

CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Postgrado

**DETERMINACIÓN DE MOLÉCULAS QUE INTERVIENEN EN EL SISTEMA
INMUNE DEL CAMARÓN BLANCO (*Penaeus vannamei*) EN RESPUESTA AL
USO DE INMUNOESTIMULANTES.**

T E S I S

Que para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales

P r e s e n t a

Angel Isidro Campa Córdova

La Paz, B.C.S. Noviembre 2002

RESUMEN

La acuicultura de crustáceos penaeidos constituye una actividad económicamente importante que genera elevados ingresos si se garantiza una producción óptima del mismo. Esta actividad está limitada en diferentes partes del mundo por enfermedades infecciosas provocadas entre otros, por bacterias, virus, hongos, parásitos y por el uso regular de antibióticos que han dirigido progresivamente a las poblaciones de cultivo a una situación crítica de resistencia.

El estudio del sistema inmune en crustáceos comienza a ser una herramienta muy útil para el diseño de estrategias que permitan determinar y mejorar la respuesta del sistema de defensa del hospedero hacia los patógenos potenciales. Para ello, es requerido que las investigaciones básicas estén dirigidas a la caracterización de efectores de defensa humorales y celulares en camarón.

Los radicales libres derivados de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno son generados constantemente por los organismos aeróbicos como producto del propio metabolismo y como respuesta de su sistema inmune a las infecciones causadas por microorganismos. Estos radicales libres tienen propiedades altamente microbicidas contra los microorganismos invasores, pero a su vez, son extremadamente dañinos para el hospedero, causando daños severos al ADN, lípidos y proteínas celulares. Por tal motivo, los organismos han desarrollado la capacidad de contrarrestar este efecto nocivo utilizando moléculas con acción antioxidante, entre las cuáles se encuentra la enzima superóxido dismutasa.

El presente estudio se enfocó en la medición de la respuesta oxidativa (anión superóxido y óxido nítrico) y antioxidante (superóxido dismutasa) en el camarón blanco (*P. Vannamei*), para determinar si estos compuestos pueden ser utilizados como indicadores de la activación del sistema inmune del camarón en respuesta a algunos componentes de la pared celular de microorganismos, como β - glucanos, lipopolisacáridos, bacterias vivas o muertas y polisacáridos sulfatado extraídos de microalgas.

Camarones de *Penaeus vannamei* con un peso entre 10-12 g fueron inmersos durante 1, 3 y 6 h en soluciones de β -1,6 glucano y polisacárido sulfatado. Se determinó la generación de anión superóxido y óxido nítrico para conocer si los inmunoestimulantes probados inducen la activación del sistema inmune en camarón. La generación de anión superóxido por los hemocitos presentó una respuesta 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 *Vibrio parahaemolyticus*, registró una respuesta más rápida (a las 0 h posteriores al reto) que la observada con los otros tratamientos (a las 24 h posteriores al reto). La exposición de los camarones al β -1,6 glucano, al parecer no activó la generación de óxido nítrico en hemocitos.

Se estudió la actividad inmunomodulatoria de la enzima superóxido dismutasa (Mn-SOD) y su posible uso como indicador de la respuesta inmune en el camarón blanco *P. vannamei*. Los camarones fueron inmersos en soluciones de β -1,6 glucano y polisacárido sulfatado durante 6 h. Se determinó la actividad de la Mn-SOD en hemocitos y en músculo, obteniendo niveles similares en ambos tejidos (1.5 y 1.4 veces mayor que el control, respectivamente).

El conteo total de hemocitos (THC), disminuyó dentro de las primeras 24 h después del reto con los inmunoestimulantes, pero los valores de THC y la proteína soluble total (RPC) se incrementaron respecto a los valores control entre las 48 y 120 h posteriores al reto. Se observó que una sola exposición de los organismos a los inmunoestimulantes es suficiente para incrementar la respuesta oxidante y antioxidante en hemocitos y en músculo de *P. vannamei*.

