

Efecto de la calidad de la dieta sobre la respuesta inmune del camarón *Penaeus vannamei*.¹

Jenny Rodríguez, Ricardo Cedeño, César Molina, Víctor Otero, Ernesto Valenzuela y María Auxiliadora Sotomayor

Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas (CENAIM). Campus Politécnico Km. 30.5 vía Perimetral. P.O.BOX. 09-01-4519. Fax. 593(4)269492. jrodrigu@cenaim.espol.edu.ec

RESUMEN: Los conocimientos adquiridos en inmunología de vertebrados, señalan a las carencias nutricionales como el factor externo más importante de inmunodeficiencias. Dos bioensayos de similar diseño se realizaron para evaluar el efecto de dietas de diferente calidad sobre la respuesta inmune del camarón *Penaeus vannamei* e identificar marcadores de salud y/o del estado nutricional de los animales. Se encontró que la calidad de la dieta influyó sobre el número total de hemocitos, así como sobre la concentración de proteínas del plasma. Los efectores inmunitarios expresados globalmente en índices, mostraron una relación entre el índice más bajo y la más baja supervivencia. La llegada al continente americano del « White Spot Syndrome Virus » (WSSV) ha creado la necesidad de explorar todas las vías posibles para su control. En este sentido, La inmunomodulación del camarón se presenta como una alternativa. Un aspecto fundamental de la inmunomodulación concierne a la inmunoestimulación, entendiéndose como tal, a la excitación del sistema inmune en animales sin carencias nutricionales. Cuatro dosis de β -glucanos fueron ensayadas, encontrándose las mejores dosis en 75 y 100 ppm. En los animales que recibieron 75 ppm se observó menor carga de WSSV que en aquellos del control, que tan solo recibieron la dieta base.

PALABRAS CLAVE: Marcadores inmunitarios, inmunomodulación, nutrición, β -glucanos

INTRODUCCION

La sustentabilidad del cultivo del camarón, depende en gran medida de la prevención y el control de enfermedades. Desde este punto de vista el sistema inmune constituye un factor de radical importancia a tomarse en consideración. La estrategia seguida por algunos investigadores en este campo, ha sido aplicar los conocimientos fundamentales en inmunología de crustáceos a la elaboración de una metodología que permita evaluar el estado sanitario de los camarones en los estanques y eventualmente aplicar medidas profilácticas inmunomodulatorias que ayuden a atenuar el impacto de las patologías. Con esto en mente, el área de inmunología del CENAIM, ha trabajado en el desarrollo de protocolos simplificados de varios ensayos de inmunoevaluación, tomando en consideración diferentes efectores celulares y humorales del sistema de defensa del camarón. El objetivo ha sido contar con un set de pruebas que permitan identificar en *Penaeus vannamei* marcadores inmunitarios que puedan ser utilizados tanto como criterios de selección de camarones con mayor resistencia inmunitaria, o en controles sanitarios.

Los problemas virales tales como el WSSV, que han afectado la producción camaronera y para los cuales no existe la alternativa de los antibióticos, han tenido por efecto una reorientación de los

¹ Rodríguez, J., Cedeño, R., Molina, C., Otero, V., Valenzuela, E., Sotomayor, M.A., 2000. Efecto de la calidad de la dieta sobre la respuesta inmune del camarón *Penaeus vannamei*. In: Cruz -Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Olvera-Novoa, M.A. y Civera-Cerecedo, R., (Eds.). Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 19-22 Noviembre, 2000. Mérida, Yucatán, Mexico.

objetivos a corto plazo, incrementando el interés en la inmunomodulación como estrategia profiláctica para prevenir infecciones.

La inmunomodulación puede explorarse siguiendo diferentes vías, pero tal vez las más interesantes para iniciar un estudio de esta naturaleza sean dos: el estudio de la calidad de las dietas sobre el sistema inmune y la inmunoestimulación. En efecto los conocimientos adquiridos en inmunología de vertebrados señalan a las carencias nutricionales como el factor externo más importante de inmunodeficiencias. Por otra parte, la inmunoestimulación se presenta como una alternativa ante situaciones de riesgo epidemiológico, considerando que el camarón es un invertebrado y carece de especificidad y memoria inmunitaria, situación que imposibilita la vacunación.

El efecto protector de los inmunoestimulantes ha sido bien documentado en condiciones controladas de experimentación (Sung *et al.* 1994; Chang *et al.* 1999). Sin embargo, en términos prácticos su utilización en piscinas se ha acompañado de problemas de crecimiento, sin observarse en muchos casos un real efecto protector. Estas observaciones dejan suponer que la inmunoestimulación puede acompañarse de desgaste energético. Así, Scholz *et al.* (1998), Cedeño *et al.* (1999) reportaron que una inmunoestimulación excesiva en *P. vannamei* coincidió con estimulación de la actividad fenoxidasa (PO) y actividad antibacteriana, pero se acompañó no solo de pérdida de peso de los animales, sino también de reducción del número de hemocitos circulantes y de la concentración de proteínas plasmáticas. Todo esto en relación con la dosis de estimulante utilizada.

Nuestros objetivos a corto y mediano plazo en inmunomodulación, son poner en alerta el sistema inmune del camarón, sin que este estado de alerta se traduzca en un estado inflamatorio de difícil control fisiológico para el animal, situación que en la práctica ha demostrado producir resultados muy variables. La disponibilidad de herramientas de evaluación inmunitaria han ayudado a avanzar en este sentido, permitiendo monitorear parámetros inmunitarios susceptibles a modificaciones, tales como deficiencias nutricionales, o aquellas relacionadas a situaciones de alerta inmunitaria.

En este trabajo se describe nuestra experiencia en inmunomodulación. Presentamos evidencia de que diferencias en la calidad de la dieta se reflejarían en diferencias inmunitarias. Se presenta además resultados de inmunoestimulación oral con β -glucanos, en animales que recibieron una dieta base de buena calidad.

