

POSIBILIDADES DE INMUNOESTIMULACION DEL CAMARON A TRAVES DEL ALIMENTO

*Francisco Vargas-Albores, Inocencio Higuera-Ciapara, Flor Jiménez-Vega,
Jorge Hernández-López, Teresa Gollas-Galván y Gloria Yepiz-Plascencia.*

**Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo. DTAOA. Biotecnología
Marina. Hermosillo, Son. CIAD, A.P. 1735, Hermosillo, Son, C.P. 83000
Tel + Fax: (62) 80-00-58
email: fvargas@cascabel.ciad.mx**

INTRODUCCION

La nutrición y el control de enfermedades son los puntos que han requerido mayor atención por parte, no solamente de los acuacultores, sino de todos los involucrados en la producción animal. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre en el manejo de los organismos no acuáticos, las enfermedades de los organismos acuáticos encuentran en el medio, una vía importante de diseminación, la cual dificulta su control. Mientras que los aspectos relacionados con la nutrición animal repercuten directamente en los gastos de operación, el control de las enfermedades es el punto de mayor riesgo durante el desarrollo del cultivo. Los impactos de las enfermedades sobre la producción han sido cuantiosos, básicamente por la frecuencia con que las enfermedades están apareciendo, su fácil diseminación y la ausencia de tratamientos efectivos.

La aparición de la enfermedad está relacionada al rompimiento del equilibrio entre: el medio ambiente, la fisiología del hospedero y las estrategias invasoras del parásito. El control de las condiciones del medio ambiente se dificulta por los volúmenes de agua requeridos para los cultivos comerciales. Los tratamientos contra los agentes causales, además de ser costosos y producir daños al medio ambiente, hasta ahora no han sido eficientes. Más aún, en el caso de enfermedades virales, incluyendo las que afectan al hombre, solamente se conocen tratamientos sintomáticos, ya que aún no se comercializan compuestos antivirales, por su baja eficiencia, reacciones secundarias y alto costo.

El tercer componente, relacionado con la fisiología del animal, parece ser el camino más factible para controlar las enfermedades y, de ese modo, disminuir el riesgo en la inversión. El conocimiento de la bioquímica fisiológica de los animales es un paso obligado para el planteamiento de tales estrategias. La nutrición es el tratamiento primario para el control de las enfermedades, ya que un organismo con deficiencias nutricionales, es más susceptible a las enfermedades, por la ausencia de factores necesarios para el sistema de defensa.

Por otro lado, la inmuoestimulación profiláctica ha sido una de las técnicas más exitosas, empleadas para el control de enfermedades infecciosas en el hombre. Por ello se ha propuesto el uso de ésta herramienta para organismos cultivables. Sin embargo, para lograr su diseño y utilización es necesario conocer los mecanismos de defensa involucrados, los requisitos para su estimulación, su regulación y su expresión. Desafortunadamente, en los invertebrados, poco se conoce sobre el sistema de defensa.

EL SISTEMA INMUNE

Debido al pobre conocimiento que se tiene sobre el sistema inmune de los invertebrados, su existencia es discutida, principalmente, por la falta de evidencias sobre la especificidad de la respuesta y de memoria inmunológica. Estos dos elementos son necesarios para establecer una estimulación del sistema inmune y poder utilizar el control profiláctico. El sistema inmune de los invertebrados, hasta ahora, ha mostrado diferencias con el sistema inmune de los vertebrados, principalmente por la ausencia de moléculas del tipo inmunoglobulina y células linfoides. Sin embargo, se espera que el sistema de defensa en los invertebrados tenga la misma función que en los vertebrados.

La función del sistema inmune es mantener la individualidad biológica. Por ello, su principal actividad es diferenciar y eliminar todo material extraño de sus tejidos. Para lograrlo, el sistema inmune de los invertebrados deberá contener los elementos básicos necesarios: moléculas de reconocimiento, moléculas y células efectoras, sistemas amplificadores y reguladores. Estos elementos podrán estar englobados en factores humorales, factores celulares y sistemas multiméricos que involucre a ambos tipos de factores.

EL SISTEMA INMUNE DEL CAMARON

El primer paso para intentar la inmuoestimulación en los camarones es demostrar la existencia de moléculas específicas de reconocimiento y, que tales moléculas, pueden ser inducidas o activadas. Además, y tal vez sea la parte más difícil, es encontrar una forma operativamente viable de llevar a cabo la inmuoestimulación. En los camarones se han descrito algunos componentes posiblemente involucrados en los sistemas de defensa incluyendo: células circulantes o hemocitos, proteínas plasmáticas, enzimas e inhibidores [1-3, 5, 6, 8, 12].

