# ENSAYOS INMUNITARIOS *IN VITRO,* UNA HERRAMIENTA PARA EVALUAR PRODUCTOS INMUNOESTIMULANTES.

*Luis Rendón, Fabrizio Echeverría, Miguel Angel Bravo y Jenny Rodrígez*[1]
[1]*Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas (CENAIM)*

## Introducción

La crisis que atraviesa la industria camaronera ecuatoriana a causa de la Mancha Blanca, exige alternativas de manejo que permitan incrementar la resistencia de los animales, la manipulación del sistema inmune se vislumbra como tal. En los invertebrados, en quienes la vacunación no es posible a causa de las particularidades de su sistema inmune, los inmunoestimulantes constituyen los principales candidatos para inducir un estado de alerta inmunitaria.

Sin embargo, ¿de qué información disponen los productores acerca de las sustancia inmunoestimulantes ofrecidas por el mercado y su modo de empleo?. Esta es abundante, variada y por lo tanto difícil de extrapolar a los sistemas de producción. Teóricamente el rol de los inmunoestimulantes es imitar una agresión microbiana, alertando por esta vía el sistema inmune (Engstad, 1994). Los inmunoestimulantes son extraídos de las paredes celulares de micro-organismos como bacterias Gram negativas (lipopolisacáridos), bacterias Gram positivas (peptidoglicanos), hongos, levaduras y algas (ß 1,3-glucanos).

La calidad y eficacia de los inmunoestimulantes para inducir la alerta inmunitaria están en función no sólo de la concentración del inmunoestimulante en el producto ofrecido, sino también de la estructura molecular, esta última hace al producto reconocible o no por el sistema inmune y varía de un organismo al otro.

Tanto para los productores que desean utilizar inmunoestimulantes, como para los investigadores, que desean evaluar su eficacia en estanques y tanques de larvicultura, el panorama no es muy sencillo. Las sustancias inmuno-estimulantes puras, son extrema-damente costosas lo que imposibilita su aplicación a nivel comercial. Como alternativas más económicas, existen en la naturaleza una gran variedad de bacterias y levaduras que han sido utilizadas con o sin ningún tratamiento de extracción (Devaraja *et al*., 1998; Scholz *et al*., 1999). Comercialmente se pueden adquirir también inmunoestimulantes extraídos de paredes microbianas siguiendo procedimientos estandarizados, que garantizan su calidad y eficacia (Biotec, INVE technologies, Immudyne Inc), ellos ofrecen además la ventaja de haber sido estudiados in vivo (Sung *et al*., 1994; Le Moullac *et al*., 1998). Sin embargo, en general estos son productos de importación, situación que los encarece o dificulta su obtención en el mercado local. Por otra parte la información que llega al productor sobre su utilización se refiere muchas veces a otras especies y otras condiciones de cultivo. Al ser utilizados directamente por el productor, sin estudios previos, pueden provocar decepción y escepticismo cuando no se obtiene el resultado esperado que justifique el precio pagado.

CENAIM como centro de investigación en acuicultura, está interesado en desarrollar protocolos de aplicación de inmunoestimulantes en los estanques, situación que implica evaluar productos comerciales económicos y eficaces. ¿Cómo podemos decidir que producto utilizar y cómo hacerlo?. Es muy difícil encontrar laboratorios especializados que presten servivcios para determinar la concentración, estructura molecular y bio-disponibilidad de las principios activos presentes en los diferentes inmunoestimulantes comerciales. Sin este conocimiento previo se puede recurrir a otras opciones para decidir sobre la calidad de un inmuno-estimulante. La primera pregunta a contestar es, ¿hay o no reconocimiento por el sistema inmune?, sencillas pruebas *in vitro* realizadas con hemocitos (principales efectores de la respuesta inmune del camarón) pueden responder esta pregunta (Le Moullac, 1998). Una segunda etapa consistiría en ensayos *in vivo* para determinar además de la dosis adecuada, si el producto es capaz de cumplir su objetivo, es decir, ingresar en el animal e inducir la alerta inmunitaria, sin provocar efectos colaterales indeseables, como la pérdida de peso reportada por algunos productores que utilizan ciertos derivados de ß-glucanos. Varios parámetros inmunitarios pueden medirse para evaluar este aspecto (Scholz *et al*., 1999; Otero *et al*., 2000). Para fines aplicados, el estudio no será completo sin ensayos de desafío microbiano en sistemas controlados de laboratorio. Sólo entonces será posible pasar a la fase experimental de campo, antes de recomendar un producto y una dosis en sistemas de producción. Obviamente, evaluar *in Vivo* los productos comerciales disponibles y determinar su efecto sobre el sistema inmune ó sobre el incremento de la resistencia a patógenos, determinando a la vez su dosificación, es una tarea ardua y costosa.