MATERIALES Y METODOS

1.- Pruebas de evaluación inmunitaria

Hemogramas:

El hemograma, es el número y proporción de tipos de hemocitos. Se determinó por conteo de las muestras con una cámara de Neubauer. Los conteos diferenciales de hemocitos se realizaron por observación de muestras frescas en un microscopio óptico provisto de contraste de fases (Muñoz, 1996). El número total de hemocitos (NTH) es expresado en millones de células por ml y la fórmula hemocitaria en porcentajes de tipos hemocitarios.

Cuantificación del anión superóxido (O₂⁻):

Este radical de oxígeno se cuantifica, por medio de la técnica de reducción del nitroblue-tetrazolium (NBT) según un protocolo optimizado por Muñoz *et al.* (“in press”). El choque respiratorio es un proceso oxidativo asociado a la fagocitosis, en el que varios radicales tóxicos de oxígeno son generados para destruir al patógeno invasor, que está siendo ingerido por las células inmunitarias. La producción de O₂⁻ es expresada en tasas, la tasa se obtiene dividiendo el valor de la absorbancia de la muestra estimulada para la fagocitosis, para el valor de la absorbancia de la misma muestra sin estimulación.

Actividad antibacteriana:

Se detecta y cuantifica por medio de un método turbidométrico (Tapia, 1996), cuyo principio se basa en la medición de la turbidez de suspensiones bacterianas en presencia o ausencia de plasma de camarón. La actividad antibacteriana (A.A) es expresada en porcentajes de inhibición del crecimiento bacteriano, el mismo que es calculado relacionando el valor en absorbancia obtenido a partir de las bacterias cultivadas en presencia de plasma contra el control negativo, constituido de bacterias cultivadas en presencia de una solución salina en lugar del plasma. El control negativo corresponde al 100 %, del crecimiento bacteriano.

Concentración de proteínas plasmáticas:

Paralelamente se realizó la cuantificación de proteínas plasmáticas (P.P), por medio del método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951), miniaturizado en microplacas (CENAIM), la concentración de proteínas es expresada en ug/ul.

Inmunodosificaciones:

La disponibilidad de anticuerpos monoclonales que reconocen factores plasmáticos (proteína de coagulación, aglutinina, α_2 macroglobulina (Rodríguez *et al.* 1995) ha permitido implementar protocolos de inmunodosificaciones ELISA de tipo dot-blot (Valenzuela, 1998, datos no publicados). Este ensayo es semicuantitativo ya que las manchas obtenidas para cada muestra son comparadas contra una escala colorimétrica a la cual se ha asignado arbitrariamente una categoría de valores que van de 0 a 4.

Cuantificación de la actividad fenoloxidasa (PO):

Este protocolo se basa en la reacción de una muestra de extracto hemocitario con laminarina (B glucanos solubles), en presencia de Ca⁺⁺. luego de un tiempo de incubación, en el que el enzima pro fenoloxidasa (proPO) inactiva pasa a PO activo, se añade el susbtrato cromogénico L-Dopa, el cual por acción del PO pasará a Dopacromo de coloración café. Luego de 10 minutos de reacción se realiza la lectura en el lector de microplacas a una longitud de onda de 490 nm (Leonard *et al.* 1985).

2. Ensayos del efecto de la calidad de la dieta sobre la respuesta inmunitaria

Se sometió en dos ocasiones, a una población de camarones a 3 dietas de diferente calidad. Se midió parámetros inmunitarios de los animales con la finalidad de estimar si las diferencias nutricionales se reflejaron en diferencias inmunitarias y evaluar que parámetro medido sería el más sensible a la calidad de la dieta.

Animales

Los camarones de 7 g fueron donados por la camaronera Fuentes (Palmar, provincia del Guayas, Ecuador). Se aclimataron en el CENAIM durante 10 días, antes de iniciar los bioensayos.

Diseño experimental

Los 2 bioensayos se realizaron con el mismo diseño experimental. Los camarones fueron distribuidos en 9 tanques rectangulares de 500 litros, en razón de 20 animales por tanque. Tanto los animales como los tratamientos aplicados fueron elegidos aleatoriamente.

Un grupo de camarones al que se denominó tiempo cero (T0) fueron evaluados, luego de los 10 días de aclimatación, antes del inicio de los bioensayos. Una vez iniciado el bioensayo los camarones fueron alimentados con una biomasa diaria del 4 % (peso seco) distribuida en dos raciones. Se ensayaron tres tratamientos alimenticios (tres réplicas para cada tratamiento).

Tratamiento 1 : Balanceado comercial conteniendo 22% de proteína

Tratamiento 2 : Balanceado comercial conteniendo 50% de proteína.

Tratamiento 3 : Alimento natural.

La única diferencia entre las dietas 1 y 2 fue el porcentaje de proteína. El tratamiento 3 estuvo constituido de una mezcla de varios organismos procesados y conservados según los procedimientos habituales en los departamentos de maduración de camarones progenitores.

Luego de 15 días de ensayo, los camarones fueron muestreados y evaluados con las pruebas inmunitarias: hemograma, cuantificación del anión superóxido, actividad antibacteriana, cuantificación de proteínas plasmáticas e inmunodificaciones con anticuerpos monoclonales. Además se registró la supervivencia.

3. Ensayo de Inmunoestimulación con b-glucanos

Animales

Los animales fueron adquiridos en la localidad de Palmar (Provincia del Guayas, Ecuador) y fueron aclimatados en el laboratorio durante 3 semanas, durante las cuales fueron alimentados con CENAIM 40 (C40), una dieta de calidad nutricional alta.

Diseño experimental

Luego del periodo de aclimatación, seiscientos animales de 8 g fueron distribuidos aleatoriamente en 20 tanques de 500 litros a razón de 30 animales por tanque, con recambio de agua continuo (300% diario). Se ensayaron 4 dosis de β -glucanos como aditivos del alimento base CENAIM 40. Estas dosis fueron seleccionadas luego de analizar los resultados de un ensayo exploratorio en el que se utilizaron 10 dosis, situadas en el rango citado por la bibliografía existente sobre el tema. El control constituyó el CENAIM 40 sin β -glucanos. A continuación se detallan las dosis de estimulante utilizadas:

Dieta A: CENAIM 40 (control)

Dieta B : CENAIM 40 más 52 ppm de β -glucanos totales
 Dieta C: CENAIM 40 más 78 ppm de β -glucanos totales
 Dieta D: CENAIM 40 más 104 ppm de β -glucanos totales
 Dieta E: CENAIM 40 más 154 ppm de β -glucanos totales

Los camarones fueron alimentados con las cinco dietas durante 24 días. El alimento fue administrado dos veces al día (09h00 y 17h00) a razón del 10% de la biomasa.

