

# **Herramientas para Determinar Inmunoestimulación**

Francisco Vargas-Albores

Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo. CIAD.  
PO Box 1735; Hermosillo Son.; 83000, México  
Tel: +52 (662) 289-2400  
Fax: +52 (662) 280-0055  
E-mail: fvargas@cascabel.ciad.mx

## **RESUMEN**

Independientemente de su eficiencia, los inmunoestimulantes y su efecto ahora pueden ser explicados a la luz de los avances en el estudio del sistema inmune del camarón y del acceso a herramientas más sensibles y precisas. Variaciones en los resultados pueden ser explicados en base a parámetros ambientales y fisiológicos; pero el modo de acción y el efecto en la expresión de inmunoproteínas requiere conocer el mecanismo de activación de la respuesta inmune del camarón y las características de sus posibles efectores.

## **INTRODUCCIÓN**

El cultivo del camarón se ha colocado como una actividad económica importante debido a su alta rentabilidad. Sin embargo, sigue siendo una industria de alto riesgo debido a la presencia y diseminación de enfermedades. Independientemente de los avances en fisiología, nutrición, reproducción, epidemiología, y otras áreas de estudio, el control de las enfermedades sigue siendo un problema crucial. Los avances en nutrición han permitido la búsqueda de nuevos insumos, mejores o más baratos, se han establecido con mayor precisión los requerimientos nutricionales, se ha avanzado en la fisiología de la digestión aportando beneficios en la preparación de los alimentos.

Así mismo, los avances en otras disciplinas como la endocrinología, bioquímica y fisiología han ayudado a conocer los factores que afectan el crecimiento y las formas de aprovechar los nutrimentos. El efecto de la temperatura, salinidad, y otros ambientales han sido ampliamente estudiados, así como sus repercusiones en susceptibilidad a enfermedades o bajo crecimiento de los organismos. La bioquímica y fisiología de la digestión ha aportado resultados interesantes en los últimos años. En fin, todas las ciencias han sido estimuladas buscando incrementar los rendimientos, disminución de pérdidas y, recientemente, reducir el impacto sobre el medio ambiente.

Sobre el control de las enfermedades, la histología, la infectología, la epidemiología y la biología molecular, entre otras disciplinas, han aportado herramientas para el diagnóstico y control de las enfermedades. Hoy en día, la detección de los virus es una práctica común, mal entendida, por cierto. La bacteriología ha mostrado avances importantes desde la detección e identificación de bacterias patógenas y la implementación de tratamientos con antibióticos, hasta definir el valor profiláctico de los probióticos. Ni que decir de las campañas de sanidad acuícola, que cada vez abarcan más fases de la cadena productiva, repercutiendo en los costos de mercadeo, principalmente.

Hace algunos años se iniciaron los trabajos para mantener organismos libres de patógenos específicos (SPF), los cuales eran muy útiles como animales de experimentación, pero dejan mucho que desear en condiciones reales de cultivo. No es que sean de mala calidad, simplemente que al interactuar con el medio, su calidad sanitaria previa no es suficiente para librarlo o protegerlo de una infección, al menos hasta ahora.

Las interacciones que el camarón tiene con su medio ambiente no son fáciles de interpretar básicamente porque la respuesta fisiológica no solamente depende del factor externo, sino también de factores internos o fisiológicos, condiciones de salud o nutricional, etc. En esta complejidad de factores intrínsecos y extrínsecos, las alternativas para controlar las enfermedades se han multiplicado. En los últimos años se ha impulsado el uso de inmunoestimulantes; sin embargo, para los productores el efecto benéfico de éstos aún no es claro o contundente y frecuentemente cuestionan su utilidad.

## **LOS INMUNOESTIMULANTES**

Hace 6 años, en este mismo foro, mencionamos la falta de evidencias experimentales sobre la utilidad de estos compuestos. Existen varias publicaciones que reportan una mayor sobrevivencia de los organismos tratados con glucanos u otros polisacáridos. Desgraciadamente, no existen publicaciones sobre los experimentos fallidos y, sobre todo, experiencias de campo que no han mejorado su producción pero sí elevado sus costos de operación.