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 prepa-radas con productos ya probados, de concentración y dosis de utilización conocida. CENAIM dispone de pruebas cuantitativas *in vitro* que permiten medir la actividad de los hemocitos. Una de estas pruebas es la Actividad Fenoloxidasa PO, siguiendo el protocolo modificado por Echeverría (1998) y la cuantificación de la producción de $O_2^-$ (Muñoz *et al*., 2000) durante el choque respiratorio. Considerando los productos para preparar las curvas de calibración, basicamente el mercado ofrece 2 tipos de inmunoestimulantes, los ß-glucanos (preparados principalmente a partir de la levadura de pan *Saccharomyces cerevisae*) y peptidoglicanos.

Para los peptidoglicanos la literatura señala que un suministro diario de 0.2 mg/kg biomasa de producto puro (2 mg/kg de alimento según nuestros cálculos), incrementan la resistencia al WSSV (Itami *et al.*, 1998). En lo concerniente a ß 1,3-glucanos, desde 1998 CENAIM ha acumulado información sobre la dosis en mg/k de alimento de un producto extraído de *S. cerevisae*. Este producto utilizado a una concentración de 150 mg/kg de alimento incrementa tanto la respuesta inmune de camarón (Otero *et al*., 2000) como la resistencia al WSSV en piscinas (datos no publicados). Utilizando estos dos productos a diferentes concentraciones se han preparado curvas de calibración. Contra estas curvas se ha contrastado el efecto sobre la actividad PO de otros productos. Despejando la fórmula de la curva podemos deducir la concentración bioequivalente (biodisponible) de las sustancias inmunoestimulantes en los productos a evaluar. Los productos evaluados en este estudio fueron laminarina, ß 1,3-glucanos puro obtenido a partir del alga *Laminaria digitata* (Sigma) y un producto comercial conteniendo peptidoglicanos extraídos de la bacteria *Brevibacterium lactofermentum*.

## Materiales y Métodos

### Preparación del material biológico y tratamiento de la muestra

Se utilizó animales de 10 a 12 gr de peso, los mismos que fueron mantenidos en un tanque exterior del CENAIM a 30°C. La hemolinfa fue extraida con jeringuillas de 1 ml cargadas con citrato de Na al 10 % como anticoagulante. Luego de la extracción la proporción hemolinfa/anticoagulante se igualó V/V. Con la finalidad de disponer de la cantidad de muestra necesaria, para cada ensayo realizado se preparó mezclas de hemolinfa de 10 animales. Se tomó una alícuota de 10 µl de la mezcla para realizar un hemograma. El tratamiento de la muestra para medir actividad PO se basó en el procedimiento descrito por Hernández-López *et al.* (1997). La muestra fue centrifugada a 800 g, 4°C por 10 minutos, el sobrenadante eliminado y el pellet resuspendido con un volumen equivalente al de la hemolinfa extraída, de tampon Cacodilato de Na 10 mM pH 7. La muestra fue nuevamente centrifugada a 12000 g por 3 minutos. El pellet fue descartado y el sobrenadante utilizado en las pruebas de PO. Para medir la actividad PO se siguió el protocolo modificado por Echeverría (1998).

| Diluciones | Concentración (mg/ml) | mD.O. |
|---|---|---|
| 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

***Tabla 1.*** *Diluciones de péptidoglicanos puros de la primera prueba* in vitro.

### Curva de calibración con peptido glicano puro

Para la elaboración de la curva de calibración se preparó una solución madre de 1.2 mg/ml de péptido glicano (Fluka). A partir de esta solución se realizó el ensayo de actividad PO con las diferentes diluciones. En el ensayo se incluyó también un blanco (sin inmunoestimulante). 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.

