

Respuesta inmune y antioxidante en camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, expuesto a inmunoestimulantes y probióticos

Angel I. Campa-Córdova, Artemio Hernández-Salmerón, Felipe Ascencio-Valle,
Gabriel Aguirre-Guzmán.

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR). Mar Bermejo 195, Col.
Playa Palo de Santa Rita, La Paz, B.C.S., 23090. México Tel.: +52-612-123-8464; Fax:
+52-612-125-3625, Email: angcamp04@cibnor.mx

Resumen

El estudio del sistema inmune en crustáceos es una herramienta útil para el diseño de estrategias que permitan mejorar la respuesta de defensa del hospedero hacia patógenos potenciales. El presente estudio se enfocó en la medición de la respuesta oxidativa y antioxidante en juveniles de camarón blanco, *Litopenaeus vannamei*, expuesto a inmunoestimulantes y levaduras con potencial probiótico. Se determinó la generación de anión superóxido, encontrando una producción entre 1.5 y 2.0 veces mayor que la observada en los controles a las 24 h posteriores al reto con β -1,6 glucano y polisacárido sulfatado. La exposición de los camarones durante 1 h a *V. parahaemolyticus* registró una respuesta más rápida (1 h posterior al reto) que la observada con los otros tratamientos (24 h posteriores al reto). Se estudió la actividad de la enzima superóxido dismutasa (Mn-SOD) en hemocitos y en músculo en el camarón blanco *L. vannamei*. Los camarones fueron inmersos en soluciones de β -1,6 glucano y polisacárido sulfatado durante 6 h obteniendo niveles similares en ambos tejidos (1.5 y 1.4 veces mayor que el control, respectivamente). El conteo de hemocitos (CTH) se incrementó respecto a los valores control entre las 48 y 120 h posteriores al reto. Se estudió la capacidad inmunoestimulante y de activación del sistema antioxidante de 3 cepas de levaduras marinas (*Debaryomyces hansenii*) y un inmunoestimulante (laminarina) en el cultivo de juveniles de camarón blanco. Se utilizaron dos concentraciones de cada levadura, 1×10^4 y 1×10^6 UFC/ml, obteniendo que la dosis con 1×10^6 UFC/ml indujo un incremento significativo en CTH y catalasa respecto al grupo control. Los camarones expuestos a la laminarina presentaron un incremento en la actividad Mn-SOD. En este estudio, la respuesta oxidativa y

antioxidante de juveniles de camarón blanco, *L. vannamei*, se incrementó utilizando inmunoestimulantes comerciales y probióticos.

Palabras clave: Inmunoestimulantes, probióticos, invertebrados, acuicultura

Introducción

Las investigaciones sobre el sistema inmune de camarón esta motivada por el interés de mejorar el crecimiento, supervivencia y control sobre las enfermedades que afectan a este organismo; siendo estos componentes de gran relevancia en la producción en sistemas de cultivo comercial de este crustáceo. Como todo invertebrado, el sistema inmunológico de los camarones peneidos esta mediado por los hemocitos (hialinos, granulares, y semi-granulares) quienes poseen capacidad citotóxica y comunicación intercelular que les facilita las funciones de coagulación, reconocimiento, fagocitosis, melanización, formación de nódulos y encapsulación (Aguirre-Guzmán, Sánchez-Martínez, Campa-Córdova, Luna-González & Ascencio 2009). El sistema inmune de los camarones cuenta también con la presencia de varios componentes plasmáticos (péptidos antimicrobianos, histonas, enzimas lisosomales, lipopolisacáridos, proteínas de reconocimiento a glucanos), sistema profenoloxidasas, y la cascada de coagulación que favorece la destrucción de los patógenos (Zhen-Ming, Liu, Zhao & Peng 2010).

Microorganismos y/o sus derivados (lipopolisacáridos, péptidoglicanos, laminarina, y β -glucano) han sido empleados para activar el sistema inmune de los camarones y entender los mecanismos de funcionamiento del mismo (Vici, Bright, Sing & Bhat 2000). El suministro de estos productos con el alimento o aplicados en forma directa (inyección, inmersión, bio-encapsulación, o intubación) sugiere que pueden ser usados como una medida de protección en contra de los patógenos que afectan al camarón (Robles, Sorgeloos, Van Duffel & Nelis 1998).

Levaduras como *Candida sake*, *C. tropicalis*, *Debaryomyces hansenii*, *Rhodotorula rubra*, *R. glutinis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizophyllum commune* han sido empleadas como activadores del sistema inmune de camarón (*Fenneropenaeus indicus*, *Penaeus monodon*) y peces (*Channa striata*, *Sparus aurata*) en contra de agentes patógenos. (Reyes-Becerril,

Campa-Córdova, A. *et al.* 2010. Respuesta inmune y antioxidante en camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, expuesto a inmunoestimulantes y probióticos. En: Cruz-Suarez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J. (Eds), Avances en Nutrición Acuícola X - Memorias del Décimo Simposio Internacional de Nutrición Acuícola, 8-10 de Noviembre, San Nicolás de los Garza, N. L., México. ISBN 978-607-433-546-0. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México, pp. 567-587.

Tovar-Ramirez, Ascencio-Valle, Civera-Cerecedo, Gracia-López & Barbosa-Solomieu 2008; Sukumaran, Williams, Sajeevan & Rosamma 2010).

Muchos mecanismos de defensa celulares en los crustáceos dependen de la producción controlada de radicales libres durante la fagocitosis y encapsulación (Muñoz, Cedeno, Rodriguez, Knaap, Mialhe & Bachere 2000). Como respuesta al estrés oxidativo al que pueden estar expuestos los organismos, el metabolismo aerobio de los crustáceos genera sustancias reactivas al oxígeno que son eliminadas por un sistema de defensa antioxidante que incluye a la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), y peroxidasa (Muñoz *et al.* 2000).

El presente estudio se enfocó en la medición de la respuesta oxidativa y antioxidante en el camarón blanco, para determinar si estos compuestos pueden ser utilizados como indicadores de la activación del sistema inmune del camarón en respuesta a componentes de la pared celular de microorganismos como β -glucanos, lipopolisacáridos, así como de microorganismos patógenos (vivas o muertas) y probióticos.