Respondiendo a la pregunta sobre la utilidad de los inmunoestimulantes, definitivamente existen en el mercado algunos que podrían ser útiles en términos de estimulación del sistema inmune. De ahí que, las características farmacológicas del producto es la primera variable que introducimos a la ecuación cuando queremos evaluar inmunoestimulación. La segunda variable importante es la condición fisiológica o estadio del animal, donde las reacciones pueden tener una conducta totalmente diferente. Aunque en mayor o menor grado dependiendo de la condición del animal existen reacciones básicas que siempre se van a estar presentes. Por otro lado, muchas reacciones bioquímicas y conductas fisiológicas que son inhibidas o estimuladas durante una fase o condición fisiológica del animal. Existen ejemplos donde un organismo comensal llega a producir una enfermedad debido a una baja en las defensas del camarón. Así mismo es posible que el camarón no responda a los inmunoestimulantes por estar comprometidos fisiológicamente con otro proceso, como la muda o reproducción, o simplemente se encuentra mal nutrido.

Una condición especial que hay que considerar seriamente es la capacidad intrínseca de su sistema inmune, para responder a la estimulación. Es posible observar una falta de respuesta a los inmunostimulantes en organismos bien alimentados, sanos, en buenas condiciones de cultivo, etc. Sin embargo, el sistema inmune no está lo suficientemente maduro. Esto es más frecuente en las primeras fases del desarrollo y explica porque las larvas son más susceptibles a las enfermedades. En este punto debemos cuidar la condición fisiológica del animal, el estadio y procurar que el sistema inmune esté lo suficientemente maduro para responder.

La tercera variable importante son las condiciones medioambientales, ya que el organismo tiene que contrarrestar la fuerza que se ejerce sobre ellos. Es claro que siendo el camarón un animal que controla su presión osmótica, la salinidad del agua juega un papel importante en el gasto energético. A salinidades mayores o menores del punto isoosmótico (25 ppm) la economía del camarón tiene que invertir energía para mantener su equilibrio osmótico. Además, la salinidad afecta las propiedades fisicoquímicas de los alimentos, de los inmunostimulantes, de los antibióticos y hasta la conducta biológica de los probióticos, simbióticos y patógenos presentes en el estanque. Así pues, la aplicación de los inmunostimulantes debe hacerse en condiciones ambientales recomendadas, o bien seleccionar inmunostimulantes que toleren un amplio rango de variaciones en los parámetros externos.

La estabilidad física y química del inmunostimulante es un factor importante. La salinidad, pH, temperatura pueden modificar las propiedades fisicoquímicas, afectando la solubilidad, grado de hidratación, e incluso en condiciones extremas, se podría presentar hidrólisis o degradación del compuesto.

Si sumamos los dos factores, modificación de las propiedades fisicoquímicas del inmunostimulante y el grado de afectación del estado fisiológico de los camarones, la ecuación se vuelve más compleja. Sin embargo, es posible reducir las variaciones al definir al menos una de las partes. Las propiedades fisicoquímicas del inmunostimulante y el rango donde son estables deben ser claramente indicadas. Por otro lado, las condiciones fisiológicas del animal pueden ser fácilmente evaluado analizando los componentes químico-fisiológicos más importantes de la hemolinfa, con énfasis de las proteínas involucradas en el sistema inmune.

## **DEMOSTRACIÓN DE LA CALIDAD**

Retomando la primera variable importante, la calidad o eficiencia del inmunostimulante debe ser demostrada ampliamente. De eso no hay duda, el problema es, cómo demostrarla?. Incrementos en la sobrevivencia es posiblemente el criterio más utilizado. De hecho, para los productores parece ser el más importante. Sin embargo, los experimentos en acuarios con condiciones controladas difícilmente pueden ser extrapolados a las condiciones reales de los estanques, debido a las otras dos variables mencionadas. Experimentos en campo, rompen con el requisito de reproducibilidad, debido a la diversidad de ambientes donde las granjas están localizadas. Es decir, es difícil extrapolar los resultados obtenidos en Ecuador

a México, o de Sinaloa a Sonora. De este último ejemplo, ya han tomado nota los camaricultores del Noroeste Mexicano.