### Curva de calibración con ß 1,3-glucanos

Para la elaboración de la curva de calibración se preparó una solución madre de 30 mg/ml del producto comercial conocido. A partir de esta solución se realizó el ensayo de actividad PO con las diluciones 1/1, 1/26.6, 1/40 y 1/80. En el ensayo se incluyó también un blanco (sin inmunoestimulante). Contra esta curva estándar se contrastó la laminarina.

## Resultados

### Obtención de la Curva de Calibración para Peptidoglicano (PG)

Se realizaron varios ensayos, de los cuales tres se seleccionaron, en base al valor de regresión de la fórmula de la curva, 0.99 en los tres casos. En la tabla 1, se muestran las diluciones de peptidoglicano puro utilizadas en la primera prueba *in vitro*. En la figura 1 la curva estándar obtenida en la primera prueba *in vitro*.

Los resultados de comparación de un producto comercial contra el estándar puro en 3 ensayos seleccionados se muestran en la tabla 2.

Promediando los datos de las 3 pruebas in *vitro* seleccionadas, se obtuvo que 20 mg de producto comercial tendrían un efecto sobre la actividad PO equivalente a 2.6 mg de producto puro (Tabla 3).

Es decir que si queremos obtener una cantidad de producto comercial equivalente a 2 mg, una simple regla de 3 indica que se debe utilizar 15.38 mg del producto comercial evaluado.

### Obtención de la Curva de calibración de ß 1,3-glucanos.

Las diluciones para la curva de calibración se realizaron a partir de una solución madre de ß-glucano comercial de 30 mg/ml. Se realizaron varios ensayos, de los cuales se seleccionaron 4, siendo los coeficientes de regresión $R^2$ : 0.99, 0.96, 0.99 y 0.99. En las tabla 4 se muestran las diluciones de ß-glucano comercial, con las cuales se elaboró la curva de calibración midiendo la actividad PO. En la figura 2 se

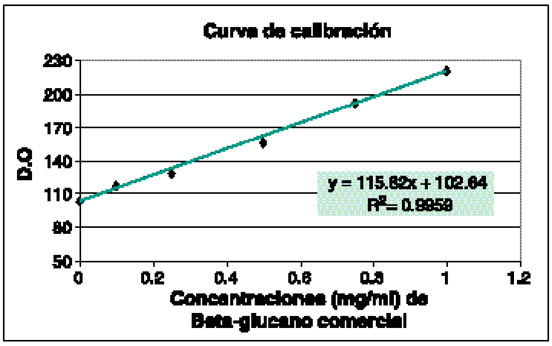


***Figura 1.*** *Curva de calibración y ecuación de regresión de la prueba in vitro con Beta glucano.*

| Prueba | Diluciones de sol madre del producto comercial | Producto comercial en mg/ml | mD.O | Concentración bioequivalente en mg/ml (deducida al aplicar la ecuación) | x factor de dilucion |
|---|---|---|---|---|---|
| # 1 | 1/5 | 4 | 597 | 0.5509 | 2.76 |
| | 1/10 | 2 | 493 | 0.2421 | 2.41 |
| | 1/25 | 0.8 | 440 | 0.0824 | 2.11 |
| # 2 | 1/5 | 4 | 218 | 0.3423 | 1.7 |
| | 1/10 | 2 | 160 | 0.1854 | 1.9 |
| | 1/25 | 0.8 | 111 | 0.0536 | 1.3 |
| # 3 | 1/5 | 4 | 235 | 0.756 | 3.8 |
| | 1/10 | 2 | 176 | 0.453 | 4.5 |
| | 1/25 | 0.8 | 112 | 0.124 | 3.1 |

***Tabla 2.*** *Concentración en Péptidoglicano del producto comercial en las 3 pruebas in vitro.*

muestran la curva y la ecuación de regresión lineal de la primera prueba *in vitro* utilizando ß 1,3-glucanos.