Materiales y Métodos

Cepas de microorganismos e inmunoestimulantes

Las cepas experimentales fueron obtenidas de la colección de levaduras del Centro Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), siendo dos cepas de levaduras aisladas de medio marino [*Debaryomyces hansenii* (DH5 y DH6)] y una cepa aislada de cítricos [*D. hansenii* (LL1)] seleccionadas para este trabajo. El β -1,6 glucano fue obtenido de *Saccharomyces cerevisiae* (Biotec Mackzymal, Tromsø), el polisacárido sulfatado (PS) de la cianobacteria *Cyanothece* sp. cepa PE 14 (De Philippis *et al.* 1998) y β -1,3 glucano (laminarina), procedente de *Laminaria digitata* (Sigma, L-9634). La cepa de *Vibrio parahaemolyticus* fue amablemente donada por la Dra. Carmen Amaro de la Colección Española de Cultivos Tipo.

Campaña Científica, 1998. La respuesta inmune y antioxidante en camarón blanco. Dependencia de factores, cepas e inmunoestimulantes y probióticos. En: Cruz-Suarez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J. (Eds), Avances en Nutrición Acuícola X - Memorias del Décimo Simposio Internacional de Nutrición Acuícola, 8-10 de Noviembre, San Nicolás de los Garza, N. L., México. ISBN 978-607-433-546-0. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México, pp. 567-587.

Bioensayos

Exposición de *L. vannamei* a β -1,6 glucano, polisacárido sulfatado y *V. parahaemolyticus*.

Se utilizaron juveniles de *L. vannamei* (10.0 ± 0.2 g) en grupos de 25 camarones en tanques de fibra de vidrio de 200 l. Un grupo de camarones fue inmerso en β -1,6 glucano a una concentración de 0.5 mg/l (Song & Hsieh 1994) y otro grupo en PS a una concentración de 1 μ g/ml, los grupos experimentales fueron inmersos en los tratamientos durante 1, 3 y 6 h. Otro grupo de camarones fue inmerso durante 1 h en una concentración de 1×10^7 UFC/ml de *V. parahaemolyticus*. Posteriormente, se realizó un recambio de agua de 100% a todos los tratamientos. El grupo control consistió en colocar camarones libres de tratamientos. El bioensayo se realizó por triplicado, se tomaron al azar 3 camarones a las 1, 24, 48, 72 y 120 h posteriores al reto con los inmunoestimulantes. Se tomaron muestras de hemolinfa de cada camarón y 2.0 g de tejido muscular y se almacenaron a -80°C .

Exposición de *L. vannamei* a probióticos

Se usaron camarones juveniles de *L. vannamei* (8 ± 0.2 gr) provenientes del laboratorio de larvicultura del CIBNOR. Los organismos fueron distribuidos en grupos al azar en contenedores de fibra de vidrio de 60 L (34 x 55 x 38 cm) (7 Org. c/u = 84 Org. totales) con suministro continuo de aire y agua de mar filtrada (5 μ) a 28°C . Después del recambio de agua, los organismos fueron expuestos a los diferentes tratamientos experimentales durante 15 días mediante la aplicación respectiva de levadura en el agua de cultivo, siendo las dosis suministradas las siguientes: DH5 y DH6 a 1×10^4 o 1×10^6 UFC/ml (Reyes-Becerril *et al.* 2008) y laminarina (LAM) a 0.20 mg/ml. El grupo control consistió de organismos no expuestos a la levadura. Los tratamientos permanecían en el agua marina del contenedor hasta el próximo recambio de agua. Otro grupo de camarones fue expuesto a la cepa LL1 a

Campa-Córdova, A.*et al.* 2010. Respuesta inmune y antioxidante en camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, expuesto a inmunoestimulantes y probióticos. En: Cruz-Suarez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J. (Eds), Avances en Nutrición Acuícola X - Memorias del Décimo Simposio Internacional de Nutrición Acuícola, 8-10 de Noviembre, San Nicolás de los Garza, N. L., México. ISBN 978-607-433-546-0. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México, pp. 567-587.

1×10^4 , 1×10^5 o 1×10^6 UFC/ml (Reyes-Becerril *et al.* 2008) y LAM a 0.20 mg/ml. Las dosis de levadura y laminarina fueron aplicadas de la forma antes descrita.

Parámetros biológicos de la hemolinfa

Se evaluaron diferentes parámetros fisiológicos en la hemolinfa de los organismos tratados y controles, siendo estos parámetros los siguientes: conteo total de hemocitos (CTH), actividad de SOD y CAT. La hemolinfa de los camarones (1.0 mL) fue obtenida por medio de la punción del primer segmento abdominal con la ayuda de una jeringa con anticoagulante (450 mM NaCl, 10 mM KCl, 10 mM EDTA- Na_2 , 10 mM HEPES, pH 7.3, 850 mOsm/kg)(Campa-Córdova, Hernández-Saavedra, Philippis & Ascencio 2002).

Conteo total de hemocitos (CTH)

El CTH se realizó conforme a lo descrito por Campa-Córdova *et al.* (2002) en donde a 100 μL de hemolinfa con anticoagulante se le aplican 400 μL de formaldehído al 4%, siendo los hemocitos cuantificados posteriormente en una cámara Neubauer y un microscopio óptico.

Cuantificación de proteína (CP)

La CP en los hemocitos provenientes de la hemolinfa (mg/mL) se determinó en un lector de placa y una prueba de micro-determinación de proteína (Bio-Rad, USDA) realizándose la lectura a una absorbancia de 595 nm (Miles, Polchana, Lilley, Kanchanakhan, Thompson & Adams 2001). Se efectuó una curva a partir de los reactivos estándares que posee la prueba antes señalada.

Actividad de la superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT).

La SOD se determinó por el método descrito por Reyes-Becerril *et al.* (2008) utilizando NBT en presencia de riboflavina. Se colocaron 10 μL v/v de hemolinfa y buffer fosfatos de potasio (50 mM, pH 7.8) con 200 μL de la mezcla de reacción (0.1 mM EDTA, 13 μM metionina, 0.75 mM NBT, 20 μM riboflavina, 50 mM buffer de fosfatos, pH 7.8). Esta solución fue expuesta a luz fluorescente (1 min) o cuando el control lograra una densidad óptica de 0.2-0.25 a 570 nm. iv.- La CAT se evaluó por el método de Reyes-Becerril *et al.* (2008) utilizando un kit comercial (Sigma # C-9284). El método determina el decremento de la concentración de peróxido de hidrógeno a una longitud de onda de 240 nm y un coeficiente de extinción de $40 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Se consideró que una unidad de CAT descompone 1 μmol de $\text{H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1}$ in 50 mM de buffer fosfato a pH 7 ajustando la absorbancia de la solución a 0.5 ± 0.01 . La actividad de CAT fue expresada en términos de unidades (μmoles de sustrato transformado a producto min^{-1}) por miligramo de proteína.