Se determinó la actividad de la Mn-SOD en juveniles de *P. vannamei* entre 0.7 y 1.0 g de peso, sumergiéndolos durante 6 h en soluciones de β -glucano, lipopolisacárido (LPS), fucoidán, y *Vibrio sp* muerto por calor. Los inmunoestimulantes probados, mostraron la capacidad de activar el sistema inmune de los juveniles, obteniendo incrementos en la respuesta antioxidante respecto a los controles, entre las 24 y las 72 h posteriores al reto con β -glucano, LPS y fucoidán. Los organismos expuestos al *Vibrio* muerto por calor registraron un incremento en la respuesta antioxidante de 1.5 veces respecto al control a las 24 h después del reto y los juveniles expuestos al β -glucano, mostraron un incremento de 3.0 veces mayor el control a las 72 h. Este estudio mostró la capacidad de algunos inmunoestimulantes y bacterias para activar la respuesta inmune de camarón juvenil y dicha respuesta puede ser presentada en diferente magnitud.

La utilización por inmersión del β -glucano en juveniles y en adultos de *P. vannamei* fue capaz de generar un incremento en la actividad de la enzima Mn-SOD respecto al control entre las 24 y 48 h posteriores al reto. Además, la capacidad antioxidante observada en los juveniles de *P. vannamei* (2 veces mayor que el control) fue superior a la generada por los adultos (1.5 veces mayor que los valores del grupo control).

En este estudio, la respuesta oxidativa y antioxidante del sistema inmune en juveniles y adultos de *P. vannamei*, se presentó más temprana utilizando bacterias vivas que utilizando inmunoestimulantes comerciales.

Palabras clave: *Penaeus vannamei*; SOD; Inmunoestimulantes.

ABSTRACT

American white shrimp (*Penaeus vannamei*) from 10-12 g were immersed in aerated β -glucan and sulfated polysaccharide solutions for 1, 3, and 6 h. Superoxide anion and Mn-SOD activity in haemocytes and muscle were investigated to evaluate whether β -glucan and sulfated polysaccharide induce any immunostimulatory activity. Haemocytes and muscle showed different levels of superoxide anion generation and Mn-SOD activity (2.0 and 1.4 times that of control, respectively) when shrimp were immersed for 6 h in aerated seawater containing β -glucan and sulfated polysaccharide.

The immunomodulatory action of the antioxidant enzyme superoxide dismutase (SOD) and its possible use as indicator of immune responses in American white shrimp (*P. vannamei*) was studied.

Juvenile shrimp were immersed in aerated β -glucan and sulfated polysaccharide solutions for 6 h. SOD activity in haemocytes and muscle was quantified to evaluate whether β -glucan and sulfated polysaccharide induce immunostimulatory activity. Both haemocytes and muscle showed similar levels of SOD activity (1.5 and 1.4 times that of control, respectively).

Total haemocyte count (THC) decreased within the first 24 h after challenge with immunostimulants, but THC and total soluble haemocyte protein (RPC) increased over normal values after 48 to 120 h.

Single immunostimulation with β -glucan and sulfated polysaccharide is capable of generating an increase in the respiratory burst of *P. vannamei* haemocytes.

Juvenile American white shrimp (*P. vannamei*) were immersed in aerated β -glucan, lipopolysaccharide, fucoidan, and heat-killed *Vibrio penaeicidae* solutions for 6 h. Mn-SOD activity in haemocytes and muscle were investigated to evaluate whether different immunostimulants are able to induce similar immunostimulatory activity.

Immunostimulants tested showed the capacity to activate the immune system in juvenile shrimp. The highest response was observed between 24 and 72 h after challenge with fucoidan and β -glucan and LPS. Heat-killed *V. penaeicidae* presented the highest SOD activity at 24 h after challenge (1.5 times than the control group) and juvenile shrimp challenged with β -glucan showed an increased SOD activity up to 3.0 times than the control at 72 h.

Exposure of juvenile and adult shrimp to β -glucan generated an antioxidant increase than that of control group between 24 and 48 h after challenge. In addition, the antioxidant capacity by juvenile shrimp showed a higher response (2 times than the control group) than adult shrimp (1.5 times than the control group).

This study showed the capacity of some immunostimulants and bacteria to activate the immune response in shrimp and this response might be presented at different magnitude.

Key Words: *Penaeus vannamei*; SOD; Immunostimulants.

DEDICATORIA

Con todo cariño dedico esta tesis:

A mi esposa Alma Leticia, a mis hijos Diana Marisa, Angel Isidro, Carlos André.

A Mis padres y mis hermanas.

AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C. por la oportunidad de realizar este trabajo de tesis, así como por la extensión de beca otorgadas.