Varias concentraciones previamente establecidas de Laminarina se contrastaron contra las curvas. La solución de trabajo de la laminarina fue de 30 mg/ml. Para realizar los cálculos se utilizó los resultados de la concentración 1mg/ml (Tabla 5). A esa concentración, los resultados fueron más repetibles. El promedio de las cuatro repeticiones fue 0.30 mg/ml, es decir que si tomamos 1 mg de laminarina obtenemos una actividad PO equivalente a la obtenida por 0.30 mg del producto utilizado para hacer la curva de calibración. Nosotros sabemos que se requiere 150 mg/kg de alimento de ese producto, si desearamos reemplazarlo por laminarina necesitariamos 500 mg/kg de alimento.

| Prueba *in vitro* | Promedios |
|---|---|
| 1 | 2.41 |
| 2 | 1.6 |
| 3 | 3.8 |
| Promedio de las 3 pruebas | 2.6 mg/ml |

***Tabla 3.*** *Promedios de las concentraciones de producto comercial en las 3 pruebas seleccionadas*

| Diluciones | Concentración (mg/ml) | mD.O. |
|---|---|---|
| 1/1 | 1 | 220 |
| 1/26.6 | 0.75 | 191 |
| 1/40 | 0.5 | 156 |
| 1/80 | 0.25 | 129 |
| 1/200 | 0.1 | 117 |
| 0* | 0 | 104 |

* Blanco

***Tabla 4*** *Diluciones de ß-glucano comercial para la curva de calibración.*

| | Laminarina en mg/ml | Promedio mD.O | Biodisponible mg/ml |
|---|---|---|---|
| Ensayo 1 | 1 | 237 | 0.3 |
| Ensayo 2 | 1 | 254 | 0.45 |
| Ensayo 3 | 1 | 122 | 0.17 |
| Ensayo 4 | 1 | 237 | 0.28 |
| Promedio | | | 0.30 |

***Tabla 5 .*** *Concentraciones de laminarina original 30 mg/ml.*

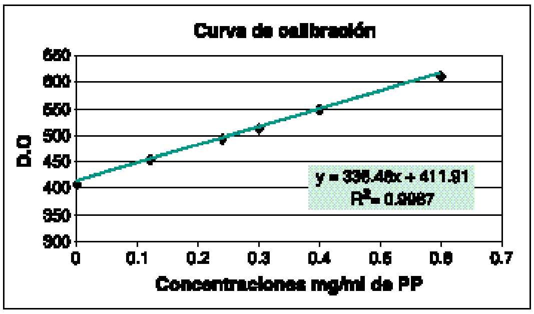


***Figura 2.*** *Curva de calibración y fórmula de regresión de la segunda prueba in vitro seleccionada.*

## Discusión

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 en los productos a ser evaluados, pero si es muy informativa en términos cuantitativos en cuanto al efecto de esas sustancias sobre un efector del sistema inmune del camarón, el sistema proPO (bioequivalencia o biodisponibilidad).

La laminarina como estimulante de la actividad PO puede llegar a niveles de saturación a concentraciones superiores a 1 mg/ml, obteniéndose decrecimiento de la señal al incrementar la concentración. Observaciones similares han sido reportadas por Hernández-Lopez et al (1996). Además, esta concentración de saturación varió de una muestra de hemocitos a otra, por este motivo se decidió tomar en cuenta para los cálculos únicamente la dosis 1mg/ml, con la que se obtuvo resultados más repetibles. La laminarina, es un derivado de una alga y la estructura molecular (brazos laterales de ß-1,3 muy cortos) la harían menos biodisponible (menos inmunogénica) que los ß-1,3 derivados de levadura de pan, condición que explicaría por qué motivo a pesar de ser un producto puro de altísima calidad se requiere utilizarla en altas concentraciones, para obtener un efecto similar al obtenido con un producto menos elaborado pero derivado de levadura de pan.