La extracción de la hemolinfa para los análisis inmunitarios, se realizó en animales en estadio C (intermuda), a los 3, 6, 12, 18 y 24 días de estimulación. Al terminar el bioensayo los animales de los tratamientos fueron pesados.

4. Diagnóstico para el virus de la mancha blanca (white spot syndrome virus, WSSV)

Los animales utilizados en el bioensayo fueron analizados en tres ocasiones para detectar el virus de la mancha blanca:

1. En la piscina camaronesa antes de transportar un lote de camarones al CENAIM, se tomó una muestra de 150 animales, la misma que fue analizada mediante la técnica de Reacción de Polimerización en Cadena (PCR).
2. En el CENAIM, antes de distribuir los animales para el bioensayo, se tomó 5 animales del tanque de aclimatación, para ser analizados por PCR e histología.
3. Al término del bioensayo se analizaron 15 individuos alimentados con la dieta A y 15 individuos alimentados con la dieta C. Las amplificaciones fueron realizadas en una sola operación, utilizando igual cantidad de ADN para todos los individuos. La calidad del ADN empleado y de la PCR realizada fueron controladas amplificando el ADN ribosomal de los camarones.

5. Tratamiento estadístico de los datos

Los datos obtenidos de las pruebas inmunitarias realizadas, fueron analizados mediante un análisis de varianza (ANOVA) y un test de Rango Múltiple de Duncan (Super Anova) a un nivel de confianza del 95%.

6. Transformación de los datos a índices

Los datos obtenidos a partir de cada prueba fueron transformados a índices parciales. Los índices se obtuvieron transformando los datos en porcentajes. Para calcular los porcentajes se consideró al máximo valor obtenido en cada prueba como equivalente al 100 %, en tanto que el menor valor obtenido se lo consideró equivalente al 0 %. Adicionando los índices de cada prueba por tratamiento, se obtuvo el índice global para cada grupo de animales.

RESULTADOS

Efecto de la calidad de la dieta sobre la respuesta inmunitaria del camarón

Para estimar la condición inmunitaria de los animales antes de iniciar los bioensayos, se sometió a un grupo de camarones a los ensayos de inmunoevaluación. En esta fase se realizaron: cuantificación del anión superóxido, actividad antibacteriana, hemogramas y cuantificación de proteínas totales del plasma. Los datos obtenidos con estos animales son presentados como el tiempo cero (T0).

En los dos bioensayos los datos mostraron un decremento del NTH y de la concentración de proteínas plasmáticas. Con respecto a los valores obtenidos en el T0. El NTH promedió 22 millones de hemocitos.ml⁻¹ y 40 millones hemocitos.ml⁻¹, en el primer y segundo bioensayo, respectivamente. La concentración de proteínas plasmáticas promedió en el T0 del primer bioensayo 125,28 ug.ul⁻¹ y 135 ug.ul⁻¹ en el T0 del segundo.

En el T0 mostraron, el número de hemocitos fue muy variable, con valores registrados entre 10 y 40 millones de células.ml⁻¹. Los animales alimentados con balanceados comerciales tuvieron mayor NTH que aquellos que recibieron la dieta natural. En el primer bioensayo, el promedio más elevado (mayor a 15 millones de hemocitos.ml⁻¹) se encontró en la dieta con 50% de proteína (Fig. 1). Este resultado se volvió a repetir en el segundo bioensayo. En lo que concierne a la fórmula hemocitaria, se observó diferencias significativas ($P < 0.05$) en la composición de hemocitos entre los animales del T0 y los de los bioensayos, así como diferencias entre los diferentes tratamientos (Fig. 2). Se observó un incremento de células semigranulosas y una pérdida de células hialinas y granulosas en relación al T0 y a la pérdida de calidad de las dietas, en particular en los animales alimentados con la dieta 3. Resultados similares se obtuvieron en el segundo bioensayo.

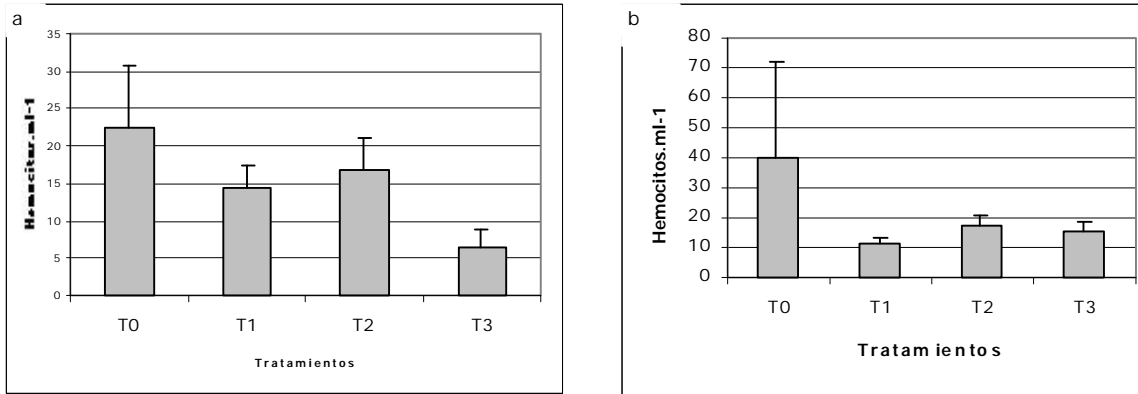


Figura 1. Número total de hemocitos expresado en millones de hemocitos por ml de hemolinfa para tratamiento, comparado con el tiempo cero. a) Primer bioensayo. b) Segundo bioensayo. Tiempo cero: Conteo de hemocitos antes del inicio del bioensayo.

