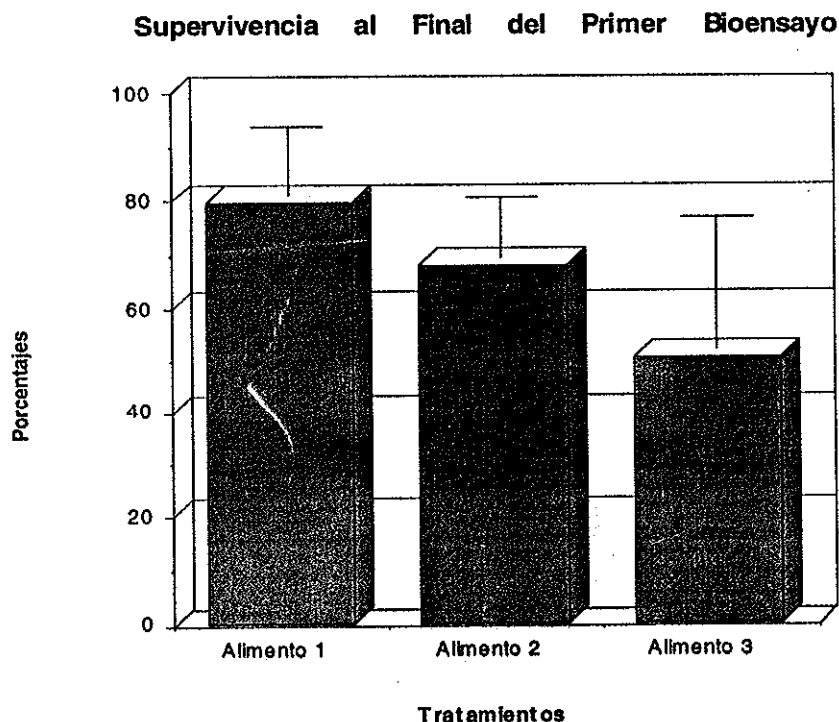


Fig.12. Porcentajes de supervivencia al final del primer bioensayo. Los porcentajes son presentados para cada tipo de alimentación.

Alimento 1: Alimento balanceado 22% de proteína.

Alimento 2: Alimento balanceado 50% de proteína.

Alimento 3: Alimento natural.

Debido a que la cantidad de animales fue muy baja en algunos tanques, se procedió agrupar a los animales por tratamientos para el análisis de las pruebas realizadas. Esto se pudo hacer tomando en consideración que no existían diferencias significativas ($p > 0,05$), entre las réplicas de cada tratamiento, en todas las pruebas realizadas.

Los datos de supervivencia de los tratamientos 1 y 2 concuerdan con los valores clásicamente observados para reproductores en laboratorios (alrededor del 70 %), en los cuales se considera aceptable una mortalidad diaria no superior al 2%. Según esta

estimación, la supervivencia debería ser del 70% después de 15 días de ensayo. Sin embargo la supervivencia en el tratamiento 3, fue tan solo del 50 %, debido en gran medida a las altas mortalidades observadas en 2 de los 3 tanques de este tratamiento. A pesar de estos datos cabe mencionar que los porcentajes de supervivencia no mostraron diferencias significativas ($p>0,05$) entre cada tipo de alimento suministrado.

Determinación de Hemogramas.

Los promedios de los números de hemocitos para cada tipo de alimento son presentados en la Figura 13.

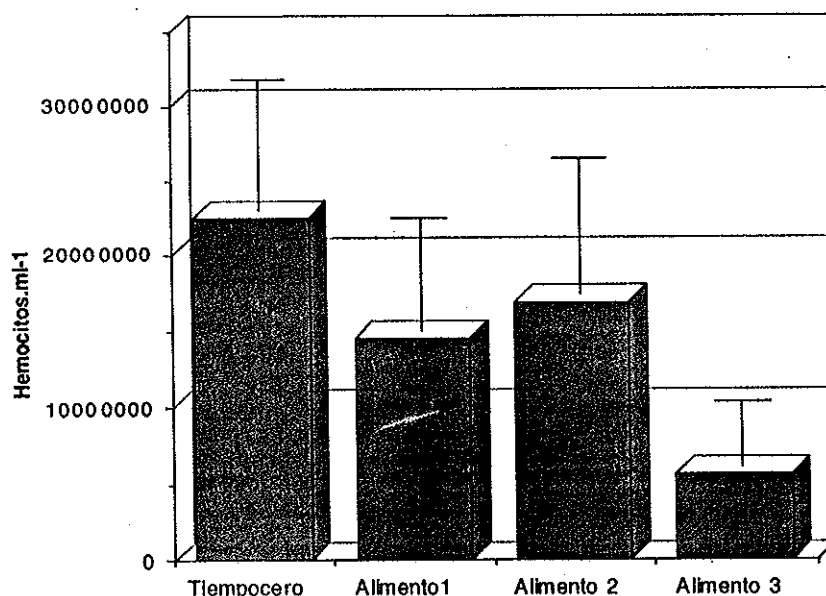


Fig13. Millones de hemocitos totales por ml de hemolinfa de *P. vannamei* para cada tipo de alimento (final del primer bioensayo), comparados con el tiempo cero.
 Tiempo cero: Conteo de hemocitos antes del inicio del bioensayo.
 Alimento 1: Alimento balanceado 22% de proteína.
 Alimento 2: Alimento balanceado 50% de proteína.
 Alimento 3: Alimento natural.

Los resultados de la cuantificación hemocitaria en el tiempo cero muestran, que el número de hemocitos es muy variable, con valores registrados entre 10 y 40 millones de células por ml (promedio de $22'430000 \pm 8'754493$), estas diferencias fenotípicas en animales sometidos a las mismas condiciones de aclimatación y mantenimiento podrían tener su origen en diferencias de tipo genotípico. Esta variabilidad en los datos puede ser comparada con la registrada por Muñoz (1996) para juveniles de *P. vannamei*. En efecto, Muñoz reporta

valores desde 5 hasta 10 millones de hemocitos.ml⁻¹. Además el promedio de hemocitos circulantes en *P. vannamei* no difieren sustancialmente de los valores encontrados por Muñoz para *P. vannamei* (1996), y por Martin & Graves (1985) en *P. californiensis* (10 millones de hemocitos.ml⁻¹), y en el camarón *Sycionia ingentis* (Ridgeback prawn) donde se encontraron valores de 14 millones de hemocitos.ml⁻¹.

Además estos resultados mostraron un decremento del número de hemocitos en los animales del bioensayo, comparado con los valores obtenidos en el tiempo cero (promedio de 22 millones de hemocitos.ml⁻¹) ($p < 0.05$). Esto podría sugerir que la condición inmunitaria del animal decrece desde el momento en que llega de la camaronera a los tanques de experimentación.

Cabe mencionar que se encontró diferencias significativas entre los alimentos 1, 2, y 3 ($p < 0.05$), siendo mayor el valor en los animales alimentados con balanceados comerciales que en el caso de los que tuvieron alimento natural. El promedio más elevado (mayor a 15 millones de hemocitos.ml⁻¹) se encontró en el balanceado con 50% de proteína (alimento 2), en tanto que el promedio más bajo se registró en los animales que recibieron la dieta natural (alimento tres), confirmando la presencia de algún problema en estos animales.

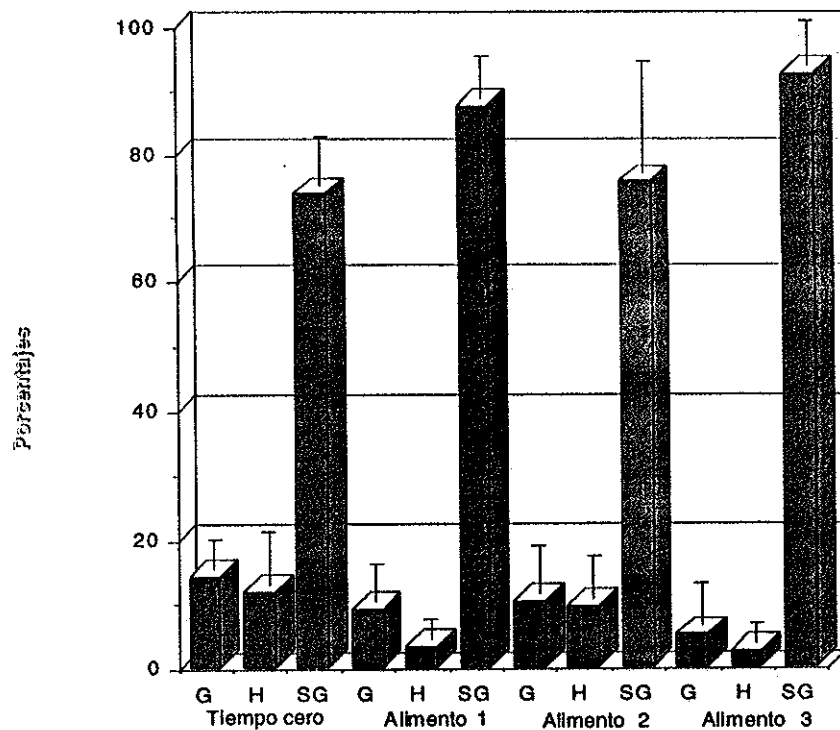


Fig. 14. Tipos hemocitarios expresados en porcentajes para los animales de cada tipo de alimento.
 Tiempo cero: Hemograma antes del inicio del bioensayo.
 Alimento 1: Alimento balanceado 22% de proteína.
 Alimento 2: Alimento balanceado 50% de proteína.
 Alimento 3: Alimento natural.
 G: Hemocitos Granulosos
 SG: Hemocitos Semigranulosos
 H: Hemocitos hialinos.

La figura(14) muestra que los porcentajes de hemocitos obtenidos en el tiempo cero, son similares a los registrados por Muñoz (1996), quien determinó que para juveniles de *P. vannamei* el porcentaje de hemocitos semigranulosos y hialinos era aproximadamente del 70%.

En lo que concierne al bioensayo se observó diferencias significativas ($p < 0.05$) de la fórmula hemocitaria entre los animales del tiempo cero y los del bioensayo, esta variación fué evidente inclusive entre los diferentes tratamientos. Estas alteraciones se tradujeron por un incremento de células semigranulosas y una pérdida de células hialinas y granulosas, en los animales del bioensayo sobre todo en los animales alimentados con la dieta tres.

Cuantificación del anión superóxido

Los resultados obtenidos en la cuantificación del O_2^- mediante la técnica de reducción del NBT son presentados en las figura 15.

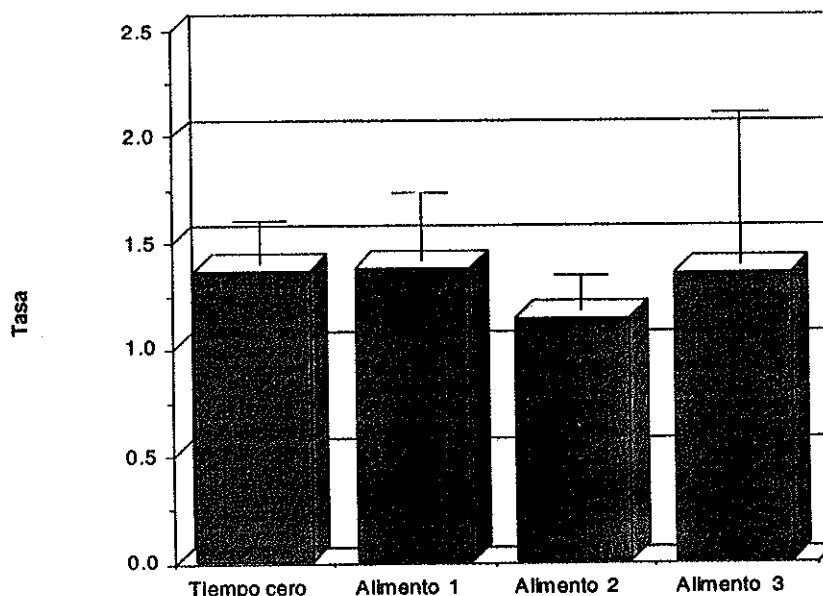


Fig.15. Producción del O_2^- expresado en Tasas entre el valor de hemocitos estimulados y no estimulados. Tiempo cero: Pruebas antes del inicio del bioensayo. Alimento 1: Alimento balanceado 22% de proteína. Alimento 2: Alimento balanceado 50% de proteína. Alimento 3: Alimento natural.

Los tasas obtenidas variaron en un rango de valores desde 1.1 (animales con alimento 2) hasta 1.4 (animales del tiempo cero). No existieron diferencias significativas entre los tratamientos 1 y 3 y el tiempo cero. La tasa más baja se obtuvo con los animales que recibieron el alimento 2 (dieta del 50% de proteína).

Según resultados reportados por Muñoz (1996) existiría una relación entre el número de hemocitos y la producción de anión superóxido. Sin embargo los resultados obtenidos en los tratamientos alimenticios no concuerdan con esta hipótesis. En efecto los animales que recibieron los alimentos 2 y 3 presentaron cantidades de hemocitos decrecientes que no se acompañaron de una menor producción de anión superóxido. Si bien se desconocen las causas reales de esta respuesta podríamos sugerir que estos animales cultivados en condiciones estresantes (A1, A3) presentan una población hemocitaria en estado de

activación, pero no se puede descartar tampoco alguna relación con las modificaciones observadas en las fórmulas hemocitarias.

Cuantificación de proteínas totales presentes en el plasma de *P. vannamei*

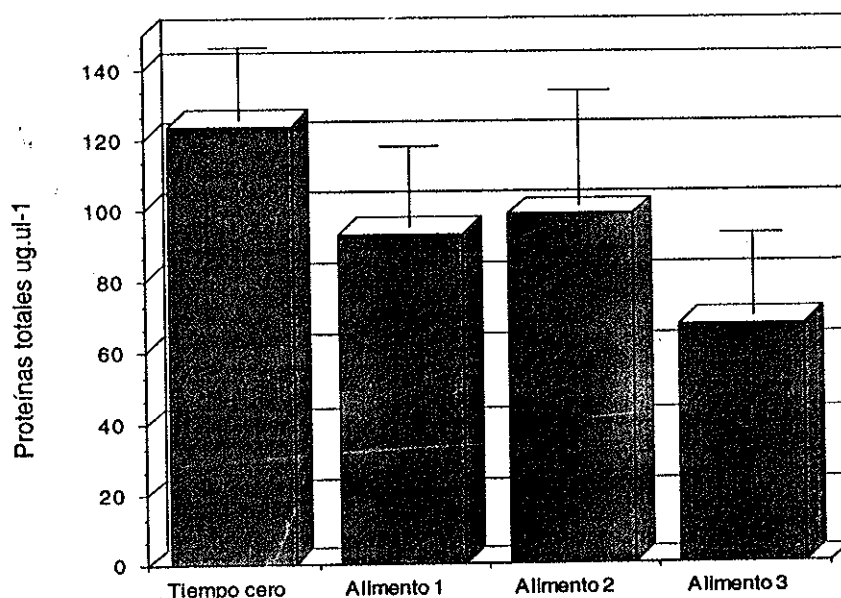


Fig.16. Cuantificación de proteínas totales en el plasma. Según el método de Lowry para cada tratamiento alimenticio, comparado con el tiempo cero.

Tiempo cero: Cuantificaciones realizadas antes del inicio del bioensayo.

Alimento 1: Alimento balanceado 22% de proteína.

Alimento 2: Alimento balanceado 50% de proteína.

Alimento 3: Alimento natural.