Por lo familiarizado que estamos con ellos, los antibióticos pueden ser un buen ejemplo para definir los criterios que marcan la calidad farmacológica de un producto. Independientemente de la condición del paciente y de sus habilidades fisiológicas, un antibiótico es capaz de matar a las bacterias. En condiciones de mala nutrición o depresión del sistema inmune, es posible que se observe un menor efecto, porque no mejora el cuadro infeccioso del paciente. Hay otras condiciones en las que no es recomendable el uso de antibióticos, el embarazo, por ejemplo. Sin embargo, el mecanismo de acción del antibiótico es conocido, se sabe a que tipo o grupo de bacterias ataca, se conoce la concentración efectiva mínima necesaria, hasta las posibles reacciones adversas o secundarias. Es decir, la capacidad del antibiótico puede ser medida y comparada, estableciéndose criterios de calidad o eficiencia entre dos productos. Así mismo, existen antibióticos que preferentemente atacan bacterias Gram+ y otros que afectan principalmente a Gram-, cual es mejor? Depende para que lo necesite.

Eso mismo debemos de considerar al evaluar un inmunoestimulante. ¿Qué órgano, tejido o sistema está afectando o activando? ¿Cómo se puede medir y comparar el efecto? ¿Cuál sería la dosis adecuada? y, ¿existen reacciones adversas? ¿Es un inmunoestimulante universal o solamente contra bacterias? O contra virus?

## **EL SISTEMA INMUNE**

En este problema, el laboratorio de Biotecnología Marina, del CIAD, ha estado trabajando en la búsqueda de proteínas y genes de la respuesta inmune del camarón, marcadores moleculares para animales resistentes y marcadores de inmunoestimulación. Pocos han sido realmente los trabajos que demuestran la modificación de algún parámetro inmune por el uso de inmunoestimulantes y esto no se debe a un efecto limitado de los estimulantes. Esto parece estar más relacionado a nuestro desconocimiento del sistema inmune y, más grave aún, a la eliminación de pruebas conocidas durante los protocolos de evaluación.

Las proteínas relacionadas con el sistema inmune del camarón que han sido descritas son muy pocas. De ellas, la mayoría son efectoras, es decir responsables de eliminar al patógeno. Pero, ¿qué sabemos de las proteínas responsables de la regulación y expresión del sistema inmune? Extremadamente muy poco.

Para muchas de estas inmunoproteínas o efectores de la respuesta inmune del camarón existen pruebas accesibles a cualquier laboratorio. Así que mediciones de proPO, BGBP, peneidinas, lisozima, etc, pueden ser aplicadas fácilmente a cualquier protocolo de inmunoestimulación. ¿Porqué no utilizarlas? Los parámetros internos del animal pueden ser mejores indicadores que la sobrevivencia, sobre todo si podemos definir con claridad cual de estos parámetros es necesario incrementar para producir protección. Como ejemplo, las vacunas en humanos. El objetivo de una vacunación es aumentar los niveles de anticuerpos o células o ambos dirigidos contra el material inoculado. En forma análoga, si observamos

que un tratamiento produce un incremento de lisozima, además de mejorar la sobrevivencia, entonces estamos en posibilidades de buscar estimuladores de la producción de lisozima. Este es solamente un ejemplo y está simplificado. Pero si fuera el caso, bastaría medir los niveles de lisozima a algunos de los animales en el estanque y saber si están respondiendo bien al tratamiento, en lugar de esperar que la mortandad nos indique que dicho tratamiento no ha sido efectivo.

Por otro lado, la interpretación de los resultados también deberá hacerse con cuidado. Por ejemplo, con frecuencia se menciona que los glucanos activan el sistema inmune. Sin embargo, debe entenderse que la única evidencia que existe es que cuando los hemocitos se incuban con glucanos, se aprecia una liberación del contenido. Esta degranulación hace que el sistema proPO se active y con ello toda la maquinaria de respuesta celular, además de la acción directa de fenoloxidasas sobre fenoles, produciendo quinonas que terminan en melanina.