HEMOCITOS

Al igual que en otros crustáceos, en el camarón se han detectado, al menos, tres tipos de células circulantes: los hemocitos hialinos, los hemocitos de gránulos pequeños y los hemocitos de gránulos grandes. Los hemocitos hialinos son células que se adhieren y extienden fácilmente, no contienen gránulos densos, y se encuentran involucrados en el proceso de coagulación. Los hemocitos que contienen gránulos pequeños, son los más abundantes y muestran semejanza a los leucocitos polimorfonucleares de los vertebrados. Los hemocitos con gránulos grandes constituyen el 20-30% de las células circulantes. Los gránulos de ambos tipos de células contienen enzimas involucradas en la destrucción de patógenos, incluyendo el sistema profenoloxidasas. Estos son, de acuerdo a nuestras observaciones las células más activas desde el punto de vista inmunológico. Ellas participan en la fagocitosis, la adhesión y el encapsulamiento,

además de contener las enzimas necesarias para la melanización y otras enzimas de defensa [5 y 7].

SISTEMAS MULTIMÉRICOS

En asociación con las células circulantes se encuentran: el sistema de la coagulación y el sistema profenoloxidase (proPO). El primero es el responsable de establecer una barrera física para evitar la invasión y la pérdida de hemolinfa, ya que los camarones tienen un sistema circulatorio abierto. Por su parte, el sistema proPO se encargará de eliminar los patógenos que hayan podido penetrar al interior del organismo.

COAGULACION

El sistema de coagulación de los camarones tiene semejanzas con el sistema de coagulación de los vertebrados. La proteína análoga al fibrinógeno de los vertebrados, responsable de la formación del coágulo en los camarones es llamada clotting protein (CP). Esta proteína está formada por dos subunidades de 200 kDa, que se encuentran unidas por puentes disulfuros. La CP del camarón ha sido purificada y su secuencia N-terminal muestra homología con la proteína de la langosta y del langostino, lo que sugiere un origen común. Mas aún, el fibrinógeno de los vertebrados aparentemente tiene el mismo origen.

A diferencia de la CP, el fibrinógeno necesita ser convertido a fibrina para que una TGasa sérica lo polimerice. Sin embargo, en el camarón la CP es sustrato para la TGasa, la cual se encuentra en el interior de los hemocitos hialinos. La activación de los hemocitos y la liberación de la TGasa se puede llevar a cabo por estimulación directa de los hemocitos por lipopolisacáridos (LPS) o por factores celulares provenientes de la activación de las células granulares.

La reacción entre la CP y la TGasa hemocítica parece ser bastante conservada, ya que la reacción de coagulación de la CP del camarón blanco, puede realizarse con TGasa de cobayo o con lisado de hemocitos de otras especies de camarón [4, 9 y 13].

PROFENOLOXIDASA

El sistema profenoloxidasa (proPO) parece ser un complejo integrador de varios factores, ya que involucra moléculas de reconocimiento, células y sus actividades efectoras, potencializa el estímulo y requiere de reguladores para evitar el daño sobre el tejido del camarón. El sistema proPO del camarón se encuentra en el interior de los gránulos de los hemocitos granulares y puede ser liberado por estimulación de las células con beta-glucano o LPS. Una vez liberado el contenido granular, la proPO es transformada, por acción de una proteinasa, en fenoloxidasa. Esta última es la responsable de la oxidación de fenoles a quinonas, las cuales se convierten en melanina.

La proteinasa responsable de transformar la proPO, llamada enzima activadora de la proPO (EAPP), es del tipo serina y se encuentra en forma inactiva en el interior del gránulo. Sin embargo, cuando el gránulo es liberado a la hemolinfa, la EAPP se activa en presencia del calcio

plasmático (8-10 mM). Además de activar la proPO, la EAPP puede dañar otros componentes y/o tejidos del camarón, por lo que su acción debe ser limitada por inhibidores de proteinasas (antitripsina y alfa-2-macroglobulina).

Aunque la activación del sistema proPO puede hacerse en forma directa por componentes microbianos, en el camarón se han detectado proteínas plasmáticas que reconocen a BG y LPS. Los cuales son considerados como componentes humorales [1, 3, 5, 9, 10 y 13].

FACTORES HUMORALES

Además de las proteínas de reconocimiento, también se han descrito proteínas con actividad lítica y se han detectado inhibidores de proteinasas. Las moléculas de reconocimiento posiblemente sean las más importantes, ya que después de reaccionar con el “antígeno” activan funciones celulares.