Como se puede observar en la figura 16 las cantidades iniciales de proteínas registradas como promedio en el tiempo cero, fueron mucho mayores a las obtenidas luego del bioensayo, en efecto los valores de proteínas totales registrados inicialmente se presentaron entre 80 y 160 ug.ul⁻¹ con un promedio de $125,28 \pm 22,02$, valores similares han sido normalmente encontrados en juveniles de *P. japonicus* (Rodríguez, com.per.), y en otros decápodos (Depledge & Bjerregaard, 1989), al final del bioensayo estos valores se hallaron entre 60 y 100 ug.ul⁻¹ de proteína, registrándose los valores más bajos de proteína en el tratamiento 3 ($p < 0,05$), en tanto que en los tratamientos 1 y 2 (dietas de balanceados comerciales) los valores fueron mayores sin presentar diferencias significativas entre ellos ($p > 0,05$). Los valores obtenidos con la cuantificación de proteínas totales, permiten confirmar el decremento en la calidad de los animales, al ser sometidos al estrés de los

tanques de experimentación y el mal estado fisiológico de los animales sometidos a la dieta

3.

Inmunopruebas de tipo ELISA en dot-blot.

Las proteínas α 2-macroglobulina, factor de coagulación, y aglutinina fueron detectadas mediante inmunopruebas dot-blot de tipo ELISA. La estimación de cada una de las proteínas, se basó en la comparación de los resultados obtenidos a partir de los diferentes animales muestreados, con una escala constituida de 4 valores atribuidos a 4 intensidades colorimétricas. (Figura 17).

Fig 17: Escala colorimétrica para la calificación de las pruebas de dot-blot.

Los resultados de las inmunodosificaciones de factores plasmáticos son presentados en la figura 18.

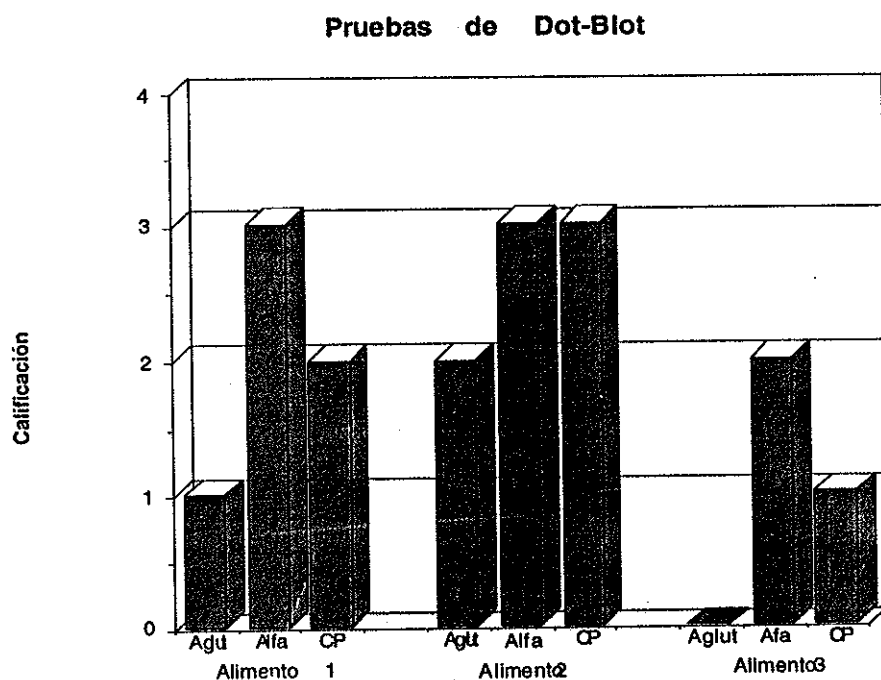


Figura 18: Resultados de inmunodosificaciones. Pruebas de Dot-Blot para aglutinina, $\alpha 2$ -macroglobulina y factor de coagulación.

Alimento 1: Alimento balanceado 22% de proteína.

Alimento 2: Alimento balanceado 50% de proteína.

Alimento 3: Alimento natural.

Como se puede observar en la figura 18, para todas las inmunodosificaciones realizadas (aglutinina, factor de coagulación, $\alpha 2$ -macroglobulina) las mayores calificaciones están en los animales del alimento 2, las intermedias en los del alimento 1 y las más bajas en los animales del tercer tipo de alimento. Adicionalmente las pruebas de inmunodosificaciones, realizadas con los AcMc anti factor de coagulación y anti aglutinina, mostraron diferencias entre las tres dietas. Cabe recalcar que en el caso de la determinación de la aglutinina la calificación es de cero para los animales que recibían el alimento 3, indicando que no hubo detección de este factor en el plasma de estos animales. No se detectó diferencias de la proteína $\alpha 2$ -macroglobulina entre los animales que recibieron los alimentos 1 y 2, pero sí entre estos y los que recibieron la dieta 3, según estos resultados las tres proteínas en cuestión podrían constituirse en marcadores de estrés, pero la aglutinina y el factor de

coagulación serían más sensibles a detectar diferencias en el contenido proteico de la dieta, cabe mencionar que el factor de coagulación es una lipoglicoproteína (Kopacek, *et al.*, 1993) y como tal se podría esperar variaciones en su concentración provocadas por las diferencias en las dietas.

Actividad antibacteriana

Los valores de actividad antibacteriana, registrados como porcentajes de inhibición del crecimiento bacteriano, son presentados en la Figura 19

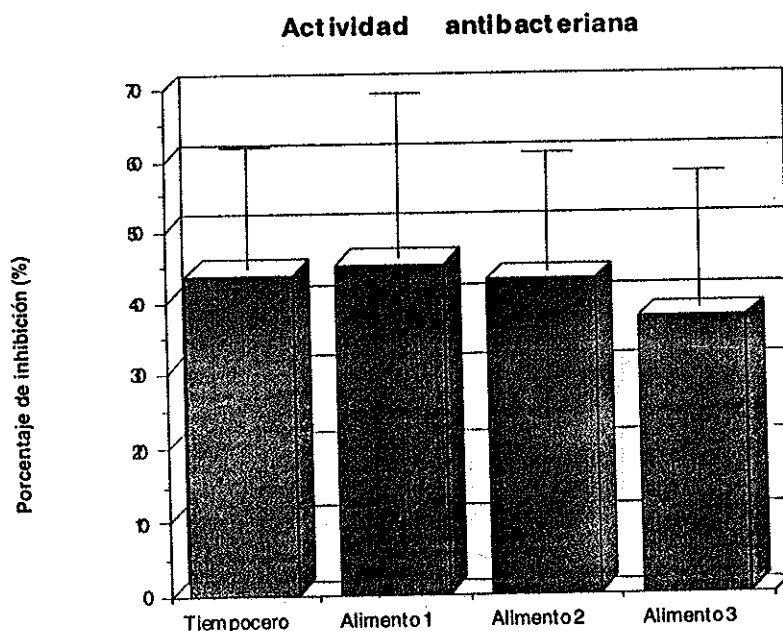


Figura 19. Actividad antibacteriana expresada como porcentajes de inhibición del crecimiento bacteriano.
Tiempo cero: Pruebas realizadas antes del inicio del bioensayo.
Alimento 1: Alimento balanceado 22% de proteína.
Alimento 2: Alimento balanceado 50% de proteína.
Alimento 3: Alimento natural.

Los porcentajes de inhibición del crecimiento bacteriano estuvieron en un rango entre 7-90%. No se encontró diferencias significativas entre los tratamientos y el tiempo cero.

Los resultados obtenidos con la prueba de actividad antibacteriana en este primer bioensayo no son muy informativos, esto podría deberse a que en este tipo de ensayos no se cuantifican factores definidos como es el caso de los ensayos de dosificación (e.g. hemograma, proteínas

totales, inmunodosificaciones de tipo dot-blot) sino que la actividad que se mide puede estar ligada a la conjugación de diferentes factores que actuarían sinérgicamente y que pueden responder de forma poco previsible a las condiciones del medio.

Análisis Integrado de los efectores inmunitarios.

Los valores obtenidos con cada una de las pruebas inmunitarias en función de la dieta suministrada, fueron transformados a índices parciales, con la finalidad de alcanzar la homogeneidad requerida que permita integrarlos en un índice global para cada grupo de animales. En este primer bioensayo no se presentó los índices del T0 debido a que en estos animales no se realizó las inmunodosificaciones (Fig.20).

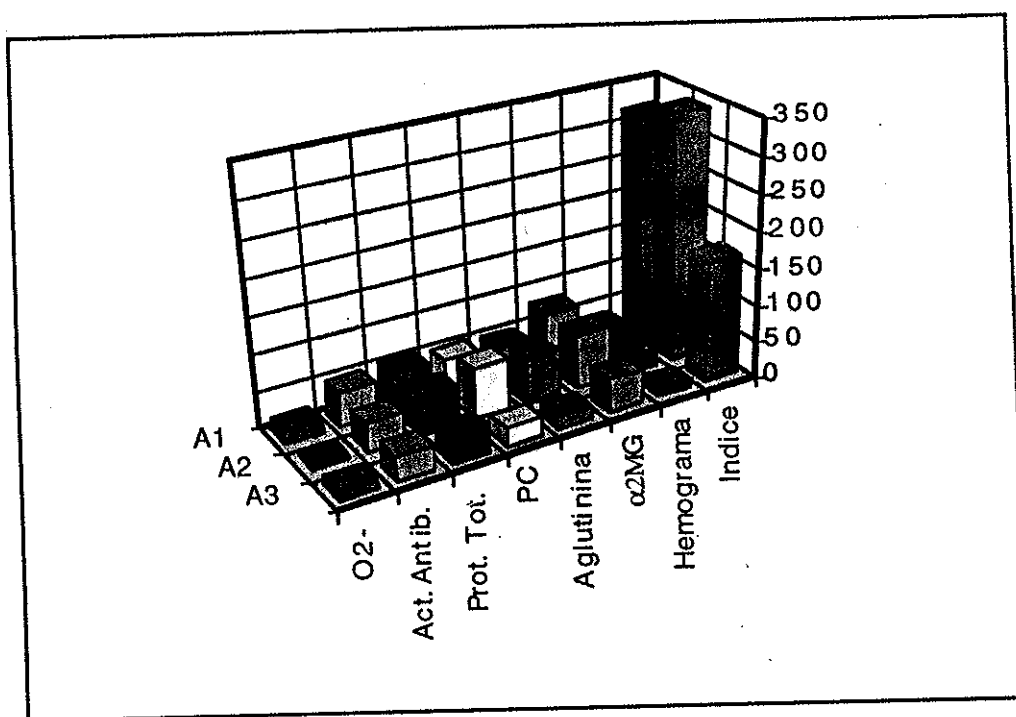


Fig.20: Análisis integrado de los efectores inmunitarios. Se ha representado el índice de cada prueba en función de la dieta suministrada (índice parcial), y el índice inmunitario obtenido para cada grupo de animales (índice global). Se puede observar que el mayor índice inmunitario global se presentó en los animales del tratamiento A2 y el más bajo en los del tratamiento A3.

El mayor índice global se registró en los animales que recibieron la dieta 2 (A2), en tanto que el índice más bajo se encontró en los animales alimentados con la dieta 3 (A3). Si se observa con atención la figura 20 se puede concluir además, que los índices parciales que ejercieron

* mayor influencia sobre las diferencias encontradas en los índices globales fueron: Proteínas totales, proteína de coagulación, aglutinina y hemograma.

Por otra parte con la finalidad de determinar los efectores inmunitarios con mayor susceptibilidad de sufrir modificaciones según la dieta suministrada se calculó el CV (coeficiente de variabilidad) de cada prueba usando los índices parciales (Tabla 1). Encontrándose que estos efectores fueron: proteína de coagulación, aglutinina y hemograma.

Los índices globales además permiten observar o reflejan las situaciones de estrés generadas por la calidad del alimento. Esto se observa al comparar los índices de los tratamientos 1 y 2, siendo este último mayor que el primero, como se recordará la dieta 2 se caracterizó por tener un mayor contenido proteico que la dieta 1. Por otra parte el estrés que se generó en los animales del tercer grupo estuvo acompañado de un índice global muy bajo para los animales que recibieron este tipo de alimento.

Tabla 1: Coeficientes de variación de los índices obtenidos. Los efectores que presentaron los CV más altos fueron, aglutinina, hemograma y proteína de coagulación.

	O ₂ ⁻	Act.Ant	Prot.To	PC	Agluti	Alfa2	Hemog.
Prom.	11,96	39,51	52,81	45,95	40,26	64,62	34,41
D.Est.	4,9	6,54	17,73	23,37	23,28	17,36	18,25
CV	0,41	0,17	0,34	0,51	0,58	0,27	0,53

3.1.2.Segundo Bioensayo

Debido a la mortalidad que se presentó en los animales que recibieron la dieta 3, durante el primer bioensayo y con la finalidad de descartar un proceso infeccioso ya presente en los camarones como posible causa, se procedió a realizar una desinfección de los camarones antes de ser utilizados en el segundo bioensayo, durante el período de aclimatación en tanques exteriores. Para realizar esta desinfección se utilizó una mezcla de los antibióticos oxitetraciclina a 25 ppm y cloranfenicol a 10 ppm, éstas concentraciones fueron elegidas de acuerdo a resultados obtenidos de experiencias previas de desinfección en el Cenaim.

Luego del tratamiento con antibióticos se aplicó probióticos (*Vibrio alginolyticus* 10^5cél.ml^{-1}), con el fin de restaurar la flora intestinal de los camarones.

3.1.2.1. Resultados de pruebas inmunitarias del segundo bioensayo

Supervivencia.

Los resultados obtenidos de supervivencia para cada uno de los tratamientos con cada una de sus replicas son presentados en la figura 21.

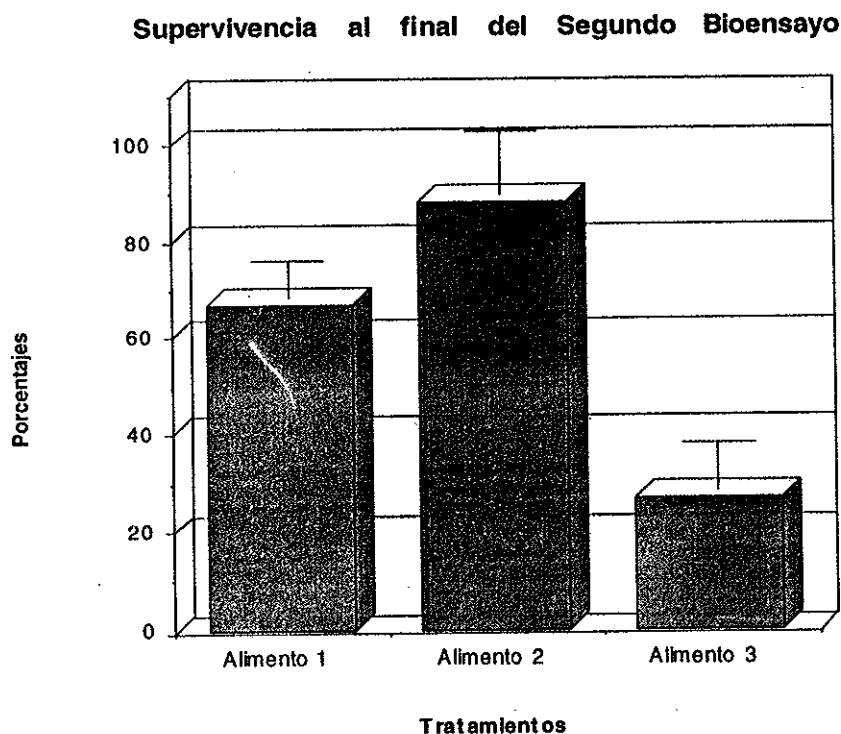


Fig 21. Porcentajes de supervivencia en cada tratamiento con sus réplicas.
Tratamiento 1: Alimento balanceado 22% de proteína.
Tratamiento 2: Alimento balanceado 50% de proteína.
Tratamiento 3: Alimento natural.

