CENAIM INFORMA

Por Jenny Rodríguez, Ph. D.
Investigador Inmunología

Boletín Informativo No 99 29 de Febrero del 2004

Inmunoestimulación temprana de camarones *Litopenaeus vannamei* para inducir un mejor desarrollo del sistema inmune y resistencia al WSSV.

Antecedentes

El objetivo del proyecto ha sido inducir un mejor desarrollo de los tejidos inmunitarios del camarón mediante inmunoestimulación desde la larvicultura. El trabajo constó de 3 fases. La larvicultura, bajo diferentes regímenes de inmunoestimulación (Tabla 1) constituyó la primera fase (boletín informativo # 75). Las larvas obtenidas fueron utilizadas en las fases 2 y 3 del proyecto. En la tercera fase se evaluó la supervivencia y el crecimiento en piscinas (boletín informativo # 87). Ahora presentamos los resultados de la segunda fase, en la cual se evaluó la supervivencia y parámetros inmunitarios de juveniles desafiados con WSSV en condiciones de laboratorio.

Materiales y Métodos

Ensayo de desafío con WSSV para evaluar supervivencia

Se utilizaron camarones de 0,1 ± 0,03. El diseño fue completamente aleatorio, 16 réplicas por tratamiento y 10 animales por réplica. Quince días antes del desafío los animales de todos los tratamientos a excepción de los animales del T1 y T5 recibieron una dosis de ?-glucanos. En esta etapa se incluyeron dos tratamientos adicionales el T4 (un lote de larvas del T1 que recibió ?-glucanos 15 días antes del desafío), y el T8 (un lote de larvas del T5 que recibió ?-glucanos 15 días antes del desafío) (Tabla 1). El desafío fue por ingestión de papilla infectada. El diseño contempló el factor probióticos con dos niveles y el factor ?-glucanos con cuatro niveles. Se utilizó la herramienta de análisis de varianza (ANOVA) de medidas repetidas a un nivel de confianza del 95 %. Cuando el ANOVA detectó diferencias significativas se procedió a realizar análisis de medias post-hoc, utilizando el criterio de diferencias significativas mínimas (LSD) en una prueba de Scheffé con un nivel ? = 0,05.

Ensayo de desafío y evaluación de la respuesta inmune

Se utilizaron animales de 2,64 ± 0,93. Los animales se distribuyeron de forma completamente aleatoria, con tres réplicas por tratamiento y 30 animales por réplica. Quince días antes del desafío los animales de todos los tratamiento a excepción de los del T1 y T5 recibieron una dosis de ?-glucanos. Se incluyeron nuevamente dos tratamientos adicionales el T4 y el T8 (Tabla 1). El desafío se realizó mediante ingestión. Se tomaron 10 muestras de camarones por réplica, en tres muestreos independientes:

Ti (0 h inicio del experimento) -Respuesta inmune de base
T24 (24 h post infección) -Respuesta inmune a la infección
Tf (360 h ó 15 días post infección) -Respuesta de los sobrevivientes

En las muestras se analizó hemograma, cuantificación de la producción de superóxido (O_2^-), detección de actividad fenoloxidasa (PO), cuantificación de la concentración de proteínas plasmáticas y de la actividad antibacteriana del plasma. Se calculó además el índice inmunitario. Los animales muestreados fueron fijados para histología. Para el análisis estadístico se utilizó ANOVA.

Resultados

Supervivencia y respuesta inmune bajo condiciones de desafío con WSSV

En el primer desafío las larvas cultivadas con probióticos tuvieron mayor supervivencia durante las primeras 52 h. Hasta las 156 h las supervivencias fueron mayores en los tratamientos que incluyeron ?-1,3 glucanos.

Los análisis inmunitarios, mostraron que los animales cultivados con probióticos tuvieron mayor índice inmunitario (Tabla 2), respondiendo al WSSV con proliferación de hemocitos (Tabla 3) y presentando bajos porcentajes de hemocitos atípicos (datos no mostrados). Luego del desafío con WSSV perdieron proteínas plasmáticas (p=0,03) y ganarón actividad antibacteriana (p<0,01). El efecto de los ?-1,3 glucanos estuvo en dependencia del momento de aplicación, obteniéndose los resultados más interesantes con los tratamientos T2 y T4. Los animales del T2 reaccionaron a la infección incrementando hemocitos y actividad antibacteriana. En la combinación T4 se incrementaron las proteínas plasmáticas (contrariamente a los otros tratamientos con probiótico) y la generación de superóxido. El T4 presentó además el más alto número de hemocitos iniciales y finales, mostrando además el índice inmunitario más alto en los sobrevivientes.

Conclusiones y perspectivas

El efecto de los probiótcos se manifestó en una mayor supervivencia las primeras 52 horas de postdesafío. Por otra parte al contrario de lo ocurrido en los animales cultivados sin probióticos y de lo señalado por la literatura en casos similares, los animales cultivados con probióticos no perdieron hemocitos circulantes luego del desafío, observándose un incremento de estos. Ellos presentaron también bajos porcentajes de hemocitos atípicos, los cuales han sido relacionados a infecciones con WSSV.