Análisis Estadísticos

Los datos obtenidos durante la realización de los bioensayos fueron analizados por análisis de varianza (ANOVA) seguido de una prueba de Tukey con el software Statistica (Versión 6.0).

Resultados

La respuesta inmune de los camarones tratados con *V. parahaemolyticus* vivo fue más rápida que con β -glucano y polisacárido sulfatado (Fig. 1), pues alcanzó un valor de 1.5 veces mayor que el control al tiempo 0 y su máximo valor se obtuvo a las 24 h posteriores al reto (2.0 veces). La exposición de los camarones a *V. parahaemolyticus* durante 1 hora, no causó mortalidad en los organismos durante el experimento.

Campa-Córdova, A. *et al.* 2010. Respuesta inmune y antioxidante en camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, expuesto a inmunoestimulantes y probióticos. En: Cruz-Suarez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J. (Eds), Avances en Nutrición Acuícola X - Memorias del Décimo Simposio Internacional de Nutrición Acuícola, 8-10 de Noviembre, San Nicolás de los Garza, N. L., México. ISBN 978-607-433-546-0. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México, pp. 567-587.

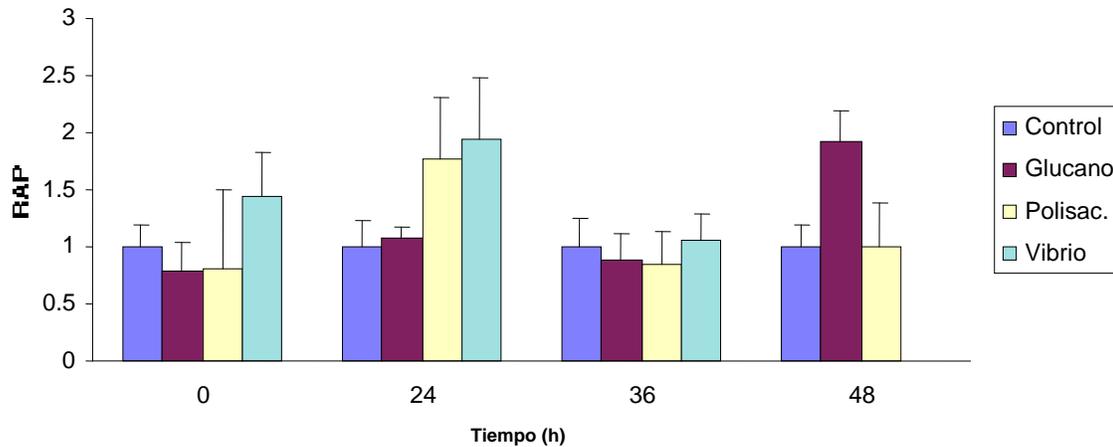


Figura 1. Producción de anión superóxido en hemocitos de camarón blanco expuestos durante 1 h a inmunoestimulantes y *V. parahaemolyticus* vivo. (*) Denota diferencias significativas respecto al control ($p < 0.05$).

En la figura 2 se muestra la producción de anión superóxido en hemocitos de camarón blanco expuestos a β -1,6 glucano durante 6 h (Glucano) y a una segunda exposición a las 24 h de cultivo (Glucano 2E). Se comparó la respuesta oxidativa entre los hemocitos activados con β -glucano en una sola ocasión (a las 0 horas) y con doble activación (0 y 24 horas), obteniendo que ambos protocolos presentaron dos incrementos respecto al grupo control, a las 24 y 48 horas después de 6 horas de inmersión en el tratamiento (Fig. 2).

La generación de anión superóxido se incrementó entre 1.5 y 2.0 veces más que la respuesta generada por el grupo control de camarones. Este incremento se obtuvo entre las 24 y 48 horas después de la inmersión en los tratamientos (Fig. 2). La exposición de los organismos al β -glucano y polisacárido sulfatado durante 1 h, generó la máxima respuesta oxidativa entre las 24 y 48 horas post-reto (Fig. 1). La exposición al β -glucano durante 6 horas, nos permitió observar dos incrementos en la producción de anión superóxido respecto al grupo control, a las 24 y 48 horas post-reto (Fig. 2).

Campa-Córdova, A. *et al.* 2010. Respuesta inmune y antioxidante en camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, expuesto a inmunoestimulantes y probióticos. En: Cruz-Suarez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J. (Eds), Avances en Nutrición Acuícola X - Memorias del Décimo Simposio Internacional de Nutrición Acuícola, 8-10 de Noviembre, San Nicolás de los Garza, N. L., México. ISBN 978-607-433-546-0. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México, pp. 567-587.

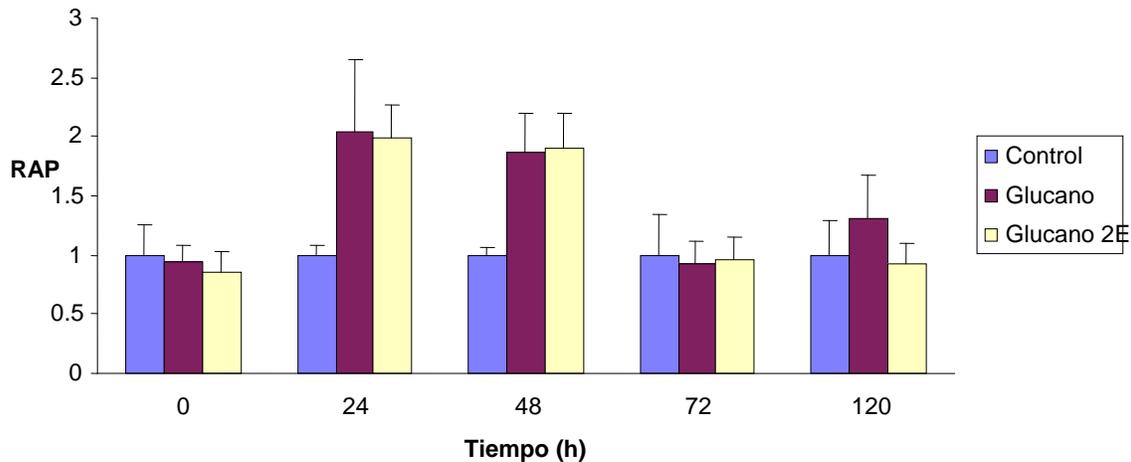


Figura 2. Producción de anión superóxido en juveniles de camarón blanco, *L. vannamei*, expuestos durante 6 h a β -1,6 glucano y a una segunda exposición a las 24 h de cultivo (Glucano 2E). (*) Denota diferencias significativas respecto al control ($p < 0.05$).