Los datos de supervivencia son muy similares a los obtenidos durante el primer bioensayo, es decir que se observó una supervivencia aceptable en los animales de los tratamientos 1 y 2 (alimentos de 22 y 50% de proteína), y una gran mortalidad en los camarones del tratamiento 3 (alimento natural). Estos resultados evidenciarían que la mortalidad estuvo asociada a la

dieta 3 y no a un proceso infeccioso previo de los camarones ya que el tratamiento antibiótico no introdujo ninguna modificación a los resultados de supervivencia.

Debido a que la cantidad de animales fue muy baja en los tanques del alimento 3, se procedió a agrupar los animales por tratamientos para el análisis de las pruebas realizadas, al igual que en el primer bioensayo. Esto se pudo hacer tomando en consideración que no existían diferencias significativas ($p > 0,05$), entre las réplicas de cada tratamiento, en todas las pruebas realizadas. Es de anotar que no se encontró diferencias significativas entre las supervivencias de los animales de los tratamientos 1 y 2 ($p > 0,05$), pero sí entre los animales que recibieron alimento natural y los de los dos tratamientos antes mencionados ($p < 0,05$).

Este problema asociado a la dieta 3 podría deberse a una mala calidad del alimento empleado, ya sea por descomposición (malas condiciones de congelación, congelaciones y descongelaciones repetidas) o contaminación de este, lo que se justificaría debido a que el alimento estuvo compuesto en gran parte por animales filtradores y bioacumuladores (ostras, mejillones y almejas). Otra posibilidad es que este tipo de alimento constituya un sustrato adecuado para el crecimiento de bacterias oportunistas presentes en los tanques de cultivo, que colonizarían luego los tractos digestivos de los animales.

Determinación de Hemogramas.

El número total de hemocitos por dieta es presentado a continuación en la Figura 22. El conteo de hemocitos sigue indicando una gran variabilidad entre los individuos, pues los valores encontrados en el tiempo cero fluctúan entre los 12 y 46 millones de hemocitos. ml^{-1} . Estos valores son comparables con los registrados en el tiempo cero del primer bioensayo en los que se registraron valores entre 10 y 40 millones de hemocitos ml^{-1} .

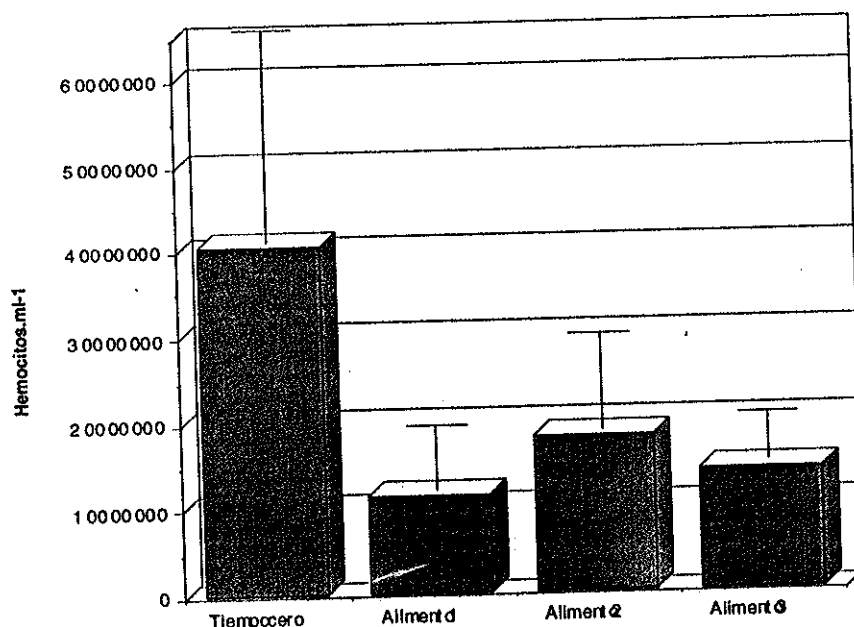


Fig. 22 Millones de hemocitos.ml⁻¹ para cada tratamiento (final del segundo bioensayo).
 Tiempo cero: Conteos hemocitarios realizados antes del inicio del bioensayo.
 Alimento 1: Alimento balanceado 22% de proteína.
 Alimento 2: Alimento balanceado 50% de proteína.
 Alimento 3: Alimento natural.

Los animales sometidos a las diferentes dietas dieron como resultados valores entre 11 y 18 millones de hemocitos.ml⁻¹. Estos valores reflejan (una situación ya observada en el primer bioensayo) la pérdida en la calidad de los animales, con respecto al tiempo cero en el cual el promedio fue de 40 millones de hemocitos.ml⁻¹. Los animales sometidos al alimento 2 presentaron un promedio mayor de hemocitos con respecto a las dietas 1 y 3. En este segundo bioensayo el número total de hemocitos se revela como marcador de la calidad de la dieta, diferencias significativas ($p < 0,05$) entre alimento 1 y 2, y no sólo de una condición de estrés como se pudo observar en el primer bioensayo. Por otro lado se pudo observar que no existieron diferencias entre los animales del alimento 3 y los de los animales de los alimentos 1 y 2.

Los porcentajes de cada tipo hemocitario son presentados por tanques y por tratamientos en la figura 23.

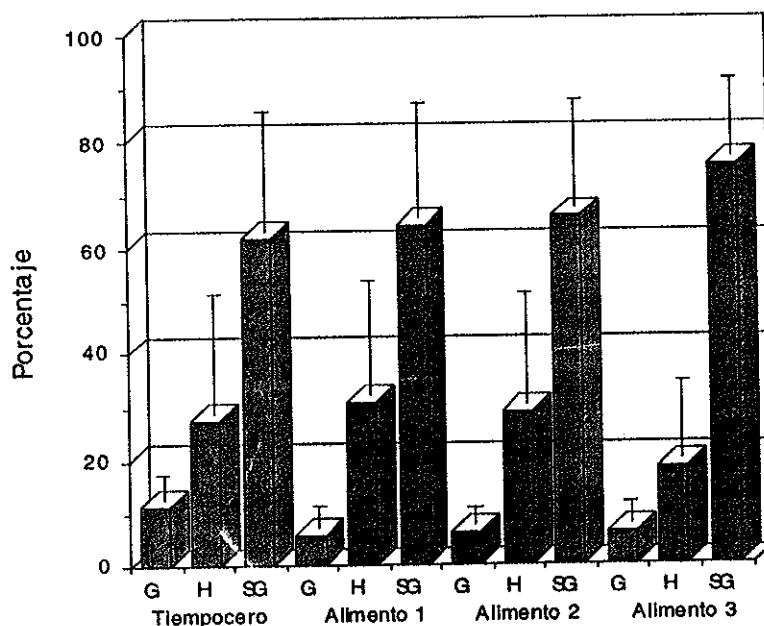


Fig. 23. Tipos hemocitarios expresados en porcentajes para cada tratamiento (medias de los valores registrados en los tanques).

Tiempo cero: Conteos hemocitarios realizados antes del inicio del bioensayo.

Alimento 1: Alimento balanceado 22% de proteína.

Alimento 2: Alimento balanceado 50% de proteína.

Alimento 3: Alimento natural.

Si se observa el hemograma de los animales del tiempo cero se nota que el número de hemocitos granulados se mantiene en los mismos porcentajes que en los animales del tiempo cero del primer bioensayo (11%), pero no así los hemocitos hialinos y semigranulosos, los hialinos sufrieron un incremento en relación a los datos del primer bioensayo, pues representaron cerca del 30% de los hemocitos, en tanto que los hemocitos semigranulosos sufrieron una baja en su porcentaje, pues representaron tan solo un 60% del total de hemocitos circulantes.

Como se recordará durante el primer bioensayo se observó un incremento en el porcentaje de las células semigranulosas, y una disminución de la proporción de células hialinas y granuladas en relación a la calidad de la dietas empleadas. En el segundo bioensayo la modificación de la fórmula hemocitaria es menos clara; sin embargo, es evidente para los camarones sometidos a la tercera dieta un incremento de células semigranulosas (75%), y una pérdida de células granuladas, con valores entre 5-6%, .

Cuantificación del anión superóxido

Los resultados de las pruebas de producción del anión superóxido pueden observarse en la Figura 24

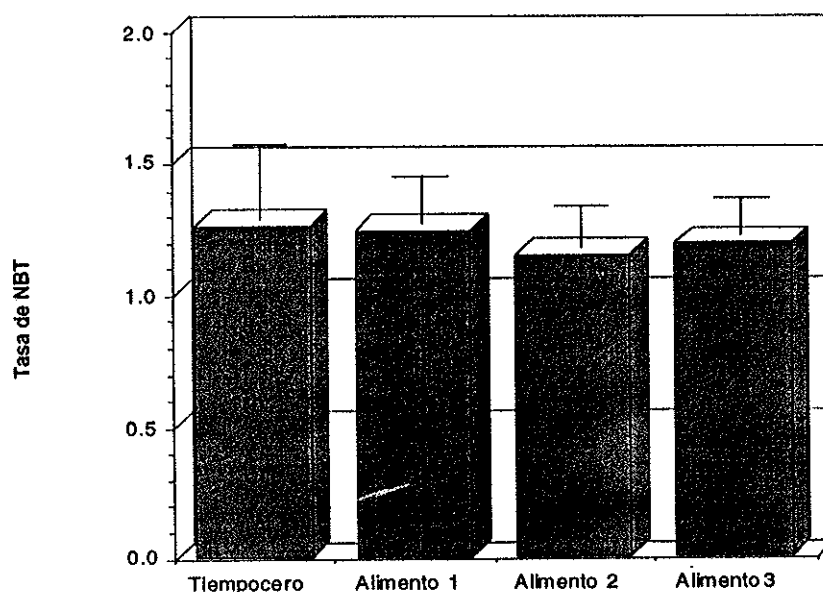


Fig. 24. Producción de anión superóxido expresado en tasas luego de los tratamientos en el segundo bioensayo. Tiempo cero: Pruebas antes del inicio del bioensayo.
Alimento 1: Alimento balanceado 22% de proteína.
Alimento 2: Alimento balanceado 50% de proteína.
Alimento 3: Alimento natural.

La producción de anión superóxido, registró valores entre 1.0 y 1.8, estos resultados son similares a los obtenidos en el primer bioensayo. Las pruebas de cuantificación del anión superóxido por medio de la reducción del NBT siguen ~~siguen~~ sin mostrar resultados concluyentes, pues las tasas registradas no indican la existencia de diferencias entre los tratamientos aplicados y al igual que lo ocurrido durante el primer bioensayo no hubo relación entre producción de anión superóxido y número de hemocitos. Las tasas de los animales que recibieron el alimento 3 y que tienen un promedio de 11 millones de hemocitos por ml. no difieren de las tasas obtenidas de los animales del tiempo cero, en los que se contabilizó un promedio de 40 millones de hemocitos por ml.

Los datos obtenidos en los dos bioensayos ameritan profundizar estudios más fundamentales sobre el choque respiratorio y sobre los rangos de normalidad de la respuesta, en función del

número de hemocitos. Los resultados obtenidos indicarían un aumento de la reactividad de los hemocitos bajo condiciones de estrés, sin embargo, este aumento es enmascarado por el hecho de que en animales menos estresados (tiempo cero, alimento 2) la respuesta sí estaría en función del número de hemocitos.

Cuantificación de proteínas totales presentes en el plasma de *P. vannamei*

Los valores obtenidos en la cuantificación de proteínas totales mediante el método de Lowry son presentados en la figura 25. Los niveles de proteínas totales en los animales del tiempo cero se encontraron entre 120 y 145 $\mu\text{g} \cdot \text{ul}^{-1}$ de plasma, valores mas importantes que los niveles registrados en el primer bioensayo. Estos datos se encuentran dentro de los normalmente registrados en otros peneidos (Rodríguez, com.per.).

Adicionalmente las pruebas de cuantificación de proteínas por el método de lowry mostraron claramente un decremento en los niveles de proteínas totales en todos los tratamientos, con cantidades de proteínas detectados entre 45 y 60 $\mu\text{g} \cdot \text{ul}^{-1}$ de plasma. Además existen diferencias significativas entre los tres tratamientos ($p < 0,05$), siendo los animales que recibieron el alimento 3 (dieta natural) los que registraron las menores cantidades de proteínas, y los animales que recibieron el alimento 2, las mayores cantidades de proteínas con respecto a los camarones de las otras dos dietas.

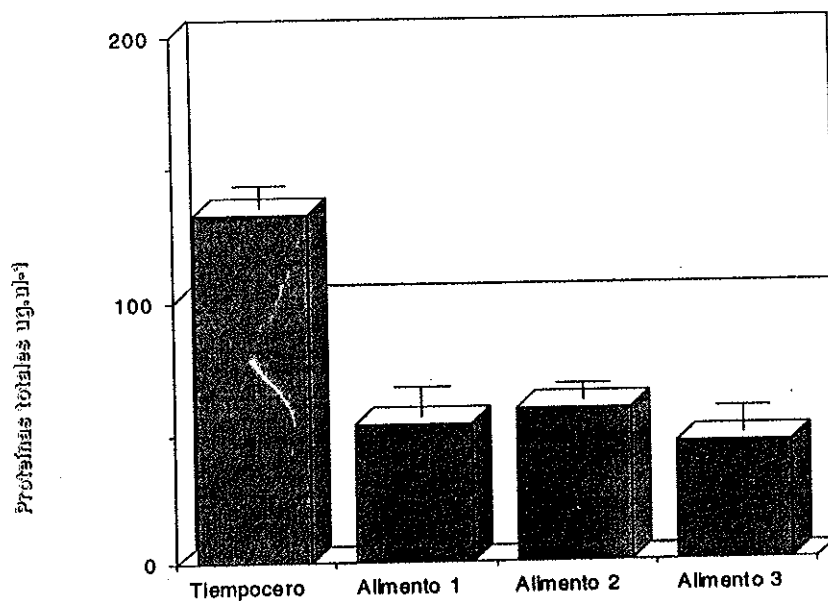


Fig. 25. Cantidades de protefñas totales en el plasma para cada tratamiento expresadas en ug.ul⁻¹
 Tiempo cero: Cuantificaciones realizadas antes del inicio del bioensayo.
 Alimento 1: Alimento balanceado 22% de protefna.
 Alimento 2: Alimento balanceado 50% de protefna.
 Alimento 3: Alimento natural.

Estos resultados no solo confirman las observaciones hechas anteriormente, es decir que las concentración de protefñas puede constituirse en un buen marcador de una situación de estrés, sino que también es suficientemente sensible para mostrar diferencias entre las dietas.

Inmunopruebas de tipo ELISA en dot-blot.

Los resultados de dot blot de los animales sometidos a las diferentes dietas son presentados en la figura 26.

A partir de los resultados de las pruebas de dot-blot se puede concluir que el anticuerpo 40E10 específico contra aglutininas permite observar diferencias, entre los animales sometidos a la dieta 2 (calificación 2) y los animales pertenecientes al tiempo cero y las dietas 1, 3 (calificación 1). El AcMc 41B12 específico contra la α_2 macroglobulina y el AcMc 42E8 anti factor de coagulación permiten observar diferencias entre el alimento natural por una parte y las dietas balanceadas y el tiempo cero, pero no entre estas (figura 26).