En la combinación T2 se aplicó de manera simultanea probióticos y ?-1,3 glucanos desde Zoea II. Estos animales reaccionaron a la infección con proliferación de hemocitos e incremento de actividad antibacteriana. En histología (datos no mostrados) los animales del T2 mostraron muy pocas lesiones de WSSV hasta las 72 horas de infección. A partir de las 72 horas se observó mortalidad. Esta alternativa de estimulación requiere más estudio en laboratorio y en campo, donde se podría controlar la carga viral mediante densidad de siembra y manejar las aplicaciones de estimulante a fin de prolongar el nivel de respuesta. En el tratamiento T4 a diferencia de las restantes combinaciones probióticos-?-1,3 glucanos, estos no se aplicaron de manera simultanea. La larvicultura se realizó únicamente con probióticos y los glucanos se aplicaron antes del desafío. El comportamiento inmunitario de esos animales se diferenció en varios aspectos de los restantes tratamientos con probióticos, semejándose a los que incluyeron solo glucanos, pero los animales del T4 presentaron un índice inmunitario superior al de estos últimos, sugiriendo que los probióticos influyeron positivamente en la respuesta del hospedero a la inmunoestimulación y al desafío. Resumiendo, los animales del T4 se presentaron saludables con una respuesta inmune fuerte (con ellos se obtuvo la supervivencia más alta en piscina) en tanto los animales de la combinación T2 se mostraron más reactivos al desafío viral (con ellos se obtuvo la supervivencia más alta en larvicultura.

Reconocimiento

Este proyecto ha sido financiado por la Fundación Internacional para la Ciencia (IFS). Los resultados de los desafíos formaron parte de la tesis de maestría en acuicultura marina de Yuri Espinosa, la misma que fue financiada por la Cooperación Técnica Belga (BTC)

Tabla1. Tratamientos de inmunoestimulación

Tratamientos		
T1	Con Probióticos	• Sin b-glucanos
T2		• Con b-glucanos desde Zoeall a Misis II y en PL2 a PL18
T3		• Con b-glucanos desde PL12 a PL18
T4		• Con b-glucanos 15 días antes del desafío
T5	Sin Probióticos	• Sin b-glucanos
T6		• Con b-glucanos desde Zoeall a MisisII y desde PL12 a F
T7		• Con b-glucanos desde PL12 a PL18
T8		• Con b-glucanos 15 días antes del desafío

Tabla 2. Indices inmunitarios de juveniles de L. vannamei desafiados con el WSSV.

Tratamientos	Período de muestreo		
	0h	24 h	360 h
T1	0,21 ± 0,06a**	0,36 ± 0,08b**	0,38 ± 0,09b**
T2	0,16 ± 0,05a*	0,35 ± 0,06b**	0,39 ± 0,04b**
T3	0,14 ± 0,05a*	0,27 ± 0,06b*	0,43 ± 0,06c**
T4	0,20 ± 0,04a**	0,23 ± 0,05a*	0,45 ± 0,04b**
T5	0,21 ± 0,06a**	0,28 ± 0,05b*	0,42 ± 0,08c**
T6	0,17 ± 0,06a*	0,32 ± 0,08b**	0,30 ± 0,04b*
T7	0,20 ± 0,07a**	0,27 ± 0,05b*	0,28 ± 0,05b*
T8	0,13 ± 0,06a*	0,28 ± 0,05b*	0,29 ± 0,04b*

Datos en una misma fila con diferente letra son significativos (Scheffé 95 %)
Datos en una misma columna con diferente cantidad de (*) son significativos

Tabla 3. Concentración de hemocitos circulantes (10^6 cel/ml) de juveniles de L. vannamei desafiados con el WSSV.

Tratamientos	Período de muestreo		
	0h	24 h	360 h
T1	7,03 ± 3,10a*	13,54 ± 6,45b**	16,62 ± 7,82c**
T2	5,85 ± 2,07a*	12,41 ± 6,11b**	20,23 ± 8,39c***
T3	6,37 ± 1,87a*	10,09 ± 5,05b**	23,13 ± 2,70c***
T4	10,92 ± 3,12b**	6,55 ± 2,82a*	19,67 ± 7,49c***
T5	9,45 ± 3,76b**	7,25 ± 2,67b**	16,40 ± 7,86c*
T6	11,33 ± 4,10a**	10,02 ± 5,23a**	16,88 ± 3,05b**
T7	11,14 ± 4,25b**	5,11 ± 2,49a*	14,16 ± 4,98c**
T8	8,51 ± 3,69b*	6,66 ± 3,67a*	11,20 ± 4,32c*

Datos en una misma fila con diferente letra son significativos (Scheffé 95 %)
Datos en una misma columna con diferente cantidad de (*) son significativos