Al CONACYT por su apoyo económico otorgado con la beca # 90778.

A Chula por su gran ayuda en el tan importante aprendizaje y manejo inicial de las técnicas de laboratorio.

A Roberto Carlos, Tony Guzmán y Dra. Norma Hernández, por su asistencia técnica y sugerencias en la planeación de los experimentos.

A mis asesores de tesis, Dr. Felipe Ascencio, Dra. Norma Hernández, Dr. Félix Córdova, Dr. Jose Luis Ochoa, Dr. Francisco Vargas, por compartir su enorme experiencia con sus comentarios y consejos hacia el trabajo de tesis.

Al Dr. Adolfo García y Dr. Ricardo Vázquez, por sus acertados comentarios en la elaboración de este documento.

Al proyecto CIBNOR PAC-11.

A Ira Fogel, por sus comentarios en la edición de los artículos.

Al Dr. Sergio Hernández y la Dra. Thelma Castellanos, exdirector y directora del programa de Posgrado del CIBNOR, por el apoyo que recibí durante mis estudios.

Al doctor Felipe Ascencio, mi sincero agradecimiento por su dirección académica, su confianza en mis decisiones en el laboratorio y por su apoyo incondicional en todas las situaciones favorables y desfavorables que se me presentaron como estudiante y como persona.

CONTENIDO	Página
RESUMEN	i
ABSTRACT	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTOS	v
CONTENIDO	vi
LISTA DE PUBLICACIONES	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABLAS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS	ix
INTRODUCCIÓN	1
El camarón de cultivo	1
Su importancia económica	1
Enfermedades	5
Tratamiento y control	6
Sistema inmunitario de crustáceos: respuesta inmune frente a bacterias.	8
La respuesta inmune innata o inespecífica.	8
La respuesta celular	8
Fagocitosis	8
Intermediarios reactivos de oxígeno y nitrógeno	9
Enzimas antioxidantes	10
Melanización	12
Encapsulación	13
Formación de nódulos	13
Coagulación	13
Receptores de membrana	14
La respuesta humoral	15
Péptidos antimicrobianos	15
Lisozimas	16
Lectinas	17
Citocinas	18
La respuesta inmune adquirida o específica	19
OBJETIVO DEL TRABAJO	22
RESULTADOS	23
Generación de anión superóxido	23
Actividad de SOD	24
Contenido de proteína	26
Hemocitos circulantes	27
DISCUSIÓN GENERAL	28
CONCLUSIONES	34
PERSPECTIVAS	36
LITERATURA CITADA	38
ANEXOS	45

LISTA DE PUBLICACIONES

Esta tesis se basa principalmente en los siguientes artículos, que serán referidos por sus números romanos (I-III) :

- I. Campa-Córdova, A. I., Hernández-Saavedra, N. Y., De Philippis, R. and Ascencio F. (2002). "Generation of Superoxide anion and SOD activity in American white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) haemocytes and muscle as a response to β -glucan and sulfated polisaccharide". *Fish & Shellfish Immunology*. 12, 353-366.
- II. Campa-Córdova, A. I., Hernández-Saavedra, N. Y. and Ascencio F. "Superoxide dismutase as modulator of immune function in American white shrimp (*Litopenaeus vannamei*)". *Comparative Biochemistry and Physiology*. *En prensa*.
- III. Campa-Córdova, A. I., Hernández-Saavedra, N. Y. and Ascencio F. "SOD activity in juvenile American white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) challenged by different immunostimulants".

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Producción global de especies de camarón del género <i>Penaeus</i> , por acuicultura.	1
Figura 2. Bioquímica de los intermediarios reactivos de oxígeno (ROI) y nitrógeno (RNI).	10
Figura 3. Bioquímica de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa, catalasa y glutatión.	10

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla I. Principales países productores de camarón proveniente de la acuicultura.	2
Tabla II. Volumen de la producción de acuicultura en peso vivo, según principales especies.	3
Tabla III. Participación de la acuicultura en el valor de la producción pesquera Inmunoestimulantes aplicados en camarón.	4
Tabla IV. Participación de la acuicultura en el volumen total de la producción pesquera.	4
Tabla V. Principales enfermedades causadas por bacterias y virus en camarones penaeidos.	6
Tabla VI. Inmunoestimulantes aplicados en camarón.	7
Tabla VII. Función de las lectinas en los organismos.	18
Tabla VIII. Componentes del sistema inmune innato y adaptativo presentes en vertebrados e invertebrados.	20