Pruebas de Dot-Blot

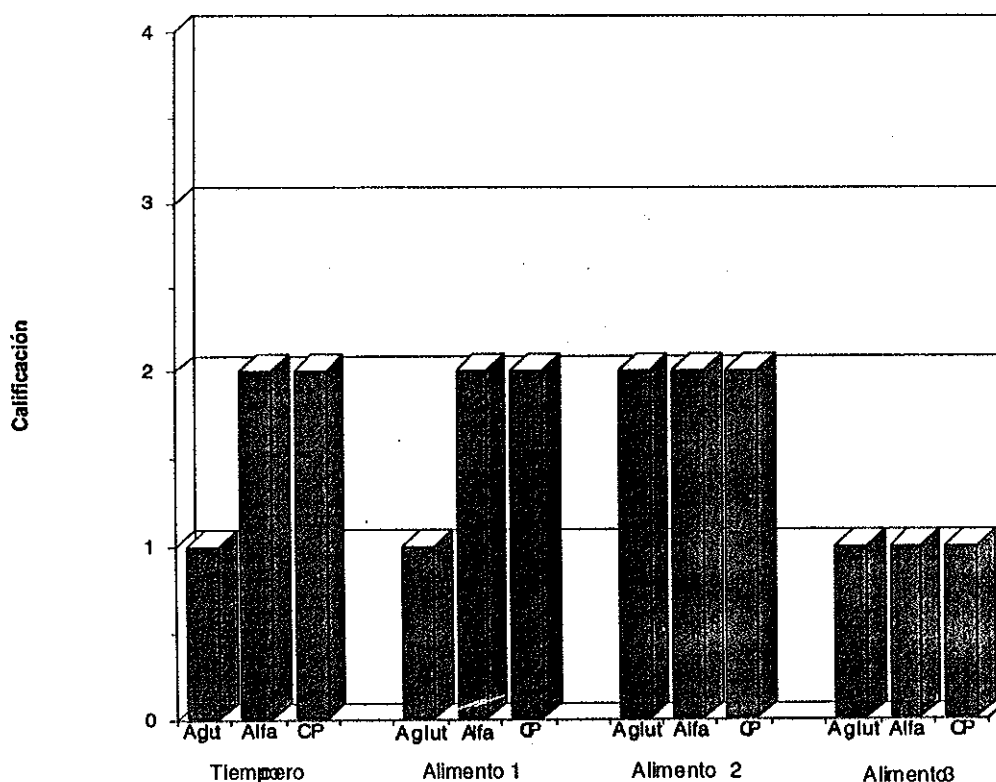


Figura 26. Resultados de inmunodosisificaciones. Pruebas de dot-blot para aglutinina, α_2 -macroglobulina y factor de coagulación (Final del segundo bioensayo).
 Tiempo cero: Pruebas antes del inicio del bioensayo.
 Alimento 1: Alimento balanceado 22% de proteína.
 Alimento 2: Alimento balanceado 50% de proteína.
 Alimento 3: Alimento natural.

Si tomamos en consideración los resultados obtenidos en los dos bioensayos podríamos afirmar que los anticuerpos monoclonales 40E10 y 42E8 proveen mayor información que el anticuerpo monoclonal 41B12. Los resultados sugieren que el factor de coagulación y la aglutinina pueden constituirse en marcadores de estrés patológico (alimento 3) y nutricional (diferencias entre los Alimentos 1 y 2) en tanto que la α_2 macroglobulina es más estable.

Actividad Antibacteriana.

Los valores registrados en las pruebas antibacterianas son presentados en la Figura 27.

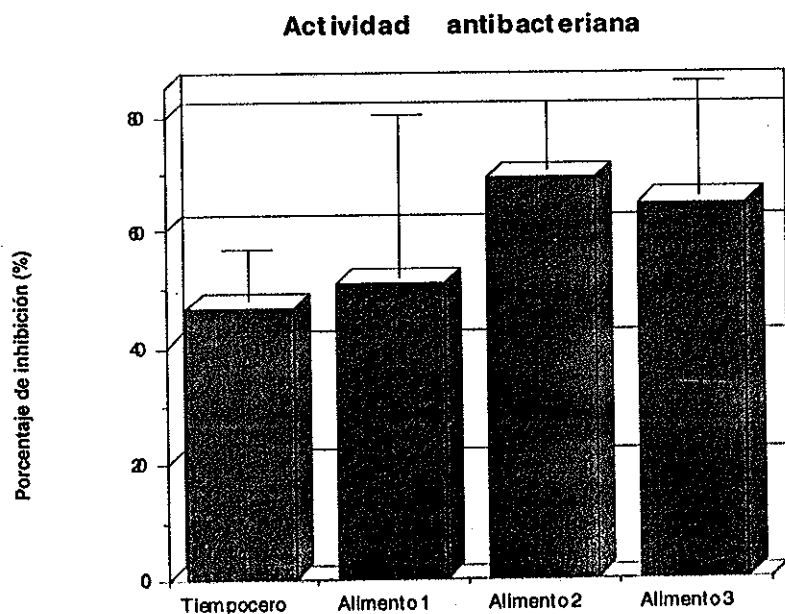


Figura 27. Actividad antibacteriana expresada como porcentajes de inhibición del crecimiento bacteriano. Tiempo cero: Pruebas realizadas antes del inicio del bioensayo. Alimento 1: Alimento balanceado 22% de proteína. Alimento 2: Alimento balanceado 50% de proteína. Alimento 3: Alimento natural.

Los porcentajes de inhibición del crecimiento bacteriano en los animales del tiempo cero estuvieron entre el 30 y 70 %, constituyendo valores semejantes a los hallados en el bioensayo anterior y en otras pruebas realizadas en la misma especie por Tapia (1997).

Los porcentajes de inhibición del crecimiento bacteriano son más elevados en los animales sometidos al bioensayo, observándose también una diferencia significativa entre las tres dietas ($p < 0,05$) y entre estas y el tiempo cero.

Durante el primer bioensayo la actividad antibacteriana no se revela como un buen inmunomarcador. Sin embargo esta situación se revierte en el segundo bioensayo, en el que se encontró un efecto estimulador de las tres dietas. La actividad antibacteriana fue alta incluso en los animales que recibieron el alimento 3, la razón de esta elevada respuesta, en éste último grupo (A3) podría deberse a una selección generada por la presencia de un proceso infeccioso, sin descartar tampoco que la estimulación de esta respuesta haya sido

provocado por algún estado patológico de estos camarones, como se recordará la supervivencia de los animales sometidos a la dieta 3 alcanzó apenas el 20%.

Posiblemente el caso de los animales que recibieron el alimento 2 sea diferente y la respuesta alta observada en ellos esté en realidad ligada a excelentes condiciones fisiológicas, efectivamente si se observa la figura de supervivencia de los animales que recibieron el alimento A2 en el segundo bioensayo (ver fig.21), se encontrará que esta es superior a la encontrada en los animales alimentados con el mismo alimento en el primer bioensayo (ver fig.12). Según resultados de Robalino (1997), la actividad antibacteriana es el parámetro inmunitario más estable, es decir que las diferencias encontradas en el segundo bioensayo podrían estar reflejando mayores modificaciones fisiológicas entre estos animales que las existentes entre los camarones del primer bioensayo.

Análisis Integrado de los efectores inmunitarios al final del Segundo Bioensayo.

Con la finalidad de obtener los mismos índices globales presentados en el primer bioensayo se transformó nuevamente los valores obtenidos en las pruebas inmunitarias a índices parciales. En este segundo bioensayo si se presentan los índices del T0, pues a diferencia del primer bioensayo si se realizaron las inmunodosis (Fig. 28).

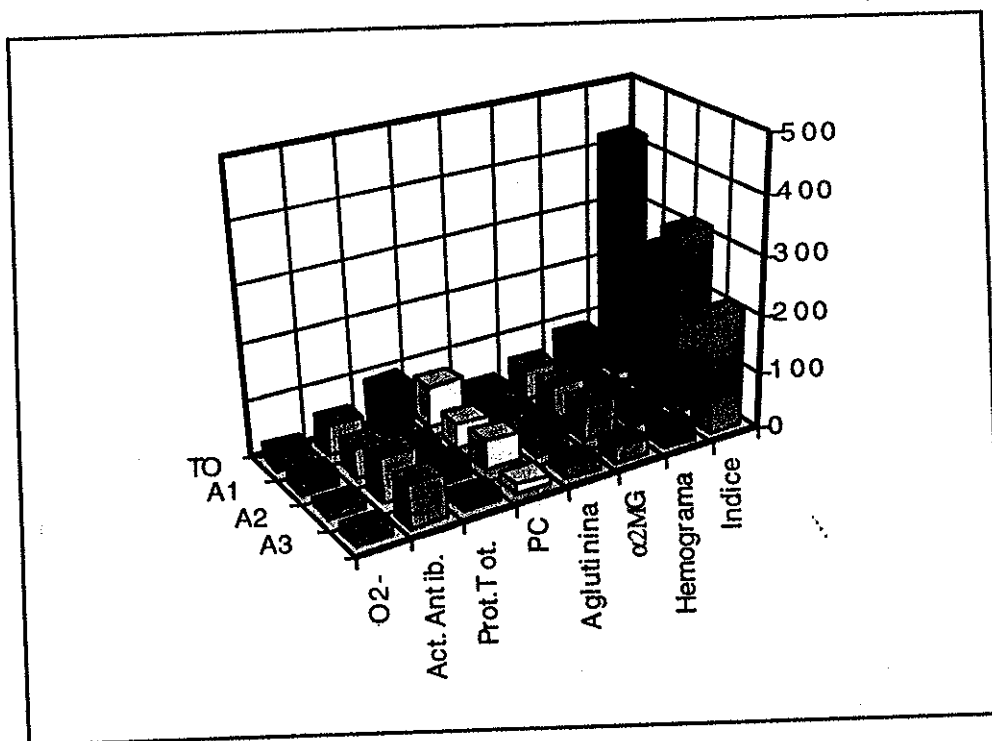


Fig. 28: Análisis integrado de los efectores inmunitarios. Se representa el índice de cada prueba en función de la dieta suministrada (índice parcial) y el índice inmunitario obtenido para cada grupo de animales (índice global). Los mayores índices globales fueron registrados en el T0 y en el segundo tratamiento (A2). El índice más bajo se observó en los animales de la tercera dieta (A3), lo que corrobora lo obtenido en el primer bioensayo.

Los resultados obtenidos en el primer ensayo son corroborados con los obtenidos en el segundo bioensayo, pues se mantiene el hecho de que los índices parciales que mayor influencia ejercieron sobre los índices globales fueron: proteínas totales, proteína de coagulación, aglutinina y hemograma. Adicionalmente a esto se observa que el índice parcial de la $\alpha 2$ -macroglobulina contribuye a bajar el índice global de los animales de la dieta 3 (A3). En tanto que la actividad antibacteriana hace subir los índices globales de los animales que recibieron las dietas 2 y 3.

Así mismo se puede observar en la figura 28 que los índices globales reflejan la calidad de la dieta, pues los animales que recibieron el tratamiento A2 (50% de proteína) mostraron un mejor índice que los que recibieron la dieta 1 (A1) (22% de proteína), también se pudo

observar que los animales de la dieta 3 (A3) que correspondían al grupo que mayores problemas de mortalidad presento, mostraron el índice más bajo.

Los CV más altos fueron observados en proteínas totales, proteína de coagulación y hemograma, como se recordará en el primer bioensayo tambien se observó un alto CV para estos dos últimos parámetros inmunitarios. (Tabla 2).

Tabla 2: Coeficientes de variación de los índices obtenidos. Los CV más altos se obtuvieron en proteínas totales, hemogramas, proteína de coagulación.

	O2 ⁻	Act.Ant	Prot.To	PC	Agluti	Alfa2	Hemog.
Prom.	19,61	63,68	39,86	45,38	32,16	50,72	43,54
D.Est.	5,65	13,25	33,82	23,02	9,06	15,66	29,59
CV	0,29	0,21	0,85	0,51	0,28	0,31	0,68

3.2. EVALUACION DE ENSAYOS INMUNITARIOS BAJO CONDICIONES DE INTOXICACION CON TILT®

Por la existencia de zonas agrícolas, en las cercanías de piscinas camaroneras con problemas patológicos, se ha incriminado a los fungicidas usados en agricultura, como causantes de la aparición de patologías, particularmente al Tilt® y al Calixin® que son empleados en grandes cantidades en las zonas bananeras para combatir la Sigatoka negra.

Experimentaciones preliminares *in vitro* permitieron observar una disminución de la producción del anión superóxido en presencia del fungicida Tilt® (propiconazole) (datos no presentados) lo que condujo a la realización de un estudio *in vivo*, del efecto de este producto sobre la respuesta inmunitaria de los camarones.

3.2.1. Resultados de los muestreos

Como se ha descrito en Materiales y Métodos (Ver en 2.4.2), tres grupos de animales fueron inyectados con 3 dosis de Tilt® (1ppb, 10ppb y 100 ppb), se llevó dos controles, uno con animales inyectados con solución salina (CI) y uno de animales no inyectados (CN) para control de respuesta inmunitaria normal. Estos animales fueron muestreados en dos ocasiones a los 6 y 13 días. Cabe indicar que debido a daños de los equipos (tanques) se perdió un grupo de los animales tratados con 10 ppb de Tilt®.

Los resultados para cada una de las pruebas son presentados a continuación

Hemogramas

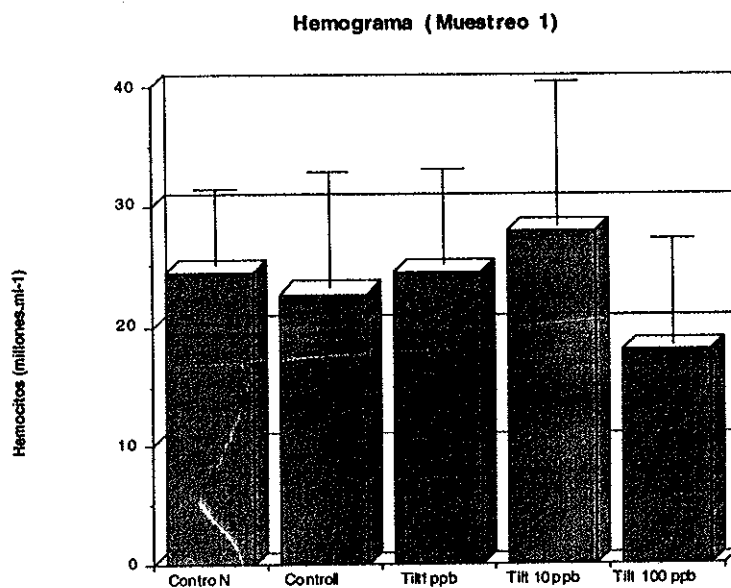
En la figura 29a.y 29b.se presentan los resultados obtenidos del conteo de hemocitos totales y de los porcentajes de cada tipo hemocitario.

El número de hemocitos en los dos muestreos no dió diferencias entre los cinco grupos de camarones (figs. 29a, 30a.)

En el primer muestreo los animales inyectados con solución salina mostraron una alteración de la fórmula hemocitaria. Se observó un incremento de las células granulosas y una disminución de las semigranulosas, pero en presencia de Tilt® sucedió lo contrario se elevó el porcentaje de células semigranulosas y disminuyó el de granulosas en función de la concentración de Tilt® empleada. En cuanto a células hialinas no hubo diferencias (Ver figura 29b.) entre los cinco grupos de los animales.