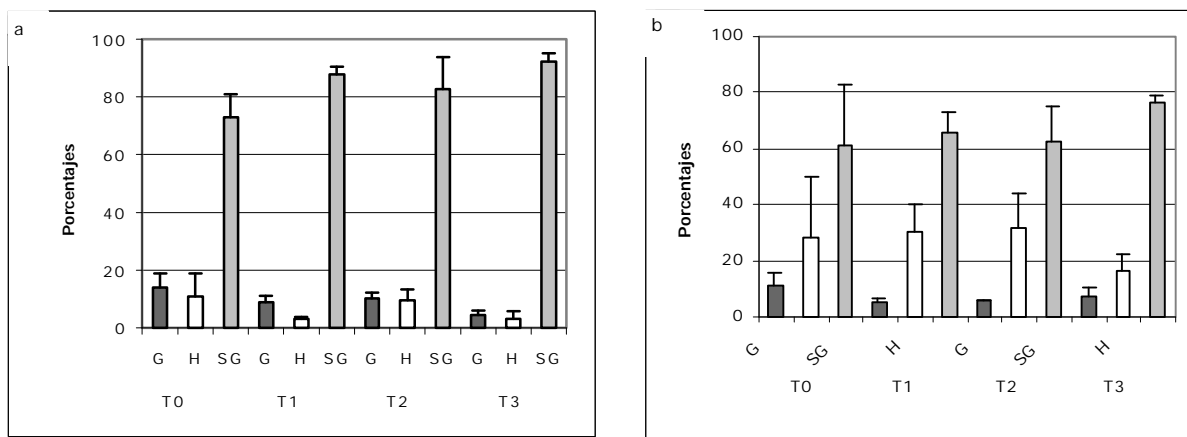


Figura 2. Tipos hemocitarios expresados en porcentajes, en los animales de los diferentes tratamientos. comparado con el tiempo cero. a) Primer bioensayo. b) Segundo bioensayo. Tiempo cero: Formula hemocitaria antes del inicio del bioensayo. G: Hemocitos Granulosos, SG: Hemocitos Semigranulosos. H: Hemocitos Hialinos

Al final del primer bioensayo los valores en concentración de proteína se hallaron entre 60 y 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ul}^{-1}$, registrándose los valores más bajos de proteína en el tratamiento 3, en tanto que en los tratamientos 1 y 2 no presentaron diferencias significativas entre ellos ($P > 0.05$) (Fig. 3). al finalizar el segundo bioensayo los valores para proteínas en el plasma se ubicaron entre 45 y 60 $\mu\text{g}\cdot\text{ul}^{-1}$, correspondiendo el valor más bajo a los animales que recibieron la dieta natural y el promedio más alto a aquellos que recibieron la dieta con 50 % de proteína.

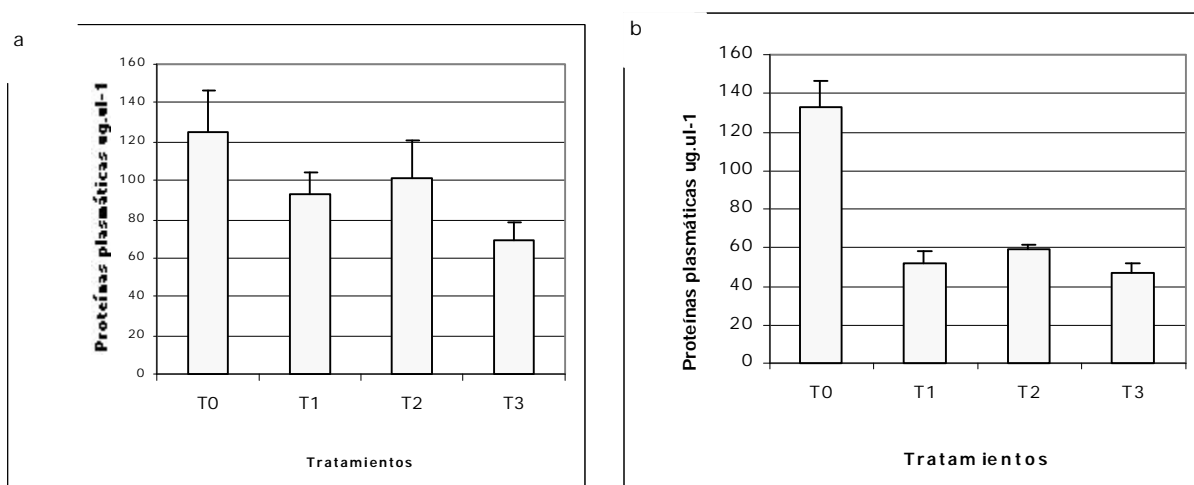


Figura 3. Cuantificación de proteínas en el plasma, según el método de Lowry, en los animales de los diferentes tratamientos. comparado con el tiempo cero. a) Primer bioensayo. b) Segundo bioensayo. Tiempo cero: Concentración de proteínas del plasma antes del inicio del bioensayo.

Tres proteínas plasmáticas fueron detectadas utilizando anticuerpos monoclonales. Estas proteínas fueron α_2 -macroglobulina, factor de coagulación y una aglutinina. Como se puede observar en la figura 4, en todas las inmunodificaciones realizadas, las mayores calificaciones están en los animales que recibieron la dieta con 50 % de proteína, las intermedias en los que recibieron 22 % de proteína y las más bajas en los animales que recibieron la dieta natural.