LPS-BP

Esta proteína fue descrita como una aglutinina que reconoce LPS y es capaz de aglutinar bacterias. Sin embargo, una vez que reacciona con el LPS o bacterias, es capaz de unirse a los hemocitos y estimular la fagocitosis. Aunque los hemocitos pueden llegar a lisarse cuando la fagocitosis es extensa, y esto provoque la activación de los sistemas proPO y de coagulación, no tenemos evidencias de una activación directa de la LPS-BP sobre el sistema proPO [5, 8, 13].

BGBP

BGBP posiblemente representa el mejor caso de una molécula de reconocimiento que activa sistemas celulares, ya que tiene un efecto directo sobre el sistema proPO. Esta proteína reconoce y se une a beta glucanos. El complejo glucano-BGBP se une a los hemocitos granulares y produce la liberación de los gránulos. Una vez liberados los gránulos, el sistema es activado por la presencia de calcio plasmático.

BGBP es una glicoproteína de 100 kDa que parece ser altamente conservada. Su peso molecular y contenido de aminoácidos es muy similar en el camarón café, blanco y azul, así como en el langostino y otras especies de agua dulce estudiadas. Además, la secuencia N-terminal de la BGBP del camarón café y del camarón blanco muestra gran homología entre ellas y con la BGBP del langostino [5, 11-13].

Debido a que ésta proteína puede reaccionar con glucanos libres que se encuentran en la hemolinfa y activar la maquinaria celular [9], es necesario considerar las consecuencias de una inoculación de beta glucanos en los camarones.

SOBRE LA INMUNIZACION

La estimulación del sistema inmune de los animales, puede ser muy simple desde el punto de vista teórico. Sin embargo, es necesario demostrar la presencia de células o moléculas de

reconocimiento y memoria inmunológica. Mientras que factores de reconocimiento se han descrito en el camarón, hasta la fecha no ha sido posible la demostración de una memoria inmunológica. Probablemente esto se debe a la falta de herramientas para medirla.

El uso de microorganismos atenuados, ha sido una de las técnicas más utilizadas para la inmunización. Sin embargo, recientemente el uso de componentes microbianos, compuestos sintéticos y vacunas basadas en tecnología de ácidos nucleicos se están difundiendo. Para lograr la inmunización es necesario un contacto adecuado entre el antígeno y el sistema inmune, lo cual no es suficiente con inocularlo. Se requiere determinar la vía y la dosis apropiada, dependiendo de las características del inmunógeno, su absorción, digestibilidad, etc. En los vertebrados, la hipersensibilidad, la tolerancia o la alergia son cuadros que se desarrollan fácilmente, sobre todo en experimentación, por una inmunización inadecuada.

Además, el antígeno deberá poseer algunas propiedades fisicoquímicas que le permitan ser compatibles con los sistemas biológicos, especialmente el sistema inmune. Por ejemplo, digestibilidad.

Para que un antígeno de alto peso molecular pueda ser procesado, se requiere que sea degradado. Del mismo modo, un antígeno muy pequeño no puede ser antigénico porque la señal del epítopo requiere un tamaño mínimo. Soderhall determinó que el tamaño mínimo para activar el sistema proPO es de 6 unidades de hexosa, lo cual es compatible con lo observado en los vertebrados, donde el tamaño mínimo es el equivalente a 5 aminoácidos o 6 hexosas. Sin embargo, es necesario recordar que los glucanos poseen enlaces beta y que las enzimas para su degradación son más bien de origen microbiano.

La estimulación por glucanos ha sido probada por varios autores y los resultados son controversiales, principalmente por la falta de un indicador apropiado de la respuesta inmune del camarón. Pero, además, podría estar influenciado por la falta de estandarización en la metodología de inmunización. Independientemente de los aspectos de manipulación, se requiere un inóculo inmunológicamente adecuado, tanto en composición, tamaño y carga, como en la dosis, número y periodicidad de las inmunizaciones.

La vía de inmunización también es importante, sobre todo en el caso de organismos pequeños, donde la eficiencia de inmunización se debe valorar en términos de factibilidad técnica. Hasta ahora no hay evidencias de que el inóculo entre en contacto con el sistema inmune de los camarones, cuando la inmunización se lleva a cabo por el agua o por el alimento. Aunque en algunos experimentos se han visto incrementos en la sobrevivencia atribuibles a un contacto previo con bacterias o sustancias microbianas, no se han aportado evidencias de una estimulación del sistema inmune en términos de incremento o decremento de algún componente involucrado.

La factibilidad técnica de la inmunización en los camarones por contacto o suministro de "antígeno" disminuyen al considerar el número de organismos y los diferentes medios donde son cultivados. La inoculación directa es una vía que debe ser olvidada debido al número y el tamaño de los organismos.