En el segundo muestreo no hubo diferencias de porcentajes de tipos hemocitarios ($p > 0,05$) entre los cinco grupos de camarones (Ver figura 29b.).

a)



b)

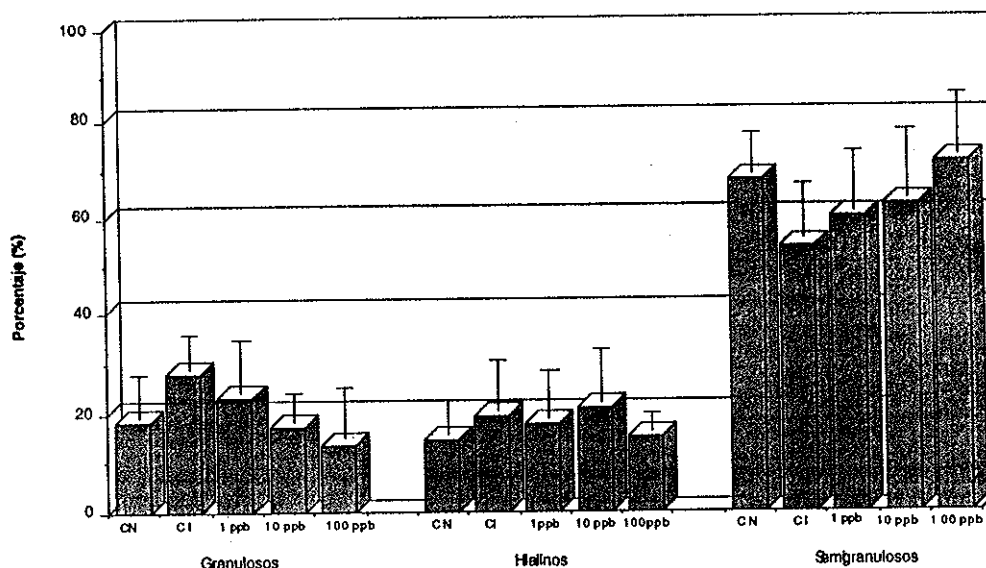


Fig.29: Resultados de hemogramas del primer muestreo.

a)Millones de hemocitos totales por ml de hemolinfa. No se encontró diferencias significativas ($p>0,05$) en el número de hemocitos en ninguno de los cinco grupos analizados.

b)Porcentajes de tipos hemocitarios. Los porcentajes de cada tipo hemocitario mostraron una alteración entre células semigranulosas y granulosas en función con la concentración de Tilt® empleada.

CN: Control sin inyección

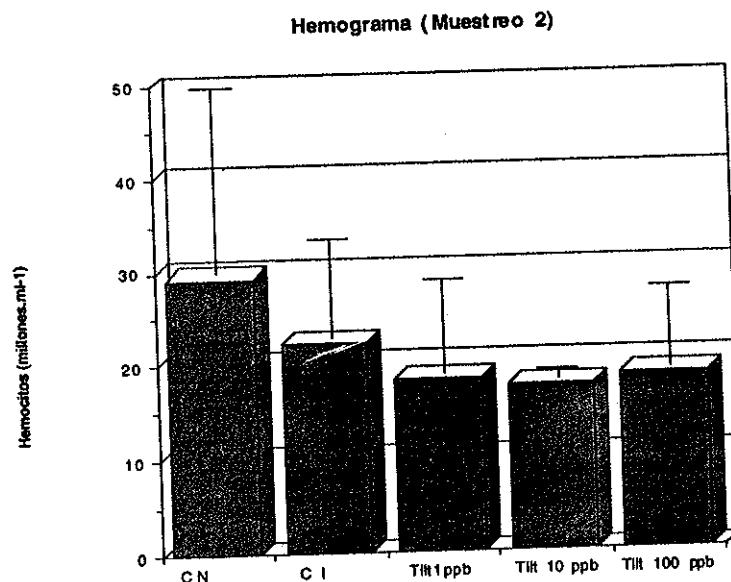
CI: Control con inyección de solución salina

1 ppb: Inyección con 1 ppb de tilt®

10 ppb: Inyección con 10 ppb de tilt®

100 ppb: Inyección con 100 ppb de tilt®

a)



b)

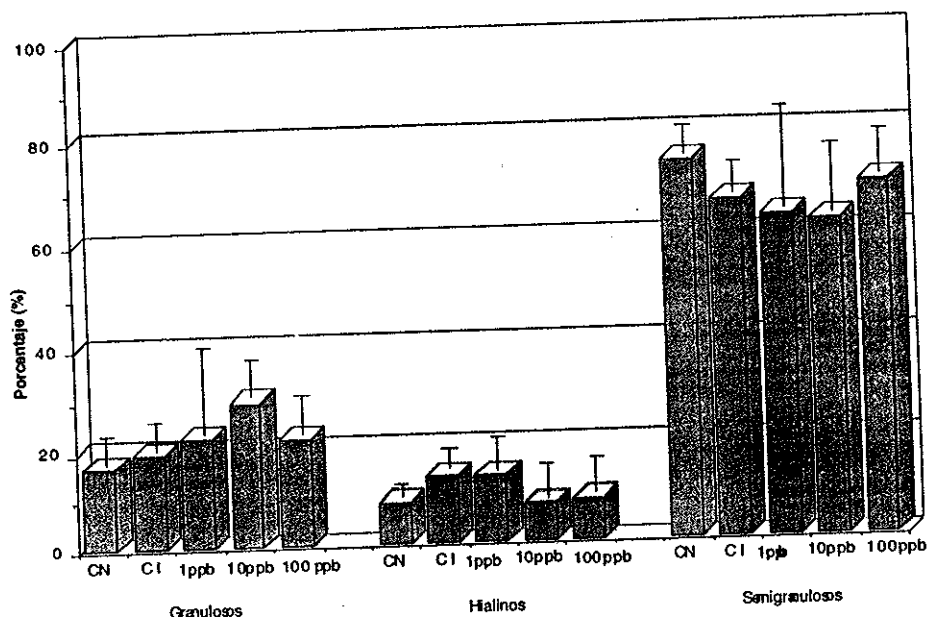


Fig.30: Resultados de hemogramas del segundo muestreo.

a)Millones de hemocitos totales por ml de hemolinfa. No se encontró diferencias significativas ($p>0,05$) en el número de hemocitos de los cinco grupos analizados.

b)Porcentajes de tipos hemocitarios. Tampoco se encontró diferencias entre cada uno de los porcentajes hemocitarios.

CN: Control sin inyección

CI: Control con inyección de solución salina

1 ppb: Inyección con 1 ppb de tilt®

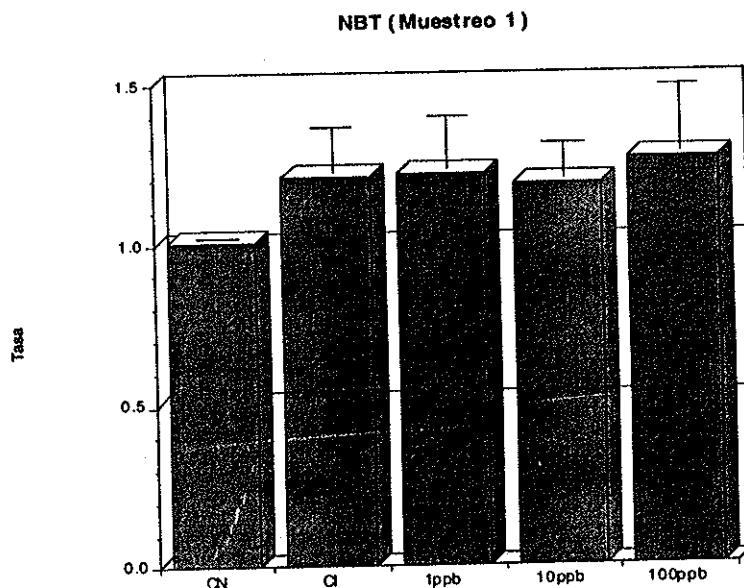
10 ppb: Inyección con 10 ppb de tilt®

100 ppb: Inyección con 100 ppb de tilt®

Cuantificación del anión superóxido

Los resultados analizados como tasas son presentados en la figura 31a y 31b. Como se puede observar el perfil de respuesta de las pruebas de cuantificación del anión superóxido (analizado en tasas) en el segundo muestreo, es similar al observado para las pruebas de cuantificación de proteínas totales e inmunodosificaciones para la aglutinina es decir, estimulación de la producción de O_2^- provocada por la inyección de una solución salina (control CI), estimulación que no se observa en presencia de 1 y 100 ppb de tilt®. (ver figs.31,34,35). Sin embargo, tomando en consideración que los procesos de desintoxicación pueden generar radicales tóxicos de oxígeno, como productos de sus reacciones, independientemente del choque respiratorio, se consideró necesario el análisis por separado de los resultados obtenidos para las actividades de base y las actividades estimuladas de los hemocitos. Los resultados así obtenidos son presentados en las figuras 32 y 33 para el primero y segundo muestreo respectivamente.

a)



b)

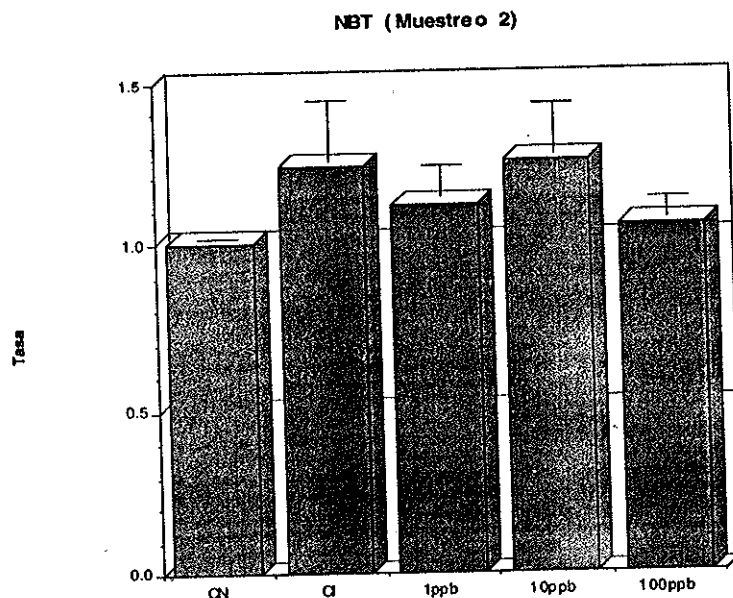


Fig.31: Resultados obtenidos con las pruebas de Cuantificación del anión superóxido en los dos muestreos realizados.

a) Primer muestreo. No se encontraron diferencias significativas de las tasas para ninguno de los cinco grupos analizados.

b) Segundo Muestreo. Los animales inyectados con solución salina (CI) mostraron un incremento en su tasa, en cambio los animales del grupo inyectado con 100 ppb de Tilt® mostraron un comportamiento diferente, pues su tasa decreció. Se pudo observar también que en los animales inyectados con 10 ppb de Tilt® las tasas se mantuvieron iguales a las del control (CI)

CN: Control sin inyección

CI: Control con inyección de solución salina

1 ppb: Inyección con 1 ppb de tilt®

10 ppb: Inyección con 10 ppb de tilt®

100 ppb: Inyección con 100 ppb de tilt®

Como se puede observar los animales muestreados 6 días después del tratamiento (Fig.32), mostraron un incremento significativo de la generación del anión superóxido O_2^- , ($p < 0,05$), asociado a la concentración del fungicida en las células no estimuladas, este incremento se observó también en las células estimuladas (Fig.32). Por el contrario los hemocitos estimulados y no estimulados, de los animales muestreados 13 días después de la inyección (ver Fig.33) mostraron una significativa pérdida de su capacidad de generar O_2^- , ($p < 0,05$), asociada a la concentración del fungicida, como se muestra en la figura 33. Como se habrá observado en los resultados de hemogramas, el número de hemocitos no mostró diferencias entre los grupos de camarones, confirmando así que las alteraciones en la producción de O_2^- estuvieron realmente asociadas a modificaciones en la actividad de los hemocitos provocadas por el tóxico y no a la concentración de ellos en la hemolinfa.

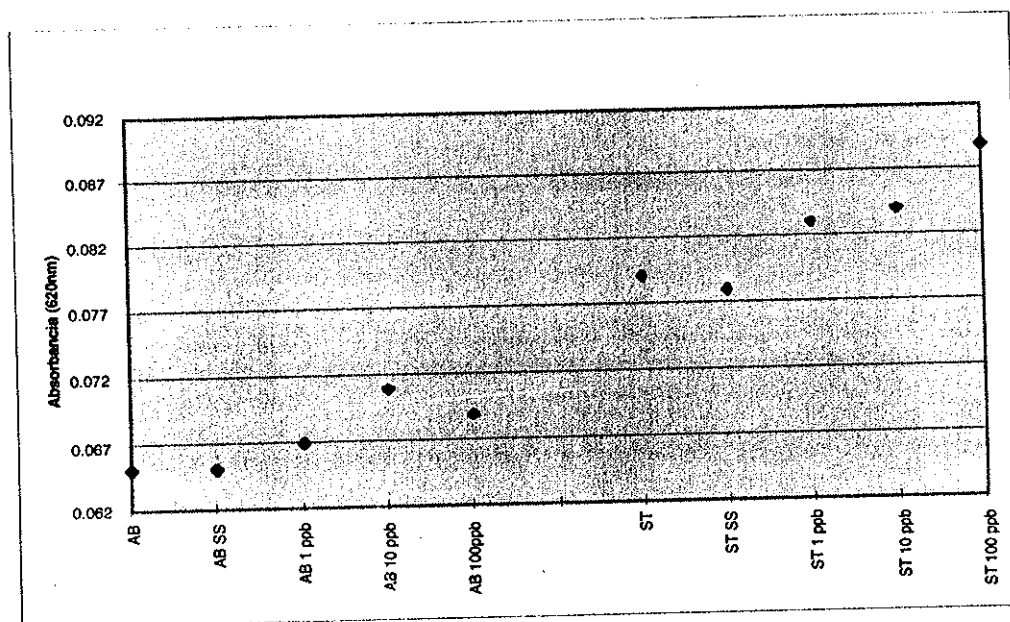


Fig.32: Resultados obtenidos con las pruebas de Cuantificación del anión superóxido en el Primer muestreo.

AB: Actividad de base

ABSS: Actividad de base, inyección de solución salina

AB1 ppb: Actividad de base, inyección con 1 ppb de tilt®

AB 10 ppb: Actividad de base, inyección con 10 ppb de tilt®

AB 100 ppb: Actividad de base, inyección con 100 ppb de tilt®

ST: Actividad estimulada

STSS: Actividad estimulada, inyección de solución salina

ST1 ppb: Actividad estimulada, inyección con 1 ppb de tilt®

ST 10 ppb: Actividad estimulada, inyección con 10 ppb de tilt®

ST 100 ppb: Actividad estimulada, inyección con 100 ppb de tilt®

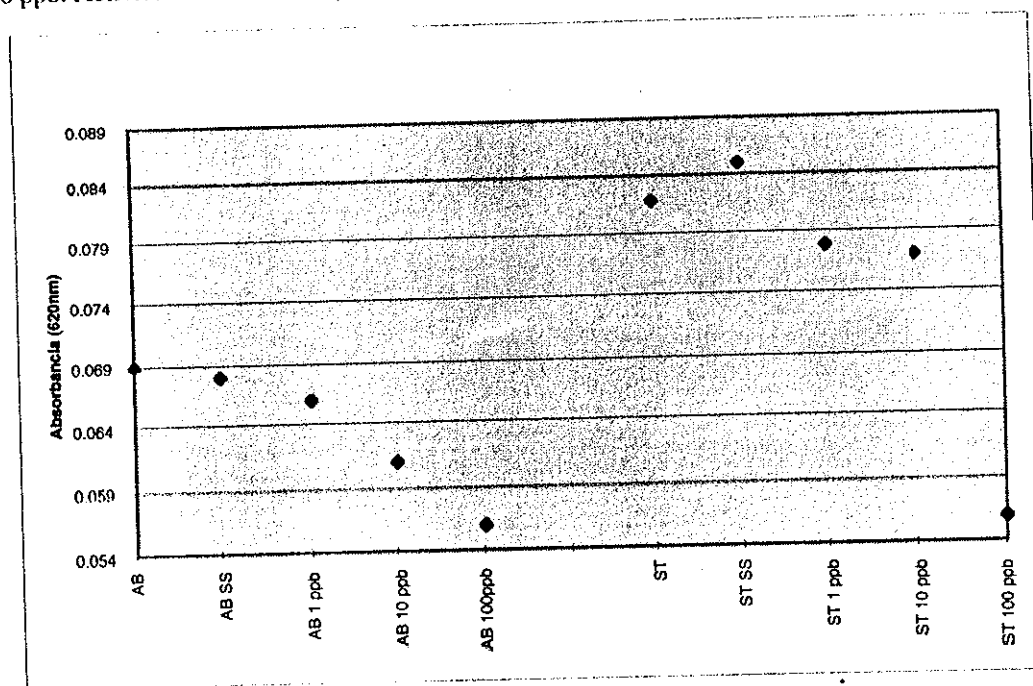


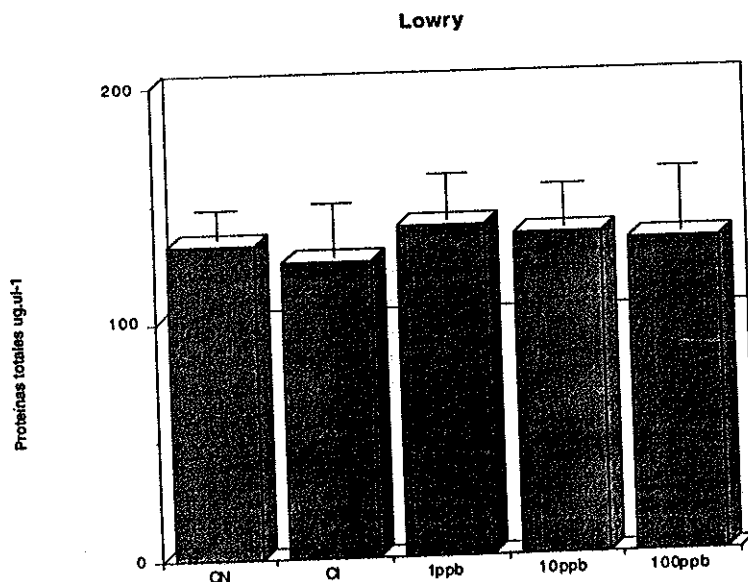
Fig.33: Resultados obtenidos con las pruebas de Cuantificación del anión superóxido en el Segundo muestreo.