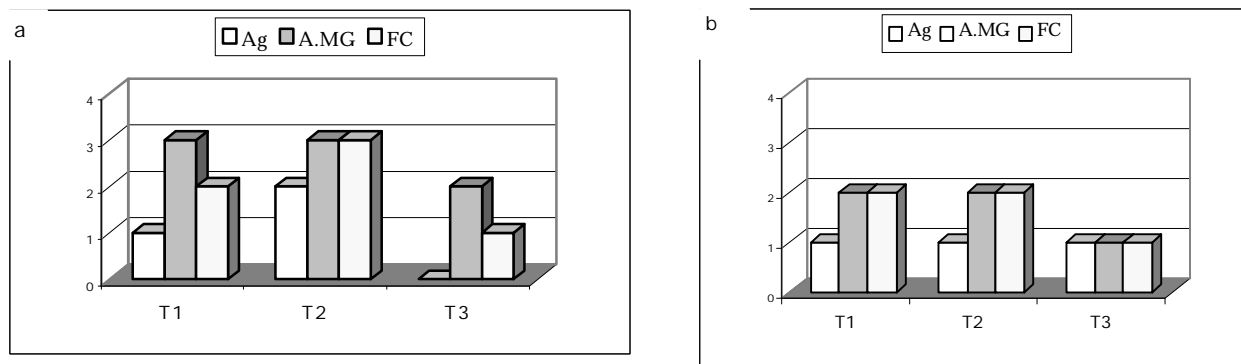


Figura 4: Pruebas de Dot-Blot para aglutinina, α_2 -macroglobulina y factor de coagulación. Las manchas obtenidas fueron comparadas contra una escala colorimétrica a la cual se ha asignado arbitrariamente una categoría de valores que van de 0 a 4. a) Primer bioensayo. b) Segundo bioensayo.

Los resultados obtenidos en la cuantificación del O_2^- expresados en tasas, variaron en un rango de valores desde 1.1 (animales con alimento 2) hasta 1.4 (animales del tiempo 0). No existieron diferencias significativas entre los tratamientos 1 y 3 ni entre estos y el tiempo 0, en los dos bioensayos. Los porcentajes de inhibición del crecimiento bacteriano estuvieron en un rango entre 7-90%. No se encontró diferencias significativas entre los tratamientos, ni entre estos y el tiempo 0 en el primer bioensayo. En el segundo bioensayo los tratamientos tuvieron una actividad antibacteriana más alta que el tiempo 0.

Análisis Integrado de los efectores inmunitarios.

El mayor índice global se registró en los animales que recibieron la dieta 2, en tanto que el índice más bajo se encontró en los animales alimentados con la dieta 3. Observando la figura 5, se puede concluir además, que los índices parciales que ejercieron mayor influencia sobre las diferencias encontradas en los índices globales fueron: Proteínas totales, proteína de coagulación, aglutinina y NTH.

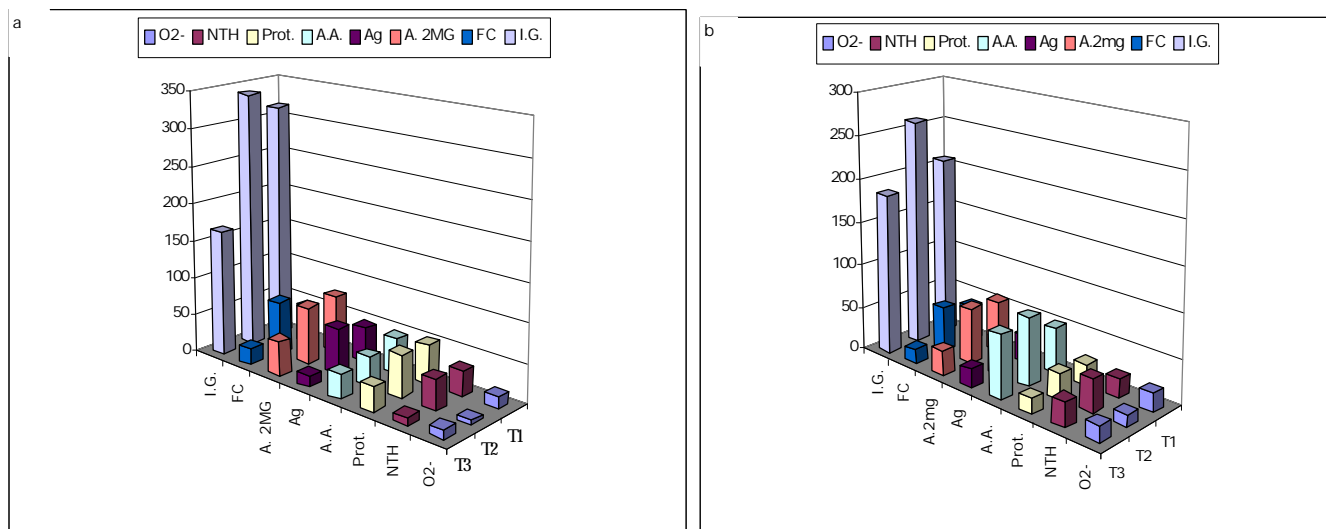


Figura 5: Análisis integrado de los efectores inmunitarios. Se ha representado el índice de cada prueba en función de la dieta suministrada (índice parcial), y el índice inmunitario obtenido para cada grupo de animales (índice global). a) Primer bioensayo. b) Segundo bioensayo. O_2^- : Producción de anión superóxido. I.G: Índice inmunitario global. NTH: Número total de hemocitos. Prot: Concentración de proteínas plasmáticas. A.A.: Actividad antibacteriana del plasma. Ag: Aglutinina. A.2MG: α_2 -macroglobulina. FC: Factor de coagulación.

En los dos bioensayos, la supervivencia de los camarones alimentados con las dietas 1 y 2 se ubicó entre el 70 y el 90 %, en tanto que la supervivencia de los camarones del tratamiento 3, fue tan solo del 50 % en el primer bioensayo y del 26% en el segundo bioensayo.

