Boletín Informativo No.74

15 de Febrero del 2003

CENAIM INFORMA

Por Fabrizio Echeverría, Blgo.
Jefe Lab. Inmunología

¿Puede la industria camaronera evaluar las sustancias inmunoestimulantes ofrecidas en el mercado y establecer su uso correcto?

Estudiante: *Luis Rendón* ***Promotor:*** *Jenny Rodríguez, Ph.D.*

La crisis que atraviesa la industria camaronera exige alternativas de manejo que permitan incrementar la resistencia de los animales, la manipulación del sistema inmune por medio del uso de estimulantes se vislumbra como tal. Pero ocurre, que tanto para los productores que desean utilizar estos aditivos, como para los investigadores, el panorama no es tan sencillo. Las sustancias estimulantes puras son extremadamente costosas lo que dificulta su aplicación a nivel comercial. Como alternativas más económicas, existen en el mercado un sin número de productos de diferente origen, concentración y bio-disponibilidad a veces desconocida.

La aplicación de aditivos inmunoestimulantes en los estanques de cultivo, implica la evaluación de productos comerciales. Sin embargo para estudiar el efecto sobre el sistema inmune de las sustancias inmunoestimulantes, se requieren los principios activos puros, sin compuestos adicionales que enmascaren su efecto. Evaluar *in vivo* los productos comerciales disponibles y determinar su efecto sobre el sistema inmune o sobre el incremento de la resistencia a patógenos, determinando a la vez su dosificación, es una tarea ardua y costosa. Adicionalmente, es muy difícil contratar el servicio de laboratorios especializados que den información sobre la concentración, estructura molecular y bio-disponibilidad de las principios activos presentes en los diferentes inmunoestimulantes del mercado. Una alternativa sería, que el propio sistema inmune del camarón evalúe los diferentes productos encontrados en el mercado, midiendo *in vitro* el efecto de estos productos sobre una actividad inmunitaria, y comparando dicho efecto contra curvas de calibración diseñadas con productos de concentración y dosis de utilización conocida. CENAIM dispone de pruebas cuantitativas *in vitro* que permiten medir la actividad de los hemocitos (principales efectores de la respuesta inmune del camarón). Una de estas pruebas es la Actividad Fenoloxidasa [(A)]. El compuesto evaluado en este estudio fue un producto comercial conteniendo peptido-glicano extraídos de una bacteria Gram +.

[(A)] La Fenoloxidasa es la enzima clave en un proceso conocido como sistema proPo que causa la melanización o manchas negras en los camarones cuando hay un patógeno. Rangos normales entre 50 min y 550 max. La experiencia indica valores superiores a 250 mD.O. como buenos.

Obtención de la Curva de calibración para Péptido-glicano (PG).

Para la elaboración de la curva de calibración, se prepararon diluciones a partir de una solución madre de 1.2 mg/ ml de Peptidoglycan puro (Fluka¨). En el ensayo se incluyó una actividad de base (sin inmunoestimulante). En la tabla 1, se muestran las diluciones de péptido-glicano puro utilizadas para diseñar la curva de calibración (Fig.1). Contra esta curva se contrastó el producto comercial. Las diluciones del producto comercial se prepararon a partir de una solución madre de 20 mg/ ml. Los ensayos *in vitro* se realizaron por triplicado (tabla 2).

Los resultados al comparar el producto comercial contra las curvas de calibración de tres pruebas *in vitro,* se muestran en la tabla 2. Promediando los datos de los tres ensayos se obtuvo 2,6 mg/ ml. Es decir que 20 mg de producto comercial (concentración de la solución madre empleada) tendrían un efecto sobre la actividad PO equivalente al de 2.6 mg de producto puro. En otras palabras, si queremos obtener una cantidad de producto comercial equivalente a 2 mg de péptido-glicano puro (principio activo), una simple regla de 3 indica que se debe utilizar 15.38 mg de producto comercial.

La estrategia de evaluación de productos inmunoestimulantes que se plantea en este estudio, no permite conocer ni la concentración ni la estructura molecular de los inmunoestimulantes presentes, pero es informativa en términos cuantitativos en cuanto al efecto de esas sustancias sobre un efector del sistema inmune del camarón, el sistema proPO. En otras palabras cuan reconocible sería la sustancia por el sistema inmune del camarón (bio-disponibilidad). La metodología reúne además las características de ser sencilla y sensible. Una segunda etapa del estudio sería estudiar *in vitro* la capacidad de estimular la generación de O_2^- de los productos inmunoestimulantes, en esta prueba inmunitaria la estimulación es sobre células integras, no sobre extractos celulares como en la prueba de actividad PO. Esta estrategia de selección puede ser validada mediante estudios *in vivo* de las dosis seleccionadas. En este momento se están realizando bio-ensayos en ese sentido.

Diluciones Sol.madre	Concentración (mg/ml)	mD.O. (490nm)**
1/2	0.6	611
1/3	0.4	550
1/4	0.3	512
1/5	0.24	494
1/10	0.12	454
0 *	0	409

* Blanco
** mD.O. = Densidad Optica; filtro 490nm

Tabla 1. *Diluciones de péptido-glicanos puros.*

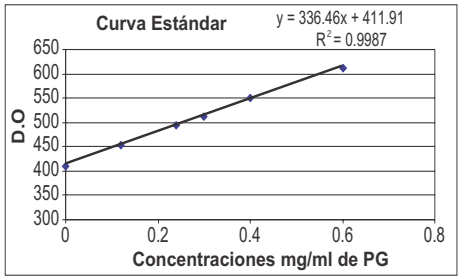

Figura 1. *Curva de calibración y ecuación de regresión para péptido-glicano puro.*

Diluciones de Sol. Madre Producto comercial	mD.O. (490nm)	Producto comercial mg/ml	Principio activo mg/ ml (concentración deducida al aplicar la ecuación)	X factor de dilución	Principio Activo Promedio mg /ml
1/5	597	4	0.551	2.8	2.4 ≅ 2.6 **
1/10	493	2	0.242	2.4	
1/25	440	0.8	0.082	2.1	

** *Promedio obtenido al repetir el ensayo por triplicado 2.6*

Tabla 2. *Concentración en Péptido-glicano del producto comercial en los 3 ensayos in Vitro, aplicando la ecuación de la curva estándar.*