Trabajar con los péptidoglicanos fue relativamente fácil en cuanto a repetitividad e intensidad de la señal. Según el manual de uso el producto comercial tiene una concentración de peptidoglicanos del 75 % y debe ser utilizado a 500 ó 1000 mg/kg de alimento. Nuestros resultados indican que únicamente el 13 % es bioequivalente con respecto al peptidoglicano puro y que sólo se requieren 15 mg/kg de alimento.

Esta estrategia de evaluación de productos inmunoestimulantes ha sido validada mediante estudios *in vivo*. El análisis de datos indica que las dosis seleccionadas mediante la prueba *in vitro* planteada en este estudio fueron capaces de provocar modificaciones en el hemograma de los camarones inmunoestimulados, es decir alertaron de manera significativa el sistema inmune.

## BIBLIOGRAFIA

Devaraja, T. N., Otta, S. K., Shubha, G., Karunasagar, I., Tauro, P. and Karunasagar, I., 1998. Immunostimulation of shrimp trough oral administration of *vibrio* and yeast glucan. In: Flegel, T. W. (Eds), Advances in Shrimp Biotechnology. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok, pp. 167-170.

Echeverria, L. F., Desarrollo de un ensayo de cuantificación de la actividad fenoloxidasa (PO) como una herramienta de inmunoevaluación del camarón *Penaeus vannamei.* Informe técnico, Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas CENAIM. pp, 1-17.

Engstad, R.E., 1994. Yeast b-Glucan as an immunostimulant in atlantic salmon (Salmo salar L.). A thesis submitted in partial fulfilment of the requirements for the degree of doctor scientarum. University of Tromso, Norway.

Hernández-Lopez, J., Gollas-Galván, T. and Vargas-Albores, F., 1996. Activation of the prophenoloxidase system of the brown shrimp (Penaeus californiensis, Holmes). Comp. Biochem. Physiol.113C (1), 61-66.

Itami, T., Maeda, M., Suzuki, N., Tokushige, K., Nakagawa, A., Hennig, O., Kondo, M., Kasornchandra, J., Hirono, I., Aoki, T., Kusuda, R. and Takahashi. Y. 1998. Possible prevention of white spot syndrome (WSS) in kuruma shrimp, Penaeus japonicus, in Japan. In T. W. Flegel (ed) Advances in shrimp biotechnology. National Center for Genetic Engineering and biotechnology, Bagkok.

Le Moullac G., De Laborie, P. L., Goarant, C. and Dehasque, M.,1998b. Principles and problems involved in the evaluation of immunostimulants on juvenile shrimp. IV Simposium Internacional de Nutrición Acuícola, November, 15-18, La Paz, México.

Muñoz, M., Cedeño, R., Rodríguez., Van der Knap., W. P.W., Mialhe., Bachere., 2000., Measurement of reactive intermediate production in haemocytes of the penaeid shrimp, *Penaeus vannamei.* Aquaculture 191, 89-107.

Otero, V., Molina, C., Cedeño, R., Sotomayor, M. Y Rodríguez, J., 2000. Evaluación del efecto inmunoestimulante de los b-Glucanos. El mundo acuícola 6(2), 46-51.

Sung, H. H., Kuo, G. H., Song, Y. L., 1994. Vibriosis resistance induced by glucan treatment in tiger shrimp (*Penaeus monodon*). Fish Pathology 29 (1), 11-17.

Sholz, U., García-Díaz, G., Ricque, D., Cruz-Suarez, L.E., Vargas-Albores, F., Latchford, J., 1999. Enhacement of vibriosis resistance in juvenile Penaeus vannamei by supplementation of diets with different yeast products. Aquaculture 176, 271-283.