Estudio de las cualidades inmunoestimulantes de los β -glucanos

Los datos obtenidos de los 5 muestreos realizados mostraron una estimulación más rápida con las concentraciones más altas de estimulante (Dieta E : 104 ppm, Dieta D : 154 ppm), en tanto que la estimulación fue más gradual a concentraciones más bajas (Dieta C : 78 ppm) y no significativa en los animales alimentados con la dieta B (52 ppm). En lo que concierne a la actividad PO se incrementó en los camarones alimentados con las dietas C y E). En el caso de la dieta C se requirió 18 días de suministro continuo del estimulante para alcanzar el pico de incremento (Fig. 6) en tanto que en la dieta E, el incremento se dio dentro de los 6 primeros días. En lo concerniente a la producción de O_2^- , esta fue significativamente más alta en los animales estimulados con la dieta D a los 3 y 6 días de estimulación, que en los animales del control (Fig. 7) No se observó incremento de la actividad antibacteriana en ninguno de los tratamientos aplicados. Ninguna de las dosis utilizadas de estimulante afectó el número total de hemocitos y la concentración de proteínas plasmáticas. La tendencia observada fue a que estos fueran más altos en los tratamientos con β -glucanos que en el control. Por otra parte no se observó diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los pesos promedio finales de los camarones estimulados y los no estimulados, al término de los 24 días que duró la experimentación.

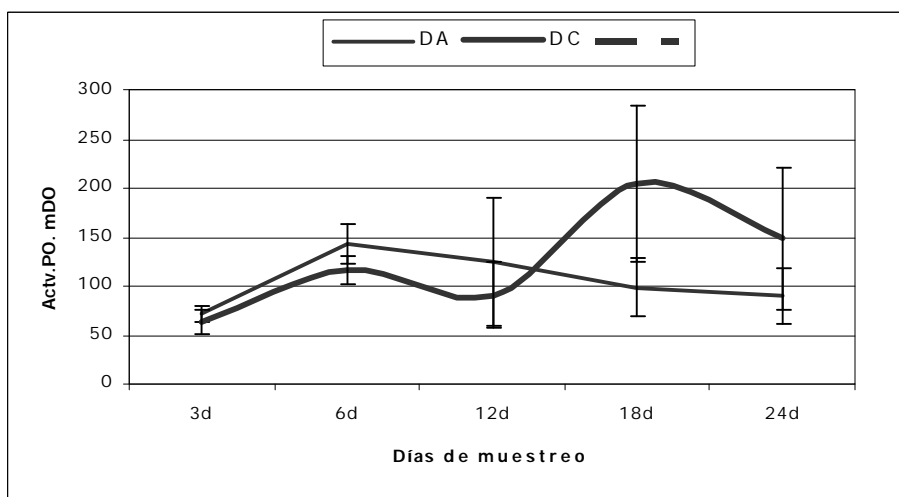


Figura 6.- Series de tiempo de actividad Fenoloxidasa en animales inmunoestimulados con las dieta C (78 ppm de β -glucanos) y A (control, no estimulado).

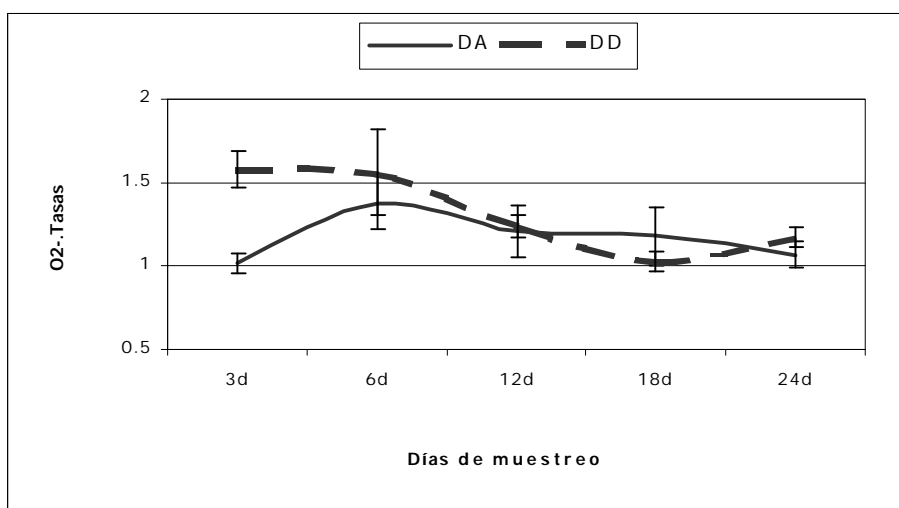


Figura 7.- Series de tiempo de producción de O_2^- en animales inmunoestimulados con la dieta D (104 ppm de β -glucanos) y en animales del control (dieta A). La generación de superóxido está expresada en tasas que corresponden a la relación entre el valor de estimulación sobre el valor de actividad de base.

Diagnóstico WSSV.

Los animales fueron analizados en 3 ocasiones para WSSV. El primer análisis de una muestra tomada en la piscina de origen dio resultados negativos por PCR. El resultado del segundo análisis, una muestra del tanque de aclimatación, fue positivo leve, un análisis de histología realizado sobre 5 animales, mostró escasas células infectadas por WSSV en 3 de ellos. No se observó ninguna patología en los dos restantes. En el tercer análisis para mancha blanca, al finalizar el bioensayo se observó que el producto de amplificación del ADN viral fue significativamente inferior ($P=0,0017$) en los animales alimentados con la dieta C, con respecto a los animales alimentados con la dieta control (Fig. 8, tabla1). No se

analizó los animales alimentados con las otras dietas, considerando que la estimulación fue más sostenida en los animales de la dieta C, en tanto que en los alimentados con las dietas D y E la estimulación había comenzado a decrecer muchos días antes de finalizar el bioensayo.