Para la determinación de la actividad de la enzima Mn-SOD en hemocitos, se sumergieron los organismos durante 6 h en β -glucano (Fig. 3). Al igual que en la determinación de anión superóxido, durante este experimento se comparó el efecto entre una sola exposición al β -glucano (0 h) y dos exposiciones (una a las 0 h y otra a las 24 h siguientes al primer reto), encontrándose que a las 0 horas se registró la actividad más alta de la enzima en los camarones tratados respecto a los controles (1.4 veces). A las 24 horas después del reto, la actividad de la Mn-SOD alcanzó valores similares a los del grupo control y disminuyó significativamente ($p < 0.05$) a las 72 horas (Fig. 3).

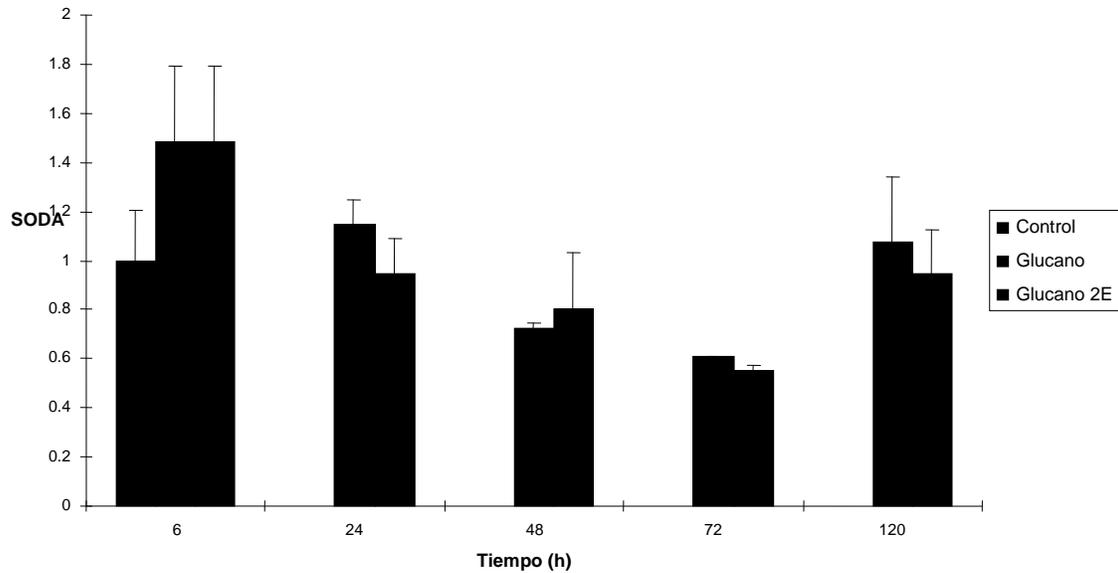


Figura 3. Actividad de la Enzima Mn-SOD en hemocitos de camarón blanco, *L. vannamei*, expuestos durante 6 h a β -1,6 glucano y una exposición posterior a las 24 h. (*) denota diferencias significativas respecto al control ($p < 0.05$).

El incremento en los hemocitos circulantes se obtuvo a las 72 h posteriores al reto utilizando una o doble activación con β -glucano (Fig. 4). Utilizando doble activación con β -glucano, se registró un incremento más temprano (72 h) que utilizando una sola activación (120 h), pero alcanzando la activación sencilla (a las 120 h), incrementos (1.9 veces) respecto al control.

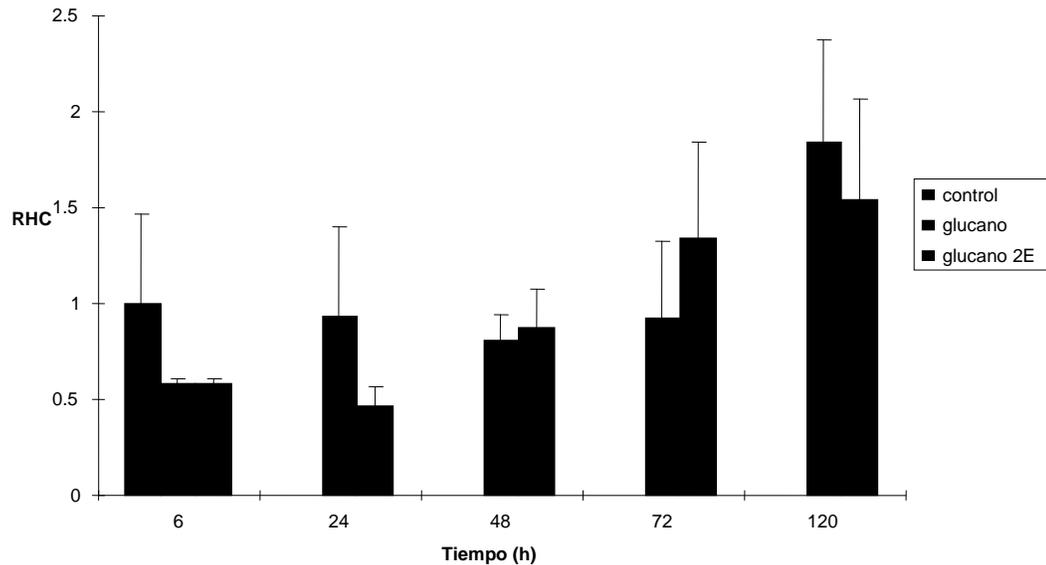


Figura 4. Conteo de hemocitos circulantes (CTH) en juveniles de camarón blanco, *L. vannamei* expuestos durante 6 h a β -1,6 glucano y una exposición posterior a las 24 h. (*) denota diferencias significativas respecto al control ($p < 0.05$).

La exposición diaria de juveniles de camarón blanco a 3 cepas probióticas de levaduras marinas (*Debaryomyces hansenii*, cepa DH5, DH6 y LL1) durante 15 días registró un incremento significativo ($p < 0.05$) en hemocitos circulantes en los tratamientos con las cepas DH6 (14×10^6 hemocitos/ml) y LL1 (6×10^6 hemocitos/ml) de *D. hansenii* utilizando una dosis de 1×10^6 UFC/ml comparada con los grupos controles ($3-5 \times 10^6$ hemocitos/ml). La Laminarina y la otra cepa y/o dosis de levadura no generaron efectos significativos diferentes de CTH comparados con los respectivos grupos controles (Figs. 5 y 6).