Cuantificación de proteínas totales del plasma e Inmunodosificaciones con el Ac 40E10.

Los resultados obtenidos en estas pruebas son presentados en conjunto, debido a la similitud de las respuestas obtenidas (Fig. 34, 35).

Las pruebas de cuantificación de proteínas totales e inmunodosificaciones con el anticuerpo 40E10 (anti aglutinina) presentan patrones de resultados muy similares. Durante la primera semana no se detectó ningún efecto provocado por los tratamientos. En cambio durante la segunda semana se detecta una estimulación en los animales del control (inyectados con solución salina) y una disminución de la respuesta con respecto al control (CI) en los animales que recibieron 1 y 100 ppb de Tilt®. Sin embargo no se observó efecto sobre los animales sometidos al tratamiento de 10 ppb, pues en las tres pruebas mencionadas los resultados obtenidos a esta concentración del fungicida son iguales a los del control (CI).

a)



b)

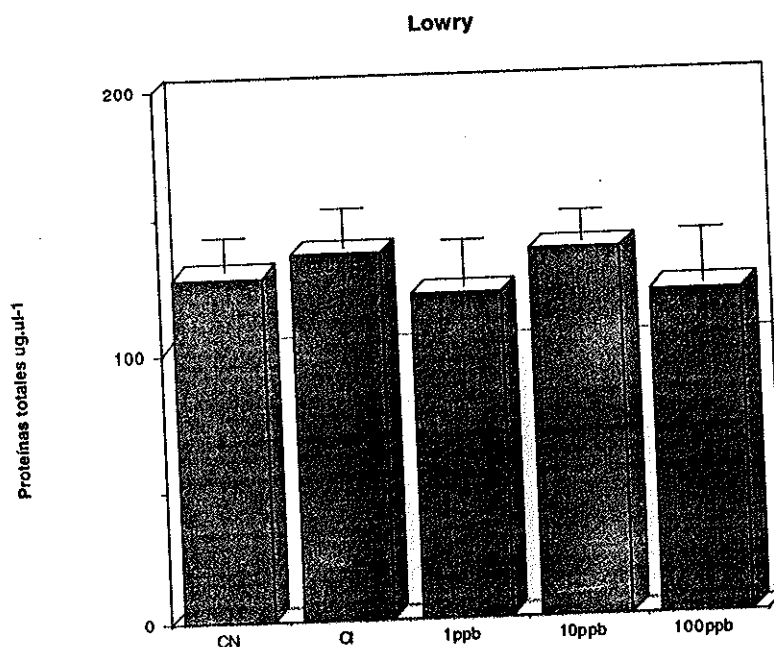


Fig.34: Cuantificación de proteínas totales (Lowry), expresadas en ug.ul⁻¹ de plasma de camarón.
a) Primer muestreo. No hubo diferencias significativas ($p>0,05$), para ninguno de los grupos analizados en este muestreo.

b) Segundo muestreo. Se observó una tendencia al aumento de la concentración de proteína en los animales del control (CI), este incremento fue alterado por la inyección de Tilt® a 1 y 100 ppb de. El grupo de animales inyectados con 10 ppb de Tilt® no se mostró diferente del control (CI).

CN: Control sin inyección

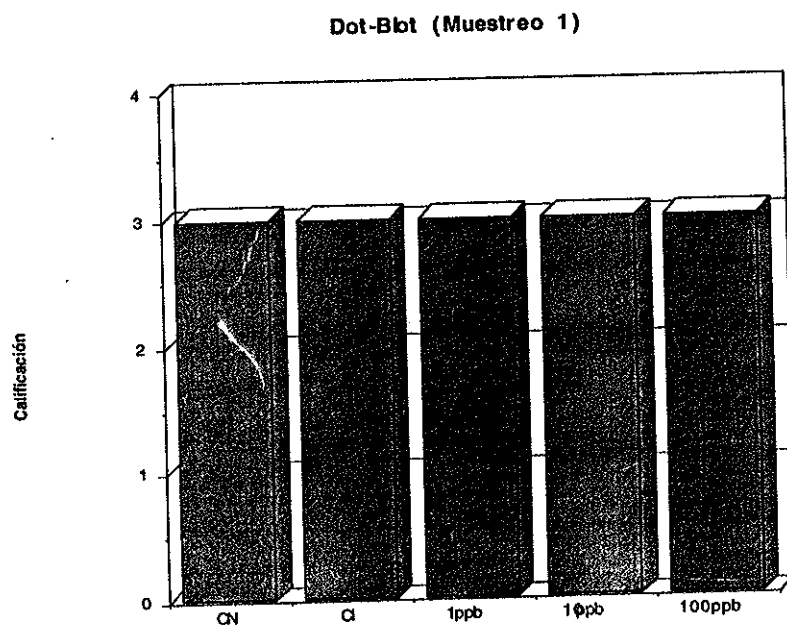
CI: Control con inyección de solución salina

1 ppb: Inyección con 1 ppb de tilt®

10 ppb: Inyección con 10 ppb de tilt®

100 ppb: Inyección con 100 ppb de tilt®

a)



b)

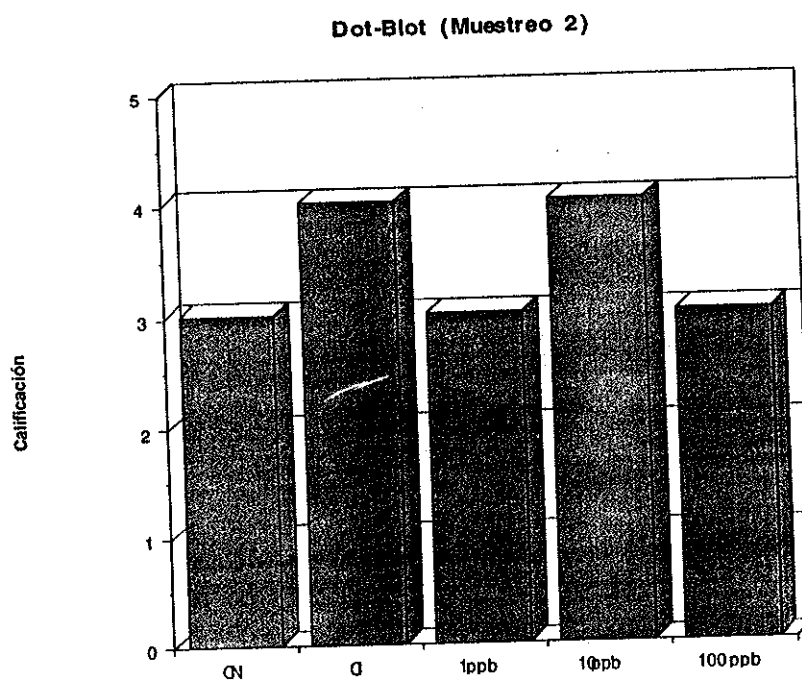


Fig.35: Inmunodosisificaciones de tipo Dot-Blot con el anticuerpo 40E10 (anti-aglutinina)

a) Resultados del primer muestreo. La cantidad de aglutinina detectada con el anticuerpo 40E10 fue igual en los cinco grupos de animales muestreados.

b) Resultados del segundo muestreo. El anticuerpo fue más reactivo en los animales inyectados con solución salina. Este aumento no se manifestó en presencia de 1 y 100 ppb de Tilt®, pero si en presencia de 10 ppb.

CN: Control sin inyección
 CI: Control con inyección de solución salina
 1 ppb: Inyección con 1 ppb de tilt®
 10 ppb: Inyección con 10 ppb de tilt®
 100 ppb: Inyección con 100 ppb de tilt®

Determinación de la actividad antibacteriana del plasma.

En la figura 36 (a y b) se detecta una tendencia a la disminución de la actividad antibacteriana desde la primera semana, en particular en los animales del tratamiento de 100 ppb de Tilt®, por otro lado la inyección de solución salina no ejerce ningún efecto estimulador como sucedió con las pruebas citadas anteriormente. Cabe destacar que no se detectó una depresión de la actividad antibacteriana en los animales del tratamiento de 10 ppb de Tilt®, al contrario al parecer habría una tendencia a la estimulación, observada en los dos muestreos realizados.

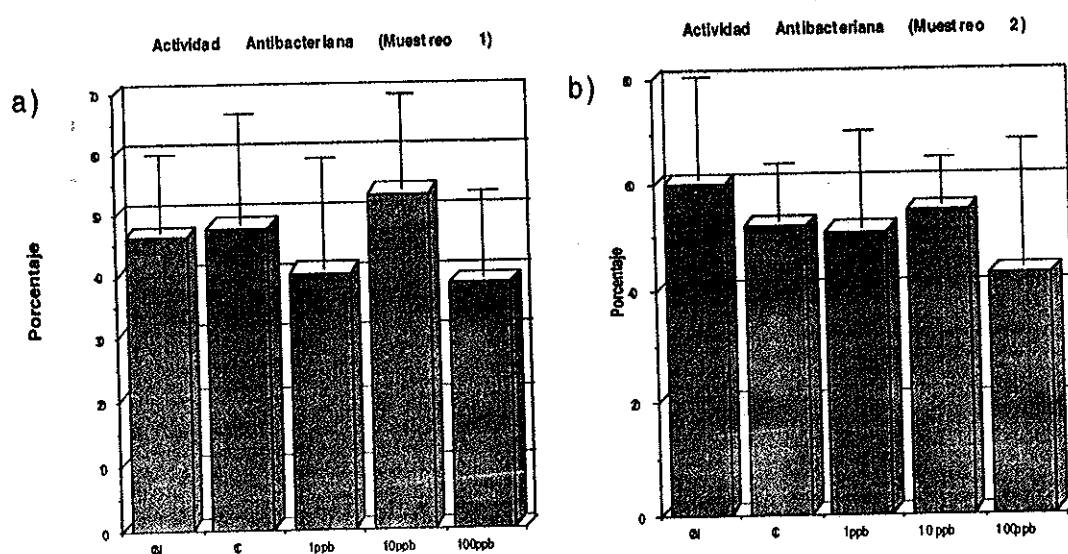


Fig.36: Determinación de la actividad antibacteriana.

a) Resultados del primer muestreo. Habría una tendencia al aumento de la actividad antibacteriana en los animales inyectados con 10 ppb de Tilt® y una tendencia a la pérdida de esta actividad en los que fueron sometidos a 1 y 100 ppb de Tilt.

b) Resultados del segundo muestreo. Se mantiene la pérdida de la actividad antibacteriana en todos los grupos, excepto en los animales del tratamiento de 10 ppb de Tilt®.

CN: Control sin inyección

CI: Control con inyección de solución salina

1 ppb: Inyección con 1 ppb de tilt®

10 ppb: Inyección con 10 ppb de tilt®

100 ppb: Inyección con 100 ppb de tilt®

Inmunodosificaciones con el anticuerpo 41B12.

En la figura 37(a y b) se muestran los resultados obtenidos con la dosificación del factor circulante, $\alpha 2$ -macroglobulina.

La prueba realizada con el anticuerpo 41B12 detecta un efecto depresor de la inyección de 1 ppb de Tilt® en el muestreo de la primera semana. Durante el segundo muestreo, se observa un incremento de la presencia de $\alpha 2$ -macroglobulina en todos los animales inyectados.

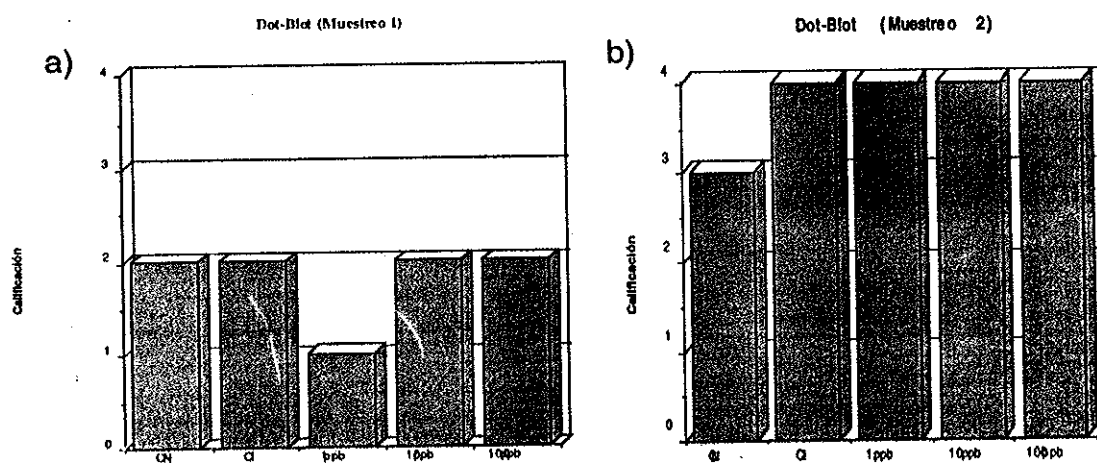


Fig.37: Inmunodosificaciones de tipo Dot-Blot con el anticuerpo 41B12 (anti $\alpha 2$ -macroglobulina)

- a) Resultados del primer muestreo.
- b) Resultados del segundo muestreo.

CN: Control sin inyección
CI: Control con inyección de solución salina
1 ppb: Inyección con 1 ppb de tilt®
10 ppb: Inyección con 10 ppb de tilt®
100 ppb: Inyección con 100 ppb de tilt®

Immunodosificaciones con el anticuerpo 42E8 (Anti PC).

Los resultados obtenidos con el anticuerpo 42E8 muestran que el solo hecho de inyectar solución salina y provocar una herida produce un efecto de disminución de la proteína circulante (Fig. 38a.). Sin embargo este fenómeno no es observado en presencia de Tilt® (10 y 100 ppb). Durante el segundo muestreo hay una disminución de la cantidad de proteína de coagulación circulante, con respecto a los controles, en los animales que recibieron la concentración de 100 ppb de Tilt®.