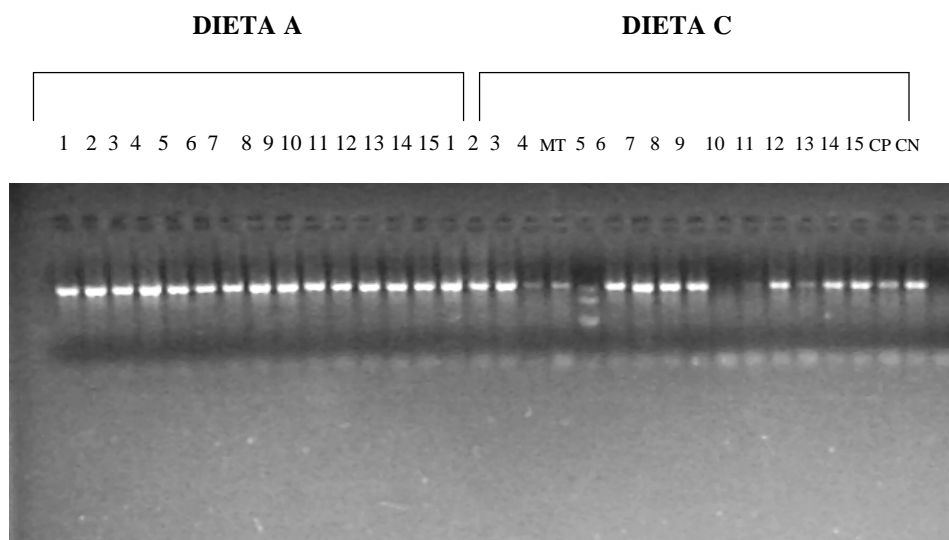


Figura 8.- Producto final de amplificación por PCR del ADN del WSSV. De izquierda a derecha, primera serie de líneas del 1 al 15 dieta A (control no estimulado). Segunda serie de líneas del 1 al 15 dieta C (78 ppm de β -glucanos). (MT) marcador de talla, (CP) control positivo, (CN) control negativo.

Tabla 1 . Concentración estimada del producto final de amplificación por PCR del ADN viral en animales que recibieron la dieta control (Dieta A) y 73 ppm de β -glucanos (Dieta C).

Control		78 ppm de β -glucanos	
Muestras	ADN viral (ng)	Muestras	ADN viral (ng)
1	100.0	1	87.63
2	132.8	2	102.9
3	97.2	3	18.23
4	147.2	4	29.4
5	101.1	5	85.0
6	89.9	6	143.1
7	89.5	7	105.5
8	142.5	8	92.31
9	108.5	9	0
10	100.4	10	17.19
11	89.0	11	70.67
12	106.7	12	21.02
13	98.7	13	76.27
14	95.9	14	80.75
15	112.4	15	51.29
promedios	107.5		65.4

DISCUSION

Los resultados obtenidos de los bioensayos de calidad de las dietas, sugieren que la condición fisiológica de los animales sufre alteraciones luego de su estadía en los tanques de experimentación. En los dos bioensayos se pudo observar diferencias significativas ($p < 0,05$) de la respuesta dada por los efectores inmunitarios considerados, entre los animales del T0 y aquellos sometidos a las 3 dietas, siendo más alto el índice inmunitario en los primeros. Considerando los valores del tiempo 0, 20 millones de hemocitos. ml^{-1} han sido reportados en juveniles aparentemente saludables en condiciones de laboratorio. En cuanto a la concentración de proteínas plasmáticas, valores similares han sido normalmente encontrados en juveniles de *P. japonicus* (Rodríguez, 1993).

Los resultados expresados en índices revelarían que existió una correlación entre un bajo índice inmunitario y una baja supervivencia, hecho que implicaría una pobre calidad del alimento natural. Esto es sorprendente considerando la composición de esta dieta, sin embargo los resultados fueron consistentes en los dos bioensayos. Probablemente más allá de la composición nutricional del alimento natural, sea necesario considerar la carga microbiológica del mismo, sugiriendo que la captura, procesamiento y conservación de alimentos naturales debe manejarse con mucho cuidado. Por otra parte no se puede descartar que bacterias preexistentes en los organismos empleados como alimento, colonicen e infecten los camarones. La relación entre el índice inmunitario y la calidad de la dieta de los camarones fue corroborada por los índices globales obtenidos con los tratamientos 1 y 2. En efecto, los animales que recibieron la dieta comercial con 50% de proteína, mostraron un mayor índice inmunitario que los que recibieron el alimento comercial con 22% de proteína. El número total de hemocitos y la concentración de proteínas plasmáticas fueron los parámetros que mejor siguieron los valores de supervivencia y que influyeron con mayor fuerza en el índice inmunitario global. El hemograma mostró además que no solamente el NTH es influenciado por la calidad de la dieta sino también la composición celular.

Según los resultados con anticuerpos, las tres proteínas estimadas podrían constituirse en marcadores de deficiencias nutricionales, pero la aglutinina y el factor de coagulación serían más sensibles a detectar diferencias en el contenido proteico de la dieta.

Mecanismos inmunitarios tales como actividad antibacteriana y producción de anión superóxido no siguieron forzosamente la misma tendencia que el NTH y la concentración de proteínas plasmáticas. Así los animales que recibieron los tratamientos 2 y 3 presentaron cantidades de hemocitos decrecientes que no se acompañaron de una menor producción de anión superóxido. Los resultados obtenidos no concuerdan con los reportados por Muñoz (1996) quien encontró una relación entre el número de hemocitos y la producción de anión superóxido. Si bien se desconocen las causas reales de esta respuesta, se podría sugerir que animales de los tratamientos 1 y 3 se encontraban en estado de alerta inmunitaria por algún proceso infeccioso en curso o por condiciones nutricionales deficientes, pero no se puede descartar alguna relación con las modificaciones observadas en las fórmulas hemocitarias

Estos resultados concordarían con otros reportados por Cedeño *et al.* (1999), quienes midieron la respuesta inmune de dos lotes de animales hermanos cultivados en condiciones iguales, estrictamente controladas. Un lote fue alimentado con una dieta de baja calidad nutricional, adicionada de un inmunoestimulante, en tanto que los del control recibieron una dieta de alta calidad nutricional. Los resultados mostraron que los animales del control tuvieron mayor peso y una concentración de proteínas totales y NTH más altos que los estimulados, así, como una alta supervivencia (89 %). Los animales que recibieron inmunoestimulante en una dieta base deficiente, mostraron incremento de actividad PO y actividad antibacteriana, sin embargo estos camarones contrajeron NHP obteniéndose una supervivencia del 17 %.