*

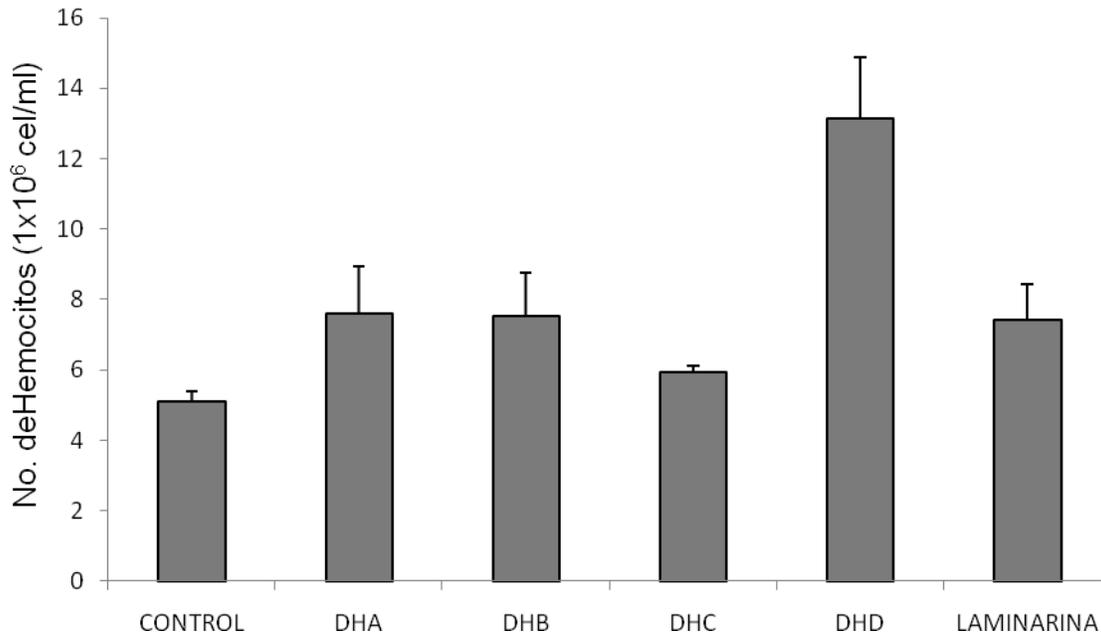


Figura 5. Conteo Total de Hemocitos Circulantes (CTH) en juveniles de camarón blanco *L. vannamei* expuestos durante 15 días a *Debaryomyces hansenii* y a un inmunoestimulante comercial (Laminarina). DHA: cepa DH5, concentración 1×10^4 UFC/ml; DHB: cepa DH5, concentración 1×10^6 UFC/ml; DHC: cepa DH6, concentración 1×10^4 UFC/ml; DHD: cepa DH6, concentración 1×10^6 UFC/ml; LAMINARINA: concentración 0.05mg/ml.

(*) Denota diferencias significativas respecto al control ($p < 0.05$).

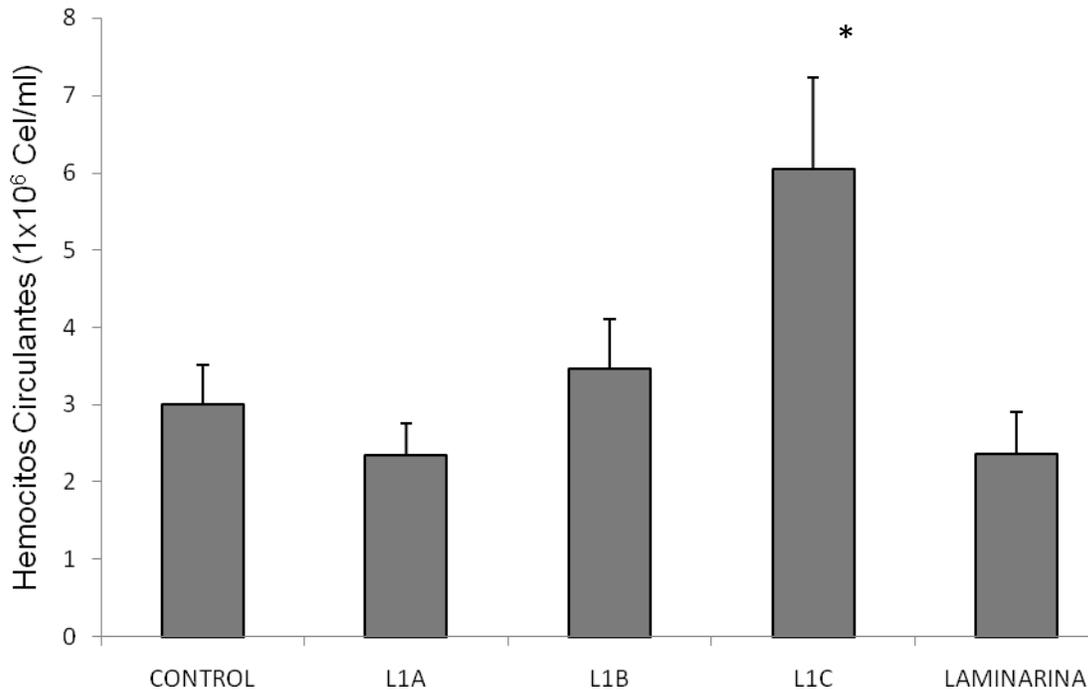


Figura 6. Conteo Total de Hemocitos Circulares (CTH) en juveniles de camarón blanco *L. vannamei* expuestos durante 15 días a 3 concentraciones diferentes de la levadura, *Debaryomyces hansenii*, cepa LL1 y a un inmunoestimulante comercial. L1A: 1×10^4 UFC/ml; L1B: 1×10^5 UFC/ml; L1C: 1×10^6 UFC/ml, LAMINARINA: 0.05mg/l. (*) Denota significativas respecto al control ($p < 0.05$).

Actividad de la superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT).

La Figura 7 muestra la actividad SOD de hemocitos de *L. vannamei* expuestos a *Debaryomyces hansenii*, cepas DH5 y DH6 utilizando concentración de levadura de 1×10^5 y 1×10^6 UFC/ml. El tratamiento con laminarina muestra valores significativamente superiores (45.86 U/mg) comparados con el grupo control (35.29 U/mg). Contrariamente, los organismos expuestos a la dosis de 1×10^4 UFC/ml de DH5 muestran valores significativamente inferiores ($p < 0.05$) comparados con el grupo control (Fig. 7). La

Campa-Córdova, A. *et al.* 2010. Respuesta inmune y antioxidante en camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, expuesto a inmunoestimulantes y probióticos. En: Cruz-Suarez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J. (Eds), Avances en Nutrición Acuícola X - Memorias del Décimo Simposio Internacional de Nutrición Acuícola, 8-10 de Noviembre, San Nicolás de los Garza, N. L., México. ISBN 978-607-433-546-0. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México, pp. 567-587.

actividad CAT de hemocitos de *L. vannamei* muestra un patrón similar al observado con la actividad de SOD, con los mismos puntos de relevancia (Fig. 8).