Si después de este tratamiento, los hemocitos se incuban con bacterias ya no pueden responder con la liberación granular, activación del sistema proPO y por ende las repuestas celulares esperadas. Significa un agotamiento por consumo. Entonces, como pueden los glucanos estimular al sistema inmune? Asumiendo, lo cual no ha podido ser demostrado, que los glucanos atraviesan las barreras físicas y fisiológicas para llegar a la hemolinfa del camarón, su primera acción sería la de activar los hemocitos y liberar los gránulos. Definitivamente, tendríamos una hemolinfa cargada de efectores inmunes, una hemolinfa donde la sobrevivencia de los patógenos estuviera bastante comprometida. Sin embargo, los mecanismos regulatorios de la respuesta inmune, harían descender poco a poco los niveles de efectores inmunes.

Si bien los hemocitos re-sintetizarían nuevamente los efectores, y el tejido hematopoyético produciría más células, el costo energético podría ser grande. Además en el inter el organismo cuenta con niveles bajos de estos efectores, haciéndolos más susceptibles. Un segundo estímulo produciría un resultado similar y en una estimulación continua, el resultado sería desastroso. El modelo anterior y los resultados observados con los inmunoestimulantes no son congruentes, lo que significa que uno de los dos está equivocado. El modelo ha sido confirmado en el laboratorio; aunque no se ha demostrado *in vivo*. Así que, o el inmunoestimulante no tiene efecto sobre el sistema inmune y será necesario definir entonces su blanco y su mecanismo; o bien utiliza otro mecanismo de inducción de la respuesta inmune, el cual debería de ser explicado.

Los glucanos como inmunoestimulantes fueron adoptados de los tratamientos utilizados para estimular el sistema inmune de vertebrados. Sin embargo, los sistemas inmunes son muy diferentes y por ende, los mecanismos de activación y de respuesta. Es claro que los vertebrados poseen una respuesta inmunológica que le permite “recordar” un contacto previo y presentar una respuesta más eficiente en el segundo contacto. También se ha demostrado la estimulación de las interleucinas y otras proteínas de comunicación celular, las cuales no tienen una acción directa sobre los patógenos y demostrar su presencia es difícil. Sin embargo, en invertebrados, la presencia de una memoria inmunológica ha sido

casi totalmente descartada. Lo más cercano que ha podido definirse es una memoria muy corta, basada en los tiempos de activación bioquímica de las rutas, mas que en la presencia de un tipo celular responsable de la memoria, como sucede en los vertebrados.

Es de esperarse que existan proteínas de comunicación celular o reguladoras del sistema inmune; pero aún no han sido descritas en camarón o en otros crustáceos. Hasta el momento, los ejemplos que se conocen son en insectos. Cuando se observa la cadena de activación celular de los insectos y de los vertebrados, se aprecia una gran similitud en su logística y secuencia, por lo que también podrían esperarse mecanismos similares. Regresando a nuestro sujeto de estudio: ¿Pueden los inmunoestimulantes “encender” los genes de la respuesta inmune del camarón?

## **NUEVAS HERRAMIENTAS**

Al inocular glucanos y bacterias, los hemocitos del camarón presentaron diferencias en sus patrones de expresión. Las diferencias fueron respecto a un control y entre los inoculados con glucanos y con bacterias. Este resultado es la primera evidencia de activación de los hemocitos por partículas inertes. Además, demuestra que la respuesta a glucanos y bacterias es diferente, al menos a nivel de expresión. Entonces, ¿existen varios mecanismos de activación del sistema inmune? ¿Hay especificidad en la respuesta inmune del camarón? Para resolver estas preguntas existen varias estrategias. La primera es el Despliegue Diferencial (DD), el cual fue utilizado para obtener la evidencia inicial. La segunda es la construcción de una genoteca sustractiva, y la tercera arreglos moleculares de una genoteca construida con el DNA genómico. En todos los casos, se busca comparar los mRNA por las células control con los mRNA expresados por las células estimuladas.

El DD es una técnica relativamente sencilla que se basa en la síntesis del cDNA correspondiente, tanto del mRNA control como del mRNA tratados, y la amplificación por PCR utilizando primers arbitrarios. Posteriormente se corre una electroforesis y se buscan aquellos productos de PCR (bandas) que estén presentes solamente en una de las muestras. Si la banda está en la muestra control, pero no la muestra de organismos tratados, significa que dicho gen ha sido suprimido. Por el contrario, su presencia en los tratados, pero no en el control, es evidencia preliminar que dicho gen ha sido expresado por el tratamiento.