El conjunto de observaciones realizadas sugiere que la concentración de proteínas plasmáticas y el NTH podrían ser considerados como indicadores de estado de salud (nutrición, buenas condiciones fisiológicas), en tanto que los procesos inmunitarios (actividad antibacteriana, producción de O_2^-) son susceptibles de ser modulados por excitación del sistema inmune (inmunoestimulación, infecciones) y no estarían forzosamente relacionados con la salud del animal.

En base a la información disponible luego de los primeros bioensayos, se diseñó un ensayo de inmunoestimulación, considerando bajas dosis de inmunoestimulante (preseleccionadas en un bioensayo preparatorio). La dieta base constituyó un alimento de calidad nutricional garantizada, con la finalidad de proveer a los animales de los recursos necesarios para alertar el sistema inmune, sin que sufran por este motivo de pérdida de peso y/o caída en la concentración del NTH y de las proteínas plasmáticas (consideradas para el efecto como marcadores de salud).

Observando globalmente los resultados de inmunoestimulación, se puede anotar que fue posible estimular el sistema inmune sin provocar por esto desgaste en los animales. Los animales estimulados crecieron normalmente, no perdieron ni hemocitos ni proteínas plasmáticas e incluso estos dos parámetros se incrementaron en algunos muestreos. Las mejores dosis de β -glucanos para provocar una excitación durable del sistema inmune del camarón, fueron las correspondientes a 78 ppm (dieta C) y 104 ppm (dieta D). Con 154 ppm (dieta E), la estimulación fue rápida y no duradera, en tanto que la dosis con 52 ppm (dieta B) resultó muy lenta en provocar estimulación y esta no llegó a ser significativa

A pesar del diagnóstico positivo para WSSV en los animales de experimentación, se decidió proseguir con el bioensayo, considerando por una parte que por regla general en el camarón en muy raras ocasiones se utilizan animales libres de patógenos y que estos son muy difíciles de conseguir. En segundo lugar, la infección era baja (posiblemente no todos los animales estaban infectados) y los resultados que se lograran podrían ofrecer información valiosa sobre el desarrollo de la enfermedad en animales sometidos a inmunoestimulación. Los resultados obtenidos mostraron una baja carga viral en los animales alimentados con la dieta C.

Los resultados que hemos obtenido hasta el momento en inmunomodulación, demostrarían que no se puede divorciar calidad de la dieta suministrada con inmunoestimulación. Por una parte hemos podido ver en experiencias previas que un sistema inmune sobreexcitado en animales pobremente alimentados no se traduce forzosamente en protección (Scholz, *et al.* 1998, Cedeño *et al.* 1999). El actual estudio indicaría que una dieta de buena calidad nutricional no impedirá que el WSSV se incremente dentro de la población. Pero, una ligera excitación del sistema inmune acompañada de los requerimientos nutricionales necesarios, puede ser capaz de alertar el sistema inmune de los camarones sin desgastar a los animales, limitando la multiplicación del WSSV. Sin embargo, es necesario aclarar que los animales alimentados sin β -glucanos a pesar de la fuerte presencia viral, no manifestaron signos visibles de la enfermedad, ni se presentaron mortalidades, situación motivada quizás por la excelente calidad de la dieta suministrada y por la ausencia de situaciones de estrés en los tanques de experimentación.

REFERENCIAS

- Cedeño, R., Molina, C., Otero, V., Valenzuela, E., Sotomayor, M. A., Rodríguez J., 1999. Inmunomodulación: aspectos nutricionales e inmunoestimulación. V congreso ecuatoriano de acuicultura, 28-30 de octubre de 1999, Guayaquil, Ecuador.
- Chang, C., Su, M., Chen, H., Chu-Fang Lo, C., Kou, G., Chiu Liao, L., 1999. Effect of dietary β -glucan on resistance to white spot syndrome virus (WSSV) in postlarval and juvenile *Penaeus monodon*. Diseases of Aquatic Organism. 36, 163-168.
- Leonard, C., Soderhall, K. and Ratcliffe, N. A., 1985. Studies on prophenoloxidase and protease activity of *Blaberus craniifer* haemocytes. Insect. Biochem. 15, 810-1985.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. J.Biol. Chem. 193, 265-275.
- Muñoz, M., 1996. Desarrollo y optimización de ensayos para la evaluación del estado inmunitario del camarón *Penaeus vannamei*. Tesis de grado para la obtención del título de Acuicultor. Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar. Escuela Superior Politécnica del Litoral. Guayaquil, Ecuador
- Muñoz, M., Cedeño, R., Rodríguez, J., Van der Knaap, W., Mialhe, E., Bachère, E., Measurement of reactive oxygen intermediate production in haemocytes of the penaeid shrimp, *Penaeus vannamei*. Aquaculture. In press
- Rodríguez, J., Boulo, V., Mialhe, E., Bachère, E., 1995. Characterisation of shrimp haemocytes and plasma components by monoclonal antibodies. J. Cell Sci. 108, 1043-1050.
- Rodríguez, J., 1993. Contribution a l'étude du système immunitaire de la crevette peneide *Penaeus japonicus* (crustacea-decapoda). Thèse pour l'obtention du grade de docteur d'université. Université Blaise Pascal, Clermont Ferrand, France.
- Scholz, U., García Díaz, G., Ricque, D., Cruz Suarez, L.E., Vargas Albores, F., Latchford J. 1998. Enhancement of Vibriosis resistance in juvenile *Penaeus vannamei* by supplementation of diets with different yeast products. Aquaculture 76, 3-4 p. 271-283.
- Sung, H. H., Kuo, G. H., Song, Y. L., 1994. Vibriosis resistance induced by glucan treatment in tiger shrimp (*Penaeus monodon*). Fish Pathol. 29 (1), 11-17.
- Tapia, F., 1997. Optimización de ensayos antibacterianos y estudios sobre la inducción de la actividad antibacteriana en la hemolinfa del camarón *Penaeus vannamei*. Tesis de grado para la obtención del título de Acuicultor. Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar. Escuela Superior Politécnica del Litoral, Guayaquil, Ecuador.