Independientemente de las dificultades técnicas para la inmunización de los camarones, debe señalarse que los camarones deben ser inmunizados en edades tempranas, donde son más susceptibles a infecciones. Sin embargo, el sistema celular de los camarones, responsable de la defensa en contra de virus y parásitos, es el que más tarda en madurar.

Esto que aparentemente dificulta el éxito de la inmunostimulación, permite proponer otras formas para lograrlo. Es decir, además de la estimulación directa con el “antígeno”, la inmunostimulación podría llevarse a cabo por sustancias que potencializarán el sistema celular de los camarones. Es más, probablemente el efecto protector que han observado algunos investigadores, al utilizar beta glucanos, se deba a un incremento en la capacidad inmunológica, más que a una inmunización.

PERSPECTIVAS

Pese a los problemas existentes, la inmunostimulación podría ser el camino profiláctico para resolver los problemas de enfermedades infecciosas en los camarones. Sin embargo, a la luz de los nuevos avances en la biología molecular, se pueda llegar al diseño de vacunas basadas en esta tecnología. Por otro lado, la búsqueda de especies o variedades más resistentes, ya sea naturales o manipuladas, pueda ser una alternativa. En todos los casos, el conocimiento sobre el sistema inmune de los camarones, sus componentes y su regulación, será un conocimiento fundamental.

REFERENCIAS

1. Gollas-Galván, T.; Hernández-López, J. and Vargas-Albores, F. 1997 Effect of calcium on the brown shrimp (*Penaeus californiensis*, Holmes) prophenol-oxidase system activation. *Comp. Biochem. Physiol.* 117A:419-425;
2. Guzmán-Murillo, A.; Ochoa, J. L. and Vargas-Albores, F. 1993 The hemolytic activity in the haemolymph from brown shrimp (*Penaeus californiensis* Holmes). *Comp. Biochem. Physiol.* 106A:271-275;
3. Hernández-López, J.; Gollas-Galván, T. and Vargas-Albores, F. Activation of the prophenoloxidase system of the brown shrimp (*Penaeus californiensis* Holmes). *Comp. Biochem. Physiol.* 113C:61-66;1996
4. Montaña-Pérez, K.; Yepiz-Plascencia, G.; Higuera-Ciapara, I. and Vargas-Albores, F. Purification and characterization of the clotting protein from the white shrimp (*Penaeus vannamei*). *Comparative Biochemistry & Physiology*. In press
5. Vargas-Albores, F. The defense system of brown shrimp (*Penaeus californiensis*): Humoral recognition and cellular responses. *J. Mar. Biotechnol.* 3:153-156;1995
6. Vargas-Albores, F. Sistema de defensa del camarón café (*Penaeus californiensis*). *Ciencia* 46:33-45;1995

7. Vargas-Albores, F.; Gollas-Galván, T. and Hernández-López, J. Separation of hemocytes populations from *Penaeus californiensis*, *P. vannamei* and *P. stylirostris* by density gradient. *Crustacean Biology* Submitted
8. Vargas-Albores, F.; Guzmán-Murillo, A. and Ochoa, J. L. A Lipopolysaccharide-binding agglutinin isolated from brown shrimp (*Penaeus californiensis* HOLMES) haemolymph. *Comp. Biochem. Physiol.* 104A:407-413;1993
9. Vargas-Albores, F.; Hernández-López, J.; Gollas-Galván, T.; Montaña-Pérez, K.; Jiménez-Vega, F. and Yepiz-Plascencia, G. Activation of shrimp cellular defence functions by microbial products, in *Advances in shrimp biotechnology*, T. W. Flegel, Editor. 1998: Bangkok. p. 26-30.
10. Vargas-Albores, F.; Hinojosa-Baltazar, P.; Portillo-Clark, G. and Magallón-Barajas, F. Influence of temperature and salinity on the proPO system of the brown shrimp (*Penaeus californiensis* Holmes). *Aquaculture Research* In press
11. Vargas-Albores, F.; Jiménez-Vega, F. and Söderhäll, K. A plasma protein isolated from brown shrimp (*Penaeus californiensis*) which enhances the activation of prophenoloxidase system by β -1,3-glucan. *Develop. Comp. Immunol.* 20:299-306;1996
12. Vargas-Albores, F.; Jiménez-Vega, F. and Yepiz-Plascencia, G. Purification and comparison of β -1,3-glucan binding protein from white shrimp (*Penaeus vannamei*). *Comp. Biochem. Physiol.* 116B:453-458;1997
13. Vargas-Albores, F. and Yepiz-Plascencia, G. Shrimp Immunity. *Res. Trends* In press