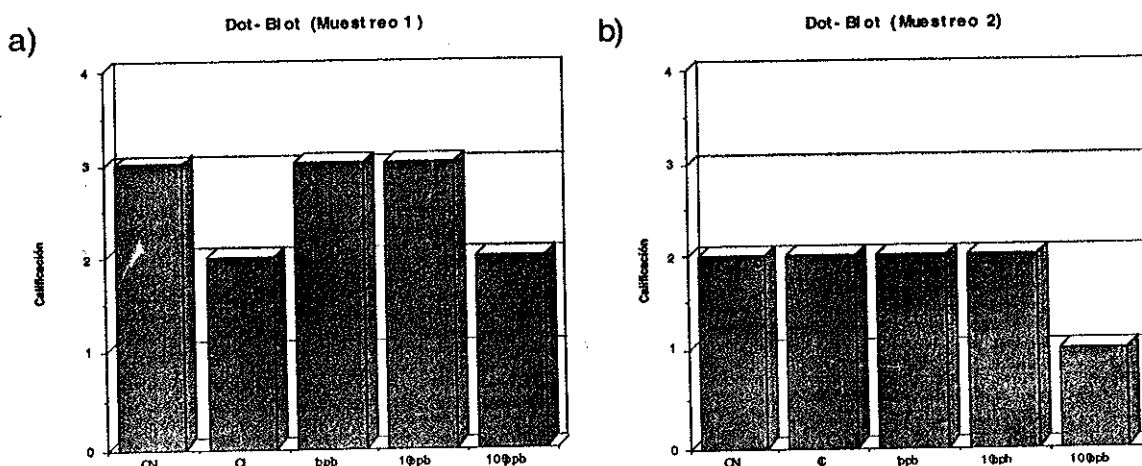


Fig.38: Immunodosificaciones de tipo Dot-Blot para el anticuerpo 42E8 (anti factor de coagulación).

a) Resultados del primer muestreo. Se observa una reducción de la proteína de coagulación en los animales del CI, esta reducción no se evidencia en presencia de 1 y 10 ppb de Tilt®.

b) Resultados del segundo muestreo. En la segunda semana se ha recuperado los niveles normales de la proteína en los animales del CI, pero no en los animales inyectados con 100 ppb de Tilt®.

CN: Control sin inyección

CI: Control con inyección de solución salina

1 ppb: Inyección con 1 ppb de tilt®

10 ppb: Inyección con 10 ppb de tilt®

100 ppb: Inyección con 100 ppb de tilt®

La compleja respuesta inmunitaria obtenida con las pruebas nos conduce a pensar que el Tilt® provoca un profundo desequilibrio fisiológico, que puede ser cuantificado incluso 13 días después de su administración. Prácticamente todos los mecanismos inmunitarios considerados son afectados aunque no al mismo tiempo ni en la misma medida.

La introducción de un control (CI) se realizó con el objetivo de identificar la respuesta "normal" de los mecanismos inmunitarios ante el solo hecho de herir a los animales con una jeringuilla y de introducir en el hemocèle una solución salina. En la mayoría de los casos se observa un incremento de la respuesta inmune (estimulación ante la herida?). Sin embargo esta respuesta "normal" es alterada por la presencia del fungicida.

Los resultados obtenidos en los *hemogramas* son una prueba de que no es suficiente considerar el número de hemocitos con un indicador. En efecto aparentemente no se detecta alteración en el número de células en ninguno de los dos muestreos, sin embargo, si se realiza el hemograma completo, determinando los tipos hemocitarios se pueden observar variaciones en la fórmula con un incremento de las células semigranulosas y una pérdida de células granulosas según la concentración del fungicida. El hemograma se restablece en la segunda semana durante la cual ya no se encuentran diferencias significativas entre los cinco grupos de animales.

En lo que concierne a la producción de O_2^- , los datos obtenidos al sexto día de muestreo, a partir de hemocitos no estimulados, sugieren que el propiconazole aumenta la liberación de radicales de oxígeno, mediante un mecanismo diferente del choque respiratorio. Este incremento de la actividad oxidativa de las células inmunitarias puede ser explicado por la naturaleza de los procesos bioquímicos de desintoxicación, en efecto es necesario recordar que durante la fase I de la biotransformación de químicos lipídicos por parte del sistema monooxigenasa P-450 (sistema enzimático celular implicado en la desintoxicación y biotransformación), pueden ser generadas especies reactivas de oxígeno, así como radicales libres derivados del xenobiótico (fide Bainy et al, 1996). Los procesos oxidativos no

justificados o excesivamente intensos, pueden ser perjudiciales para el organismo que los genera, y ha sido bien reportado por la literatura, que los radicales libres incluyendo las especies reactivas de oxígeno pueden reaccionar con diferentes biomoléculas, ácidos nucleicos, lípidos, carbohidratos y proteínas, ocasionando daños celulares, se cree que estas perturbaciones serían responsables de daños en los tejidos y desordenes fisiológicos (fide in Fundamental of aquatic toxicology, 1995).

Además de las perturbaciones mencionadas, un efecto secundario de la generación de radicales libres es el drenaje celular de los agentes reductores (NAD,NADPH,GSH), alterando de esta manera fundamentales procesos metabólicos celulares (fide in Fundamentals of aquatic toxicology, 1995), incluyendo el choque respiratorio, cabe anotar que la NADPH es fundamental para la actividad de la enzima NADPH oxidasa, enzima clave de este fundamental mecanismo inmunitario. Este hecho sería corroborado por el significativo decremento de la producción de O_2^- , por parte de los hemocitos estimulados y no estimulados provenientes de los animales, muestreados luego de 13 días de exposición al TILT®.

El perfil de los resultados obtenidos con *cuantificación de proteínas totales, el anticuerpo monoclonal 40E10 (anti aglutinina) y actividad antibacteriana* son muy similares entre sí, existiendo un patrón que se puede resumir en una estimulación de las respuestas en los animales del control (inyección con solución salina) y en una disminución en los tratamientos de 1 y 100 ppb de Tilt®. En las tres pruebas los animales del tratamiento de 10 ppb de Tilt® no se diferenciaron significativamente del control (CI). Para la cuantificación de aglutinina y proteínas totales este patrón de respuesta se detectó durante el segundo muestreo. En tanto que para actividad antibacteriana este efecto fue detectado desde la primera semana, observándose además para este efector, una estimulación menos evidente del control CI, pero manteniéndose la estimulación sobre los animales del tratamiento de 10 ppb de Tilt®.

Con los datos disponibles es difícil interpretar las razones que motivan los resultados contradictorios obtenidos a 10 ppb del tóxico, sin embargo es evidente que las tres pruebas arriba mencionadas están relacionadas con la concentración de proteínas plasmáticas, es decir que los efectos del Tilt® siguen un patrón en cuanto a efectos sobre la síntesis proteica se refiere. Quizas ayude a la interpretación de los resultados recordar que el Tilt® es comercializado disuelto en un solvente, sólo el 25.1 % constituye el principio activo, y es posible que esta mezcla de efectos estimuladores/depresivos se encuentren explicados por modos de acción diferentes de estas dos sustancias. Se recordará que se perdió animales del tratamiento de 10 ppb, pero este hecho no se constituye en el único argumento que explique los resultados obtenidos con los animales de este grupo en tres pruebas.

En lo que concierne al factor de coagulación (PC), durante el primer muestreo hay una pérdida de la cantidad de proteína circulante en los animales del control, respuesta lógica ya que esta proteína debe ser normalmente reclutada a nivel de la herida para bloquear la hemorragia producida (en este caso por la inyección), sin embargo en presencia de Tilt® esta disminución es menos evidente, se podría asumir que posiblemente el Tilt® esté perturbando de alguna manera el proceso de la coagulación. Durante el segundo muestreo se evidencia una recuperación de PC en los animales del control CI, en tanto que se observa un efecto depresivo sobre la presencia de PC a 100 ppb de Tilt®, cabría suponer que el fungicida tuvo efectos nocivos sobre la síntesis de esta proteína, esto último concuerda con los resultados obtenidos con la cuantificación de proteínas por el método de Lowry y las inmunodosificaciones con el anticuerpo monoclonal 40E10.

Es posible que en las perturbaciones de síntesis proteica, también este implicado el drenaje de agentes reductores provocado por la elevada actividad oxidativa observada en los nimaes muestreados a los 6 días, ya que si bien la caída celular del NADPH puede afectar al choque respiratorio, la pérdida del agente reductor GSH puede implicar perturbaciones en la síntesis de proteínas (fide in Fundamental of aquatic toxicology, 1995).

Por otra parte para finalizar es necesario recordar que por su modo de acción como fungicida el propiconazole está catalogado entre los EBIFs ("Ergosterol Biosynthesis Inhibiting Fungicides") en los hongos, estos compuestos actúan sobre el esteroide 14- α -dimetilasa, un sistema enzimático dependiente del citocromo P450 (Vanden Bosshe et al, 1995). En los vertebrados los EBIFs tienen un complejo perfil de inducción, supresión o inhibición de las isozimas del Citocromo P450 (Ronis et al 1994), que como se recordará también están implicadas en los procesos de biotransformación y desintoxicación. En los crustáceos no hay suficientes datos con respecto a esto, pero tomando en cuenta la situación geográfica de un importante número de piscinas camaroneras, sería muy interesante estudiar en el camarón, los efectos que podrían tener los EBIFs, como el propiconazole, sobre los mecanismos de desintoxicación o de biotransformación de otros contaminantes ambientales (otros pesticidas o incluso antibióticos utilizados en acuicultura) presentes en el medio ambiente de las piscinas camaroneras.

El objetivo principal (que se cumplió con este bioensayo de toxicidad) fue determinar si las pruebas de inmunoevaluación son capaces de informar sobre un desequilibrio fisiológico producido por un estrés generado por una sustancia tóxica. Las bases biológicas que ayuden a esclarecer las perturbaciones ocasionadas por el Tilt® requieren de estudios posteriores más fundamentales.

CONCLUSIONES

En el presente trabajo se realizó la validación clínica, de seis ensayos de inmunoevaluación disponibles en el CENAIM, con el objetivo de identificar inmunomarcadores del estado fisiológico de los animales, que nos permitan realizar controles de salud y emprender programas de selección genética empleando estas herramientas. Para esto se realizaron bioensayos en los que se evaluó el efecto de la calidad de la dieta sobre la condición inmunitaria de los animales. Adicionalmente a estas pruebas, se llevó a cabo un bioensayo de toxicidad *in vivo* a fin de evaluar el efecto sobre el sistema inmune de un xenobiótico implicada en la problemática acuícola.

Al término de este trabajo la primera conclusión que resalta, es que las pruebas de inmunoevaluación tienen la suficiente sensibilidad como para detectar diferencias entre lotes de animales provenientes de una misma población, que han sido sometidos a diferentes tratamientos. Esta capacidad para detectar diferencias se dió a pesar de la importante dispersión de los datos encontrados, para cada una de las pruebas en los animales de los controles (T0, CN), en los dos tipos de bioensayos realizados.

Como conclusiones luego de los ensayos de estrés nutricional del presente trabajo se pueden citar:

-En los dos bioensayos las más altas mortalidades se registraron en los tanques que recibieron el tratamiento A3. El antibiótico aplicado antes de iniciar el segundo bioensayo no alteró los resultados de supervivencia y permitió descartar una infección bacteriana previa de los animales utilizados, esto dos hechos confirmarían que el alimento A3 estuvo asociado a algún tipo de estrés causante de las mortalidades observadas.

-La cuantificación de proteínas totales y el hemograma, permitieron observar variaciones en las condiciones de los animales al comparar animales sometidos a diferentes dietas, estas

pruebas mostraron además que la concentración de proteínas y el número de hemocitos son muy buenos marcadores de cambios en las condiciones los animales.

-El hemograma realizado con microscopía de contraste de fases demostró ser una herramienta útil para la determinación de las variaciones en los porcentajes de cada tipo hemocitario, y a la vez probó que la fórmula hemocitaria podría ser un buen indicador de los cambios en la "calidad" del animal al reflejar alteraciones en la proporción de células semigranulosa e hialinas en los animales sometidos a diferentes tratamientos.

-La cuantificación del anión superóxido por medio de la reducción del NBT no permitió realizar conclusiones definitivas, ya que el análisis de los resultados por medio de tasas, sin considerar el número de hemocitos utilizados, no permitió detectar diferencias entre los tratamientos evaluados, debido al parecer a un aumento de la actividad oxidativa de los hemocitos provenientes de los camarones sometidos a los tres tratamientos, en particular de los animales alimentados con la dieta A3.

-Las inmunodot-blot de tipo ELISA permiten afirmar que las tres proteínas analizadas podrían constituir marcadores de condiciones de estrés, aunque se observó mayor sensibilidad con la aglutinina y el factor de coagulación que con la $\alpha 2$ -macroglobulina.

-La determinación de la actividad antibacteriana del plasma del camarón no mostró ser repetitiva, pues los resultados no fueron similares para los dos bioensayos, en el primer bioensayo no hubo diferencias entre ningún grupo de animales considerado. Sin embargo en el segundo bioensayo, esta prueba mostró una elevada respuesta en los animales alimentados con las dietas 2 y 3, los resultados obtenidos podrían deberse a un proceso de selección de los animales, en el caso de los camarones alimentados con la dieta A3, o a un efecto estimulador de las condiciones de cultivo, en el caso de los camarones alimentados con la dieta A2.

-Hubo una correlación entre el índice inmunitario de los animales y la calidad de la dieta. En los dos bioensayos se registraron índices inmunitarios más bajos en los animales alimentados con la dieta A1 (22 %) que en los que recibieron la dieta A2 (50 %).

-Hubo una correlación entre un bajo índice inmunitario de los animales y la situación de estrés generada por el alimento 3. En los dos bioensayos los índices inmunitarios más bajos (inmunodepresión) se registraron en los animales alimentados con la dieta natural y en ambos casos se observó en estos animales las mortalidades más altas.

Las conclusiones que se pueden citar luego del bioensayo con el fungicida Tilt® son:

-Prácticamente todos los parámetros inmunitarios considerados pueden tener valor de inmunomarcadores, tal vez la única excepción constituya la concentración de $\alpha 2$ macroglobulina.

-El estudio del hemograma confirma la observación ya realizada en los bioensayos de estrés nutricional, es decir, que analizar el número de hemocitos no es suficiente y que se debe considerar las alteraciones que puede sufrir la fórmula hemocitaria, en este caso se produjeron variaciones en las proporciones de células granulosas y semigranulosas.

-Los resultados obtenidos con la técnica de reducción del NBT, indican que el anión superóxido puede ser un buen marcador no solo de situaciones de estrés fisiológico, sino también que esta técnica sería una buena herramienta para estudiar procesos toxicológicos.

-Los datos obtenidos con la cuantificación de proteínas totales por el método de Lowry e inmunodosificaciones con los anticuerpos monoclonales 40E10 (anti aglutinina) y 42E8 (anti proteína de coagulación) indicarían que el tóxico afectaría la síntesis de proteínas. Adicionalmente hay indicios de perturbaciones en el proceso de coagulación.

-Los resultados de actividad antibacteriana siguen el mismo patrón de los obtenidos con el método de Lowry y con las inmunodosis con los anticuerpos monoclonales 40E10 y 42E8 indicando una correlación entre estas variables.

La interpretación de los resultados obtenidos fue mucho más difícil y delicada que en los ensayos de estrés nutricional debido a que en este caso el estrés ocasionado no se tradujo forzosamente por una inmunodepresión como sucedió en los bioensayos anteriores. Posiblemente disfunción es el término más apropiado para describir el efecto del fungicida Tilt® sobre el sistema inmunitario del camarón.