La segunda estrategia es la construcción de una genoteca sustractiva. Este es un procedimiento mucho mas complicado que requiere de entrenamiento e instalaciones especiales. Sin embargo, es el procedimiento que podría, más rápidamente, dar luz sobre los genes que se expresan por un tratamiento. El fundamento de la técnica, a diferencia de su ejecución, es muy simple. Los mRNA que están presentes en el control, son eliminados de los tratados, los restantes son clonados, constituyendo una genoteca que contiene preferentemente los genes que no estaban presentes en el control. Estos representan los genes estimulados por el tratamiento y su secuenciación puede ayudarnos a identificar la proteína y posiblemente su función.

La tercera estrategia, significa que el DNA genómico del camarón se fragmenta a tamaños manejables (2-30 kb) y estos fragmentos son clonados. Cada uno de los clones es inmovilizado en una membrana y, posteriormente, se hibridiza utilizando como sonda el mRNA de los animales tratados y del control. Si un clon es reconocido por el estimulado, pero no por el control, indica que ese clon contiene información sobre alguna proteína activada por el tratamiento. El problema es la cantidad de trabajo y el número de clones que se necesitan estudiar para poder encontrar todos los genes de la respuesta a un tratamiento. Este tipo de proyectos realmente son secundarios a los proyectos de secuenciación del genoma completo, como el caso del humano.

Independientemente de obtener la identidad de las proteínas, evidencias de activación de diferentes genes por tratamientos puede ser una ayuda para entender el mecanismo de activación del sistema inmune por los inmunoestimulantes. Por ejemplo, nosotros observamos variaciones en la expresión a diferentes tiempos indicando que los genes de la respuesta inmune son activados secuencialmente y no todos a la vez. Hemos visto que el gen que codifica para una proteína, llamada GI-FKA, se expresa a las 1.5h después de la inoculación de glucanos; pero no de bacterias, ni a otros tiempos probados (6, 12 y 24h).

Utilizando una genoteca sustractiva, estamos encontrando los genes activados por la inoculación de bacterias. En breve, iniciaremos la construcción de una genoteca sustractiva para ver el efecto de pesticidas. Esta metodología podría ser fácilmente adoptada para el estudio de inmunoestimulantes y permitiría conocer y comparar los mecanismo de activación del sistema inmune.

Los arreglos moleculares parece ser una excelente herramienta para la búsqueda de genes que se van activando. A partir de una genoteca, los clones se inmovilizan en forma de arreglos ordenados. Para la cantidad de información que existe sobre genes de camarón, los macroarreglos pueden ser suficientes y en una superficie de 6 cm<sup>2</sup> se pueden inmovilizar 50-80 clones. Al aumentar la información y el número de genes a estudiar se pueden utilizar los microarreglos, los cuales pueden soportar hasta 50,000 clones por cm<sup>2</sup>.

Una vez construido el arreglo, la búsqueda es extremada simple. Basta con hacer una sonda cDNA, a partir del mRNA utilizando transcripción inversa. Aunque se puede utilizar radiactividad para el marcaje de la sonda, la digoxigenina ha dado excelentes resultados y sensibilidad comparable, utilizando sustratos quimioluminocentes. Las sondas de los animales control y de los estimulados, son hibridizadas por separado con el arreglo. Las diferencias son fácilmente visibles y los clones identificados. En caso de aplicarse para el estudio de inmunoestimulación, esta herramienta permitiría encontrar diferencias entre productos e incluso definiría diferentes especificidades o rutas de activación. Además podría ser utilizada para ver diferencias en la expresión dependiendo de la edad del organismo.

El avance en el campo de la inmunoestimulación depende mucho de la demostración del efecto sobre la síntesis de inmunoproteínas efectoras y reguladoras. Incluir los conocimientos actuales sobre el sistema inmune del camarón y las herramientas, cada vez

más precisas, al estudio de los inmunoestimulantes ofrece para los científicos una excelente experiencia en genómica funcional, para los fabricantes la oportunidad de consolidar su producto al explicar el mecanismo de acción y para los productores la certidumbre de la eficiencia del tratamiento.