LISTA DE ABREVIATURAS

THC	Conteo total de hemocitos
RHC	Conteo relativo de hemocitos
RPC	Contenido relativo de proteínas
SOD	Superóxido dismutasa
EC-SOD	Superóxido dismutasa extracelular
LPS	Lipopolisacárido
ROI	Intermediarios reactivos de oxígeno
RNI	Intermediarios reactivos de nitrógeno
ADN	Acido desoxirribonucleico
ARN	Acido ribonucleico
GPx	Glutación
ProPO	Profenoloxidasa
EaproPO	Enzima activadora de la profenoloxidasa
Ig	Inmunoglobulina
TLRs	Receptores toll like
Mhc	Complejo mayor de histocompatibilidad
IL	Interleucina
HSP	Proteína de shock térmico
TNF	Factor de necrosis tumoral

INTRODUCCIÓN

El camarón de cultivo

Su importancia económica

Dentro de la explotación de los recursos marinos, la captura y comercialización del camarón es una de las actividades económicas más rentables. En el Pacífico Mexicano habitan 3 especies de penaeidos que se explotan comercialmente: *Penaeus vannamei*, *Penaeus stylirostris* y *Penaeus californiensis*, siendo la más importante *P. vannamei* (Fig. 1), que se cultiva principalmente en Sinaloa, Nayarit y Baja California Sur, la cuál se caracteriza por preferir las salinidades bajas características de los esteros y *P. stylirostris*, que se cultiva principalmente en Sonora, debido a su alta resistencia y rápido crecimiento en temperaturas y salinidades extremas características de la zona.

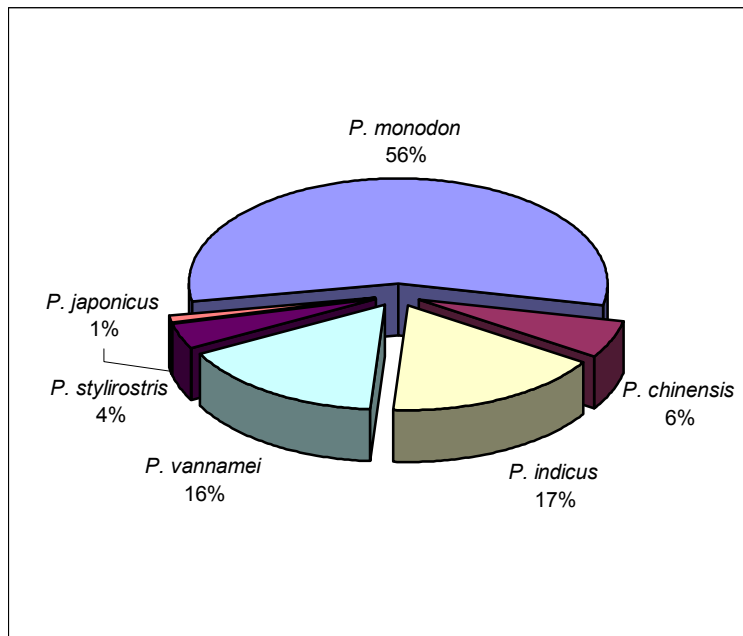


Figura 1. Producción global de especies de camarón del género *Penaeus*, por acuicultura (Rosenberry, 2001).

El atractivo mercado norteamericano ha estimulado en México el cultivo del camarón, perfilándose como una actividad productiva de gran importancia económica. Casi el 80% de camarón cultivado proviene de Asia, destacando como productores principales Tailandia, China, Indonesia e India (Tabla I). En Occidente, Ecuador es el mayor productor de camarón (Rosenberry, 1999). Sin embargo, debe de considerarse que

el cultivo de camarón es una actividad de alto riesgo donde la aparición y diseminación de enfermedades pueden afectar seriamente la producción (Vargas-Albores, 1995).

Tabla I. Principales países productores de camarón proveniente de la acuicultura. Tomado de Rosenberry (1999).

PAIS	PRODUCCION (Toneladas)	PRODUCCION RELATIVA (Porcentaje)	PRODUCTIVIDAD (Kg/ha)
Tailandia	200 000	24.6	2 500
China	110 000	13.5	610
Indonesia	100 000	12.3	290
India	70 000	8.6	540
Filipinas	40 000	4.9	670
Vietnam	40 000	4.9	200
Taiwan	20 000	2.5	4 000
Malasia	6 000	0.7	1 500
Irán	2 500	0.3	630
Australia	2 400	0.3	4 000
Otros (hemisferio Este)	51 850	6.4	520
Ecuador	85 000	10.4	850
México	35 000	4.3	3 000
Brasil	15 000	1.8	2 500
Nicaragua	4 000	0.5	670
Venezuela	4 000	0.5	2 000
Panamá	2 000	0.2	670
Estados Unidos	1 500	0.2	3 750
Otros países (hemisferio Oeste)	27 000	3.3	2 340
TOTAL	814 250	100	651

En México, la acuicultura es una actividad que ha crecido sostenidamente durante los últimos 10 años a un ritmo de 15 % anual (Salinas, 1999), de tal manera que en 2001, la producción total de camarón del país alcanzó el tercer lugar (48,014 toneladas) después de la producción de mojarra (68,476 toneladas) y ostión (50,565 toneladas) (Tabla II). La

acuicultura de camarón (Tabla III), representó en el 2001, el principal ingreso económico (2,738,018,000 pesos), superando los ingresos generados por la mojarra (523,564,000 pesos) y contribuyendo con mas del 45 % del volumen total de la producción pesquera de camarón a nivel nacional (Tabla IV). La producción de camarón en México encuentra su principal mercado en la exportación del producto a países como Estados Unidos, Japón y Europa, en los cuales prevalece una gran demanda por los productos del mar, superando sus producciones nacionales (Salinas, 2002).

Tabla II. Volumen (en toneladas) de la producción de acuicultura en peso vivo, según principales especies, 1992-2001. SAGARPA, 2001.

Año	Total	Bagre	Carpa	Camarón	Charal	Langostino	Lobina	Mojarra	Ostión
1992	169,396	4,219	28,393	8,326	7,498	2,411	1,311	76,964	32,151
1993	170,196	4,665	25,173	11,846	7,516	4,631	1,407	80,636	25,847
1994	171,389	2,606	18,848	13,138	2,665	68	1,470	75,541	33,479
1995	157,574	2,710	25,882	15,867	2,398	72	962	76,128	30,486
1996	169,211	3,282	29,537	13,315	1,281	112	782	79,154	37,776
1997	173,878	2,816	24,848	17,570	1,330	130	1,006	83,132	40,381
1998	159,781	2,470	24,659	23,749	878	61	686	70,392	33,486
1999	166,336	2,440	22,060	29,120	894	51	674	66,330	40,504
2000	188,158	2,851	24,240	33,480	866	60	638	71,702	49,710
2001	196,723	2,294	21,037	48,014	841	51	569	68,476	50,565

Tabla III. Participación de la acuicultura en el valor de la producción pesquera (miles de pesos), 2001. SAGARPA, 2001.

Especies	Valor de la Producción Nacional	Valor de la Producción de Acuicultura	Participación Nacional %
CAMARÓN	6,055,347	2,738,018	45.22
MOJARRA	583,728	523,564	89.69
CARPA	188,375	145,435	77.21
TRUCHA	182,102	144,203	79.19
OSTIÓN	110,819	94,161	84.97
BAGRE	50,644	34,523	68.17
LOBINA	16,909	11,895	70.35
CHARAL	8,447	4,864	57.59
LANGOSTINO	116,330	4,220	3.63
OTRAS	5,572,776	31,803	0.57
TOTAL	12,885,477	3,732,688	28.97

Tabla IV. Participación de la acuicultura en el volumen total de la producción pesquera (en toneladas), 2001. SAGARPA, 2001.

Especies	Volumen de Producción Nacional	Volumen de Producción por Acuicultura	Participación %
MOJARRA	74,031	68,476	92.50
OSTIÓN	52,799	50,565	95.77
CAMARÓN	105,523	48,014	45.50
CARPA	30,286	21,037	69.46
BAGRE	3,889	2,294	58.98
TRUCHA	6,332	3,309	52.27
CHARAL	1,273	841	66.06
LOBINA	818	569