RECOMENDACIONES

1. Con la finalidad de utilizar la producción de anión superóxido como un inmunomarcador, sería conveniente que el protocolo del ensayo de reducción del NBT se realice en función del número de hemocitos o considerando volúmenes de hemolinfa iguales para todas las muestras.
2. Las pruebas de dot-blot empleadas en las inmunodosificaciones, resultaron excelentes en la identificación de inmunomarcadores pero sería conveniente optimizar este ensayo utilizando un sustrato soluble, pues esto permitiría reemplazar el uso de la escala de intensidades colorimétricas (escala ordinal) por una escala de números continuos. Estas medidas facilitarían los análisis estadísticos de los resultados.
3. Estudiar la posibilidad de incluir nuevas pruebas inmunológicas, tales como actividad de la proPO, o nuevas inmunodosificaciones con anticuerpos, como el anti PV3 (péptido antibacteriano aislado en *P.vannamei*) para ver si pueden ser útiles en la identificación de otros inmunomarcadores.
4. El origen de la dieta natural (ostras, mejillones, calamar) y el manejo de la misma debe ser tratado con mucho cuidado, ya que si bien es cierto que la calidad nutricional de esta dieta es incuestionable, también es cierto el hecho de que podrían producirse problemas de contaminación, generando situaciones de estrés contrarias a las esperadas por el experimentador o lo que es aún más grave por el productor.
5. Se requiere de estudios más fundamentales para dilucidar con exactitud los efectos del Tilt® sobre el estado fisiológico del camarón. Luego del bioensayo de toxicidad realizado queda por explicar los efectos estimulantes producidos por el tóxico a 10ppb sobre la concentración de proteínas plasmáticas y la actividad antibacteriana en contradicción con los efectos depresivos a 1 y 100 ppb.

6. Sería interesante estudiar el efecto sobre el sistema inmune de otros xenobióticos, susceptibles de estar presentes en las zonas de cultivo de camarón. Debido a que el camarón es un artrópodo quizás un candidato podría ser el Malatión, insecticida empleado en la agroindustria.
7. Complementariamente a la evaluación de las inmunopruebas en animales sometidos a estrés nutricional y toxicológico se podría realizar la evaluación de las inmunopruebas frente a una situación de estrés de tipo patológico (infecciones experimentales). Esta evaluación adicional permitiría detectar los inmunomarcadores capaces de conferir una resistencia.
8. Establecer índices de normalidad de la respuesta inmune, analizando animales provenientes de diferentes sitios tales como el mar, camaroneras y laboratorios en los que sean cultivados en buenas condiciones sin problemas patológicos ni de crecimiento o mortalidades altas, con el objetivo de contar con datos de referencia que enriquezcan el análisis de los resultados obtenidos, cuando se generan arbitrariamente situaciones de estrés bajo las condiciones controladas de laboratorio.
9. Enriquecer la base de datos estudiando con las inmunopruebas, camarones provenientes de diferentes tipos de piscinas, manejadas con diferentes tecnologías, o animales de piscinas que estén sufriendo de algún problema de índole patológico.
10. Los mejores inmunomarcadores podrían ser seleccionados, para ser empleados conjuntamente con marcadores genéticos, a fin de emprender programas de selección genética con miras a cerrar el ciclo de producción del camarón, con animales más resistentes en términos inmunitarios.

BIBLIOGRAFIA

- Adams, 1991. Response of penaeid shrimp to exposure to *Vibrio* species. Fish and Shellfish Immunol. 1, 59-70.
- Aanes, Baekken, 1994. Acute and long-term effects of propiconazole on freshwater invertebrate communities and periphyton in experimental streams. Norwegian Journal of Agricultural Sciences, Supplement No. 13: 179-193.
- Ahmad, 1995. Oxidative Stress from Environmental Pollutants. Archives of Insect Biochemistry and Physiology 29: 135-157.
- Anderson, 1994. Hemocyte-Derived reactive oxygen intermediate production in four bivalve mollusks. Developmental and Comparative Immunology, Vol. 18, No. 2, pp. 89-96.
- Bachère, Mialhe, Noël, Boulo, Morvan, Rodríguez, 1995a. Knowledge and Research prospects in marine molluscs and crustacean immunology. Aquaculture, 132, pp. 17-32.
- Bachère, Mialhe, Rodríguez, 1995b. Identification of defence effectors in the haemolymph of Crustaceans with particular reference to the shrimp *P. japonicus* (Bate): prospects and applications. Fish & Shellfish Immunology 5, 597-612.
- Baekken, Aanes, 1991. Pesticides in Norwegian agriculture. Their effects on benthic fauna in lotic environments. Preliminary results. Verh. Internat. verein. Limnol. 24: 2277-2281.
- Bainy, Saito, Carvalho, Junqueira, 1996. Oxidative stress in gill, erythrocytes, liver and kidney of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) from a polluted site. Aquatic Toxicology 34, pp. 151-162.
- Bayne, C 1990. Phagocytosis and Non-self Recognition in Invertebrates. Am. Inst. of Biol. Scien., pp. 723-724.

- Bell, Smith, 1993. In vitro superoxide production by hialine cells of the shore crab *Carcinus maenas*. Developmental and Comparative Immunology, Vol. 17, pp. 211-219.
- Chadwick and Dunphy, 1986. Antibacterial and Antiviral Factors in Arthropod Hemolymph, Chapter 10. Immunologie Arthropods.
- Cheng, 1989. Immunodeficiency Diseases in Marine Mollusks: Measurement of Some Variables. Journal of Aquatic Animal Health 1: 209-216.
- Chisholm and Smith, 1992. Antibacterial Activity in The Haemocytes of Shore Crab, *Carcinus Maenas* . J. mar. biol. Ass.U. K., 72, 529-542. .
- Chisholm and Smith, 1994. Variation of Antibacterial activity in the Haemocytes of The Shore Crab, g, with temperature. J.mar. biol. Ass. U. K., 74, 979-982.
- Chisholm and Smith, 1995. Comparison of antibacterial activity in the hemocytes of different crustacean species. Comp. Biochem. Physiol. Vol 110, n°1, pp. 39-45.
- Cociancich S, et. al., 1994. The inducible Antibacterial Peptides of Insects. Parasitology Today, vol.10, no. 4.
- Christensen, Nappi, 1988. Immune Responses of Arthropods. Animal and Plant Sciences.
- Depledge, Bjerregaard, 1989. Haemolymph protein and copper levels in decapod crustaceans. Helgoländer Meeresunters. 43, 207-223.
- Di Giulio R.T., W.H. Benson, B.M. Sanders and P.A. Van Veld., 1995. In.Fundamentals of Aquatic Toxicology,. edited by Gary M. Rand., Second Edition. Taylor y Francis. Chapter 17: 523-561.
- Durliat, Vranckx, 1976. Coagulation in the crayfish, *Astacus Leptodactylus* attempts to identify a fibrinogen-like factor in the hemolymph. Biol. Bull., 151: 467-477.

- Duvic, Söderhall, 1990. Purification and Characterization of a β -1,3-glucan binding protein from plasma of the Crayfish *Pacifastacus leniusculus*. The Journal of Biological Chemistry. Vol. 265, No. 16, pp. 9327-9332.
- Evans, Cushing, Sawyers, 1969. Weinheimer, Action and McNeely, Induced Bactericidal response in the California Spiny lobster, *Panulirus interruptus*. Proc. Soc. esp. Biol. Med. 128, 394-398.
- Hessen, Källqvist, Abdel-Hamid, Berge, 1994. Effect of pesticides on different zooplankton taxa in mesocosm experiments. Norwegian Journal of Agricultural Sciences, Supplement No. 13: 153-161.
- Hernández-López, Gollas-Galván, Vargas-Albores, 1996. Activation of the Prophenoloxidase System of the Brown Shrimp (*Penaeus californiensis* Holmes). Comp. Biochem. Physiol. Vol. 113C, No. 1, pp.61-66.
- Immunostimulatory Substances, 1996. Reviews un fisheries sciences Vol. 4, Issue #3.
- Johansson, Söderhall, 1989. Cellular Immunity in Crustaceans and the proPO System. Parasitology Today, Vol. 5, No. 6.
- Klein, 1982. Immunology the Scienci of Self-Nonsell Discrimination.
- Komano, Mizuno, Natori, 1980. Purification of lectin induced in the hemolymph of *Sarcophaga peregrina* larvae on injury. The Journal of Biological Chemistry, Vol. 255, No. 7, pp. 2919-2924.
- Kopacek, Hall, Söderhall, 1993. Characterization of a clotting protein, isolated from plasma of the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*. Eur. Biochem. 213, 591-597.
- Lowry, Rosebrough, Farr, Randall, 1951. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.

- Martin & Graves, 1985. Fine Structure and Classification of Shrimp Hemocytes. *Journal of Morphology* 185:339-348.
- Martin, Hose, Omori, Chong, Hoodbhoy, McKrell, 1991. Localization and roles of coagulogen and transglutaminase in hemolymph coagulation in decapod crustaceans. *Comp. Biochem. Physiol.* Vol. 100B, No. 3, pp. 517-522.
- Müller, Rollag and Froland, 1989. Nitroblue tetrazolium reduction in monocytes and monocyte-derived macrophages. *APMIS* 97:490-496.
- Muñoz, 1996. Desarrollo y optimización de ensayos para la evaluación del estado inmunitario del camarón *P. vannamei*. Tesis de Acuicultura. Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar. Escuela Superior Politécnica del Litoral.
- Muta, Iwanaga, 1996. Clotting and Immune defense in Limulidae. *Progress in molecular and subcellular Biology*, Vol. 15, pp. 154-189.
- Noga, Engel, Arroll, McKenna, Davidian, 1994. Low serum antibacterial activity coincides with increased prevalence of shell disease in blue crabs, *Callinectes sapidus*. *Diseases Aquatic Organisms*, Vol. 19: 121-128.
- Noga, Arroll, Zhiquin Fan, 1996. Specificity and some physicochemical characteristics of the antibacterial activity from blue crab *Callinectes sapidus*. *Fish & Shellfish Immunology* 6, 403-412.
- Pipe, 1992. Generation of Reactive Oxygen Metabolites By The Haemocytes of the Mussel *Mytilus edulis*. *Developmental and Comparative Immunology*, Vol. 16, pp. 111-122.
- Pipe, Coles, 1995. Environmental contaminants influencing immune function in marine bivalve molluscs. *Fish & Shellfish Immunology* 5, 581-595.

- Raa Jan, 1996. The use of immunostimulatory Substances in Fish and Shellfish Farming. *Reviews in Fisheries Science*, 4(3): 229-288.
- Ratanapo, Chulavatnatol, 1990. Monodin, a new Sialic Acid-Specific Lectin from Black Tiger Prawn (*P. monodon*).
- Robalino, 1997. Caracterización del camarón *P. vannamei* en base a criterios genéticos e inmunitarios. Tesis de Acuicultura. Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar. Escuela Superior Politécnica del Litoral.
- Rodríguez, Boulo, Mialhe, Bachère, 1995. Characterization of shrimp haemocytes and plasma components by monoclonal antibodies. *Journal of Cell Science* 108, 1043-1050.
- Ronis M.J., Ingelman-Sundberg and Bagder TM., 1994. Induction, suppression and inhibition of multiple hepatic cytochrome P450 isozymes in the male rat and bobwhite quail (*Colinus virginianus*) by ergosterol biosynthesis inhibiting fungicides (EBIFs). *Biochem Pharmacol.*, 48 (10): 1953-1965.
- Sequeira, Vilanova, Lobo-Da-cunha, Baldaia, Arala-Chaves, 1995. Flow cytometric analysis of molt-related changed in hemocyte type in male and female *Penaeus japonicus*. *Biol. Bull.* 189: 376-380.
- Smith and Söderhall, 1986. Cellular Immune Mechanisms in the Crustacea. *Symposia of the Zoological Society of London*, n°56, pp. 59-79.
- Söderhall and Cerenius, 1992. Crustacean Immunity. *Annual Rev. of fish Diseases*, pp. 3-23.
- Song and Hsieht, 1994. Immunoestimulation of Tiger Shrimp (*Penaeus monodon*) Hemocytes for generation of microbicidal substances: Analysis of reactive oxygen species. *Dev.Comp.Immunol*:Vol.18, N°3, pp. 201-209.

- Sung, Yang, Song, 1996. Enhancement of microbicidal Activity in The Tiger Shrimp *Penaeus monodon* Via Immunostimulation. Journal of Crustacean Biology, 16(2): 278, 284.
- Tapia, 1997. Optimización de ensayos antibacterianos y estudios sobre la inducción de la actividad antibacteriana en la hemolinfa del camarón *P. vannamei*. Tesis de Acuicultura. Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar. Escuela Superior Politécnica del Litoral.
- Technical Comittee of the Camara Nacional de Acuicultura, 1994. Documentation of Investigative Process Relative to the Taura Syndrome.
- Tsing A., 1989. Hemocytes of Penaeid and Palaemonid Shrimps: Morphology, Cytochemistry, and Hemograms. Journal of Invertebrate Pathology 53, 64-77.
- Valenzuela, 1996. Métodos de selección de anticuerpos monoclonales contra compuestos presentes en el cerebro y ganglio torácico de hembras maduras *Penaeus vannamei*. Tesis de Acuicultura. Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar. Escuela Superior Politécnica del Litoral.
- Vanden Bossche Hugo., Luc Koymans and Henri Moereels., 1995. P450 inhibitors of use in medical treatment: Focus on mechanisms of action. *Pharmac Ther.*, 67(1): 79-100.
- Vargas F., 1995. Sistema de defensa del camarón café (*P. californiensis*). Ciencia 46, pp.33-45.
- Vargas, Jiménez, Yepiz, 1996 a. Purification and comparison of β -1, 3-glucan binding protein from white shrimp (*P. vannamei*). Comp. Biochemical Physiologist.
- Vargas- Albores, Jimenez-Vega, Söderhall, 1996 b. A Plasma isolated from Shrimp (*P. californiensis*) which enhances the activation of prophenoloxidase system by β -1,3-glucan. Developmental and Comparative Immunology, vol. 20, No. 5, pp. 299-306.

-Vargas-Albores, Guzmán, Ochoa, 1993. A lipopolysaccharide-binding Agglutinin isolated from brown shrimp (*P. californiensis* Holmes) Haemolymph. Comp. Biochem. Physiol. Vol. 104B, No. 2, pp. 407-413.

-Vasta, 1990. Invertebrate lectins, C-reactive proteins and serum amyloid. Structural relationships and evolution. Defense Molecules, pp. 183-199.

ANEXO I

Solución de anticoagulante para la obtención de hemolinfa.

-Solución de Citrato de sodio 10%

Citrato de sodio	100g.
Agua destilada	1000ml
pH	7,2-7,3 (ajustado con ácido cítrico)

Medio de cultivo para la preparación de primocultivos.

-Solución salina modificada de Hank's

Sales de Hank's	100ml
Agua destilada	900ml
Hepes	2,6 g...
Cloruro de sodio	190mM
pH	7,2

-Solución salina modificada de sales de Hank's 1 X (MHBSS 1X)

Sales de Hank's	100ml
Agua destilada	900ml
Hepes	2,6 g.
Cloruro de sodio	190mM

Cloruro de Calcio	6mM
Cloruro de Magnesio	13mM
pH	7,2

-Solución salina modificada de sales de Hank's 2 X (MHBSS 2X)

Sales de Hank's	100ml
Agua destilada	900ml
Hepes	2,6 g.
Cloruro de sodio	190mM
Cloruro de Calcio	12mM
Cloruro de Magnesio	26mM
pH	7,2

-Solución salina modificada de sales de Hank's 3 X (MHBSS 3X)

Sales de Hank's	100ml
Agua destilada	900ml
Hepes	2,6 g.
Cloruro de sodio	190mM
Cloruro de Calcio	18mM
Cloruro de Magnesio	39mM
pH	7,2

Medios de cultivo Luria bertani 1%.

-Agar Luria Bertani 1%(NaCl)

LB agar (comercial)	32g.
---------------------	------

Agua destilada	1000ml
----------------	--------

Cloruro de sodio	10 g.
------------------	-------

-Caldo Luria Bertani 1%(NaCl)

LB caldo(comercial)	20g.
---------------------	------

Agua destilada	1000ml.
----------------	---------

Cloruro de sodio	10 g.
------------------	-------

Solución stock de tilt® para pruebas *in vivo* (100.000ppb)

Solución Salina	100ml
-----------------	-------

Tilt®	1 ml
-------	------