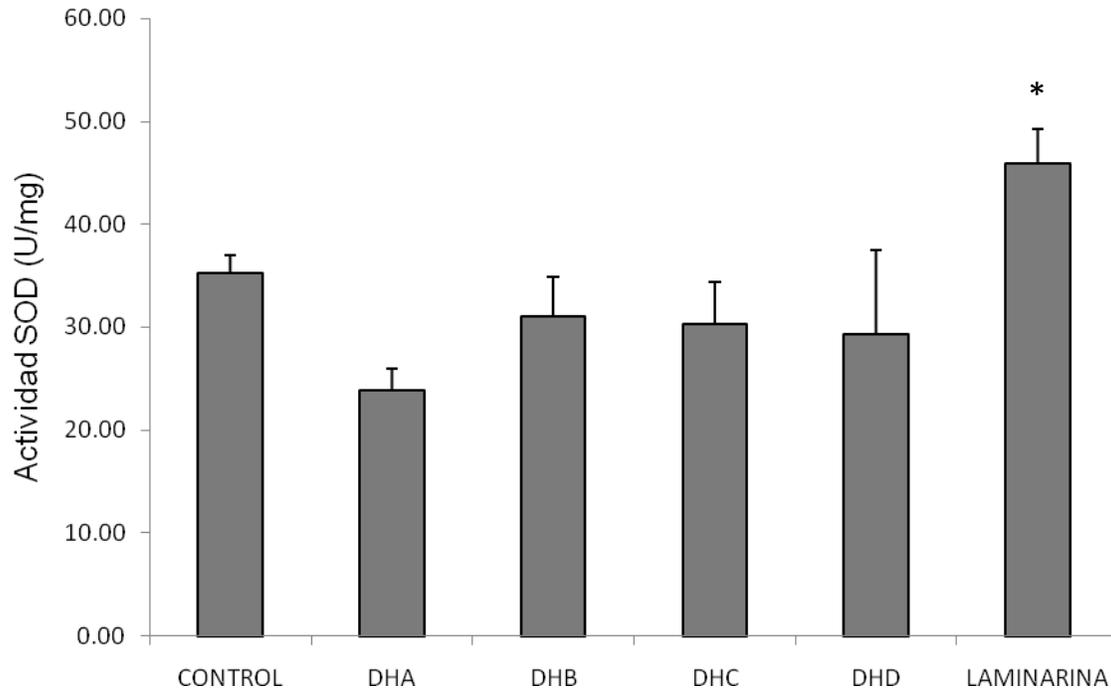


Figura 7. Actividad SOD en hemocitos de juveniles de camarón blanco *L. vannamei* expuestos durante 15 días a *Debaryomyces hansenii* y a un inmunoestimulante comercial (Laminarina). DHA: cepa DH5, concentración 1×10^4 UFC/ml; DHB: cepa DH5, concentración 1×10^6 UFC/ml; DHC: cepa DH6, concentración 1×10^4 UFC/ml; DHD: cepa DH6, concentración 1×10^6 UFC/ml; LAMINARINA: concentración 0.05mg/ml.

(*) Denota diferencias significativas respecto al control ($p < 0.05$).

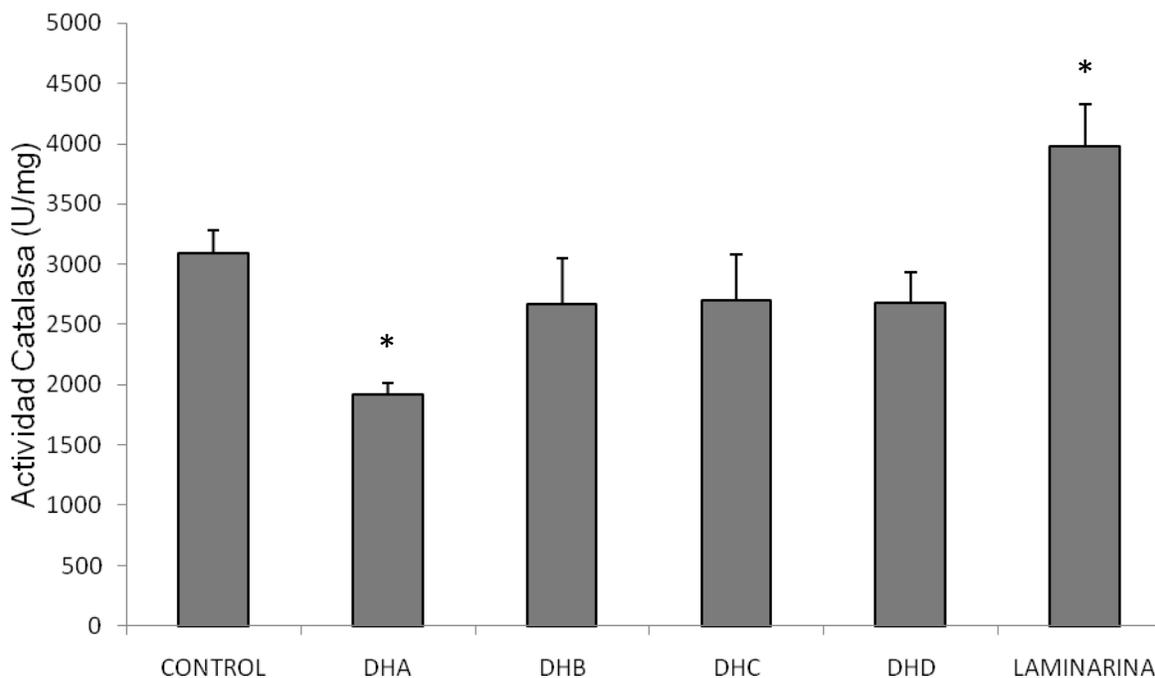


Figura 8. Actividad catalasa en hemocitos de juveniles de camarón blanco *L. vannamei* expuestos durante 15 días a *Debaryomyces hansenii* y a un inmunoestimulante comercial (Laminarina). DHA: cepa DH5, concentración 1×10^4 UFC/ml; DHB: cepa DH5, concentración 1×10^6 UFC/ml; DHC: cepa DH6, concentración 1×10^4 UFC/ml; DHD: cepa DH6, concentración 1×10^6 UFC/ml; LAMINARINA: concentración 0.05mg/ml.

(*) Denota diferencias significativas respecto al control ($p < 0.05$).

Discusión

El entendimiento de la función de los hemocitos es importante en la investigación del sistema de defensa de crustáceos, particularmente la capacidad para generar respuestas oxidativas y antioxidantes (Roch, 1999) y así poder caracterizar las funciones inmunes básicas en nuevas especies de estudio.

Debido a que el O_2^- es el primer producto liberado de la respiración, la medición del O_2^- ha sido aceptado como un método confiable para la cuantificación de la intensidad respiratoria (Song & Hsieh 1994).

La producción de anión superóxido por los hemocitos expuestos al β -glucano y polisacárido sulfatado, se incrementó entre 1.5 y 2.0 veces más, que la generada por el grupo control. Las condiciones particulares de cultivo y las condiciones fisiológicas del camarón pueden causar diferencias en la capacidad de la respuesta oxidativa (Shuhong, Yilei, Zhaoxia, Jack, Zhaohong, Zhihua & Ziping 2004).

Aunque la dosis de polisacárido sulfatado fue 500 veces más baja que la del β -glucano, la respuesta inmune de los hemocitos y de las células del músculo fue similar en ambos tratamientos.

Comparando la capacidad oxidativa de los hemocitos con el tiempo de inmersión (1,3 o 6 horas) en los inmunoestimulantes, hubo una respuesta 2.0 veces mayor que la obtenida en el grupo control. Song & Hsieh (1994) reportaron resultados similares en hemocitos de *P. monodon* después de sumergir a los organismos durante 3 h en β -glucano.

Al exponer a los organismos durante 6 horas en β -glucano, se observaron dos incrementos en la generación de anión superóxido de hemocitos, a las 24 y 48 horas después del reto. Karunasagar, Otta, Devaraj, Shubha & Iddya (1999) utilizó β -1,3 glucano en *P. monodon*, encontrando un pico en la producción de ROI a las 48 horas posteriores a la administración oral. En nuestro estudio, encontramos un pico en la generación de anión superóxido entre las 24 y las 48 horas posteriores a la inmersión en los tratamientos, la cual dependió del tipo de tratamiento suministrado.

En el presente estudio, el incremento en la capacidad respiratoria (Sung *et al.*, 1994; Muñoz *et al.*, 2000) entre las 24 y 48 h y en los niveles antioxidantes en los hemocitos estimulados (dentro de las primeras 24 h), es considerada ser una respuesta a los cambios en la composición lipídica de las membranas celulares, y de mejorar la producción de factores de activación celular como citocinas y chaperoninas, quienes pueden mejorar la capacidad fagocítica de los hemocitos (Sajeevan *et al.* 2006). Por tal motivo, se espera que el incremento en los niveles oxidantes y antioxidantes en las células, como consecuencia de una exposición previa del camarón blanco a inmunoestimulantes, generen una respuesta inmune mas fuerte contra los patógenos potenciales (Downs *et al.*, 2001).

Este estudio no explora cuanto tiempo se mantiene la respuesta oxidativa en camarón como respuesta a una activación con inmunoestimulantes. Sung, Kou & Song (1994) demostró que la supervivencia de *P. monodon* puede ser mejorada cuando es activada (3 horas de inmersión con glucano) 18 días antes del reto con *V. vulnificus*.

En un estudio con camarón, Itami, Takahashi & Nakamura (1989) compararon la eficiencia de 3 formas diferentes de administración del *Vibrio. spp* muerto por formol. Encontraron que por inyección, aspersión e inmersión, se observó protección contra infecciones experimentales de *Vibrio. spp*. Algunos autores han reportado que la administración de inmunoestimulantes por inmersión puede mejorar la respuesta inmune en camarón (Itami, Asano, Tokushige, Kubono, Nakagawa, Takeno, Nishimura, Maeda, Kondo, & Takahashi 1998; Alabi, Jones, & Latchford 1999).

Las superóxido dismutasas son una de las principales rutas de defensa antioxidante en respuesta a estrés oxidativo (Guertler, Barracco, Perazzolo 2010). El incremento en la actividad de la SOD en adultos de *P. vannamei* después del reto, se registró más temprano en hemocitos (6h) que en músculo (24h). Macmillan-Crow (2000) sugirió que la inhibición

de la actividad de la Mn-SOD por peroxinitrito puede estar relacionada con numerosos estados de enfermedad.

El incremento en THC está relacionado con el estatus nutricional del camarón. Le Moullac, Rodriguez, Saulnier, Cuzon & Chim (1999) encontraron un incremento significativo en peso alimentando al camarón con una dieta conteniendo 54% de proteína comparada con una dieta conteniendo 38%. La resistencia del camarón a la infección generada por *V. penaeicida* fue mejorada entre el 5-30%.

Las levaduras son hongos unicelulares que han llamado la atención por su potencial para ser usando en la obtención de bio-productos tales como enzimas, toxinas, glucanos, etc. Los inmuno-estimulantes por su parte son productos extraídos de las paredes de bacterias Gram negativas y/o positivas, hongos, y algas (glucanos, lipopolisacáridos, péptidoglicanos, etc.) y los cuales tienen la cualidad de activar al sistema inmune no específico (Reyes-Becerril *et al.* 2008). Sajeevan, Rosamma, Bright-Singh (2009) observó que las células completas de levaduras le proporcionaron a *F. indicus* un mayor CHT que el a uso de productos purificados (glucanos). Esto sugiere que las células completas pueden tener otros elementos que fortalezcan la respuesta inmune (aminoácidos, vitaminas, minerales). En el presente trabajo se observó un aumento en los hemocitos circulantes de camarones cuando estos fueron expuestos a *D. hansenii* a una dosis de 1×10^6 UFC/ml y muestra también cómo diferentes cepas de una misma especie de levadura puede generar resultados diferentes en el proceso de incrementar el CTH de los camarones de *L. vannamei*. Las levaduras han sido usadas como un activadores, moduladores y fortificadores del sistema inmune en diversos organismos debido a la presencia de b-glucanos, mananoligosacáridos y otros componentes de la pared celular. Esto sugiere la posibilidad de usar estos microorganismos como inmuno-estimulantes y fuente de bio-productos empleados para ese fin en acuicultura (Zhen-Ming *et al.*, 2010).

D. hansenii has sido reportada como una fuente importante de enzima SOD (Reyes-Becerril *et al.* 2008). En nuestro estudio, los camarones tratados con laminarina incrementó la actividad de esta enzima, contrariamente a lo esperado, pues generó un resultado más alto de SOD y CAT que la los camarones tratados con levadura. Guertler *et al.* (2010) señalan que la aplicación de laminarina en *Astacus astacus*, *F. paulensis*, *L. schmitti*, *L. vannamei* generó la activación de moléculas asociadas al sistema inmune de este organismo y los niveles de SOD. Resulta interesante que la SOD y la CAT muestren comportamientos muy similares, revelando la gran relación que existe entre estos dos componentes del sistema inmune.

Los resultados obtenido en la presente investigación sugieren que algunas cepas de *D. hansenii* pueden ser empleadas para incrementan la proliferación de hemocitos circulantes en juveniles de camarón blanco e incrementan la actividad antioxidante (SOD y CAT). Sin embargo, mayores estudios son necesarios para entender los procesos relacionados al sistema inmune de camarón. Técnicas como las desarrolladas por biología molecular en tiempo real (RT-PCR), proteómica pueden brindar mayores indicios y pueden ayudar a encontrar nuevas medidas para disminuir la proliferación de enfermedades y aumentar la supervivencia y producción de camarón.

Referencias bibliográficas

- Aguirre-Guzmán G, Sánchez-Martínez J.G, Campa-Córdova A.I, Luna-González A, Ascencio F. (2009) Penaeid shrimp immune system: A Minireview. *Thai Journal of Veterinary and Medicine* **39**, 205-215.
- Alabi, A. O., Jones, D. A. & Latchford, J. W. (1999) The efficacy of immersion as opposed to oral vaccination of *Penaeus indicus* larvae against *Vibrio harveyi*. *Aquaculture* **178**, 1-11.
- Campa-Córdova A.I., Hernández-Saavedra N.Y., Philippis R. De, Ascencio F. (2002) Generation of superoxide anion and SOD activity in haemocytes and muscle of American white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) as a response to β -glucan and sulphated polysaccharide. *Fish & Shellfish Immunology* **12**, 353-366.
- Downs C., Fauth J. E. & Woodley C. M. (2001). Assessing the health of grass shrimp (*Palaeomonetes pugio*) exposed to natural and anthropogenic stressors: a molecular biomarker system. *Marine Biotechnology* **3**, 380-397.
- Guertler C., Schleder D.D., Barracco M.A., Perazzolo L.M. (2010) Comparative study of the intracellular superoxide anion production in different penaeid species through the NBT-reduction assay. *Aquaculture Research* **41**, 1082-1088.
- Itami T., Takahashi Y. & Nakamura Y. (1989) Efficacy of vaccination against vibriosis in cultured kuruma prawns *Penaeus japonicus*. *Journal of Aquatic Animal Health* **1**, 238-242.
- Itami T., Asano M., Tokushige K., Kubono K., Nakagawa A., Takeno N., Nishimura H., Maeda M., Kondo M. & Takahashi Y. (1998) Enhancement of disease resistance of kuruma shrimp, *Penaeus japonicus* after oral administration of peptidoglycan derived from *Bifidobacterium thermophilum*. *Aquaculture* **164**, 277-288.
- Karunasagar I., Otta S. K., Devaraj T. N., Shubha G. & Iddya K. (1999) Immunostimulation of *Penaeus monodon* through the oral route. *Workshop: Shrimp immunity and disease control*. Thailand.
- Le Moullac G., Rodriguez J., Saulnier D., Cuzon G. & Chim L. (1999) Immunomodulation: nutritional aspects and immunostimulation. *IFREMER-Aquacop, Taravao, Tahiti. CENAIM-ESPOL, Guayaquil, Ecuador. Forum*.
- Macmillan-Crow L. A. (2000) Role of Mn-SOD in mitochondria: inactivation by peroxynitrites. *International Society of Antioxidants in Nutrition & Health. The second International Conference on Superoxide Dismutases*. Institut Pasteur, Paris.

- Miles D.J.C., Polchana J., Lilley J.H., Kanchanakhan S., Thompson K.D. & Adams A. (2001) Immunostimulation of striped snakehead *Channa striata* against epizootic ulcerative syndrome. *Aquaculture* **195**, 1–15.
- Muñoz M., Cedeno R., Rodriguez J., Knaap W.P.W., Mialhe E. & Bachere E. (2000) Measurement of reactive oxygen intermediate production in haemocytes of penaeid shrimp, *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* **191**, 89-107.
- Reyes-Becerril M., Tovar-Ramirez D., Ascencio-Valle F., Civera-Cerecedo R., Gracia-López V. & Barbosa-Solomieu V. (2008) Effects of dietary live yeast *Debaryomyces hansenii* on the immune and antioxidant system in juvenile leopard grouper *Mycteroperca rosacea* exposed to stress. *Aquaculture* **280**, 39–44.
- Roch P. (1999). Defense mechanisms and disease prevention in farmed marine invertebrates. *Aquaculture* **172**, 125-145.
- Robles R., Sorgeloos P., Van Duffel H. & Nelis H. (1998) Progress in biomedication using live foods. *Journal of Applied Ichthyology* **14**, 207-212.
- Sajeevan T.P., Rosamma P., Bright-Singh I.S. (2006) Immunostimulatory effect of a marine yeast *Candida sake* S165 in *Fenneropenaeus indicus*. *Aquaculture* **257**, 150–155.
- Shuhong, W., Yilei W., Zhaoxia Z., Jack R., Zhaohong W., Zhihua Z. & Ziping Z. (2004) Response of innate immune factors in abalone *Haliotis diversicolor supertexta* to pathogenic or nonpathogenic infection. *Journal of Shellfish Research* **23**(4), 1173-1178.
- Song Y. L. & Hsieh Y. T. (1994) Immunostimulation of tiger shrimp (*Penaeus monodon*) hemocytes for generation of microbicidal substances: analysis of reactive oxygen species. *Developmental & Comparative Immunology* **18**, 201-209.
- Sukumaran V., Williams D.L., Sajeevan T.P. & Rosamma P. (2010) Marine yeast glucans confer better protection than that of baker's yeast in *Penaeus monodon* against white spot syndrome virus infection. *Aquaculture Research* in press.
- Sung H. H., Kou G. H. & Song L. (1994). Vibriosis resistance induced by glucan treatment in tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Fish Pathology* **29**, 11-17.
- Vici V., Bright Sing I.S., Bhat S.G. Application of bacterins and yeast *Acremonium dyosporii* to protect the larvae of *Macrobrachium rosenbergii* from vibriosis. *Fish Shellfish Immunol* 2000; 10:559-563.
- Zhen-Ming C., Liu G., Zhao S., Li J. & Peng Y. (2010) Marine yeasts as biocontrol agents and producers of bio-products. *Applied Microbiology and Biotechnology* **86**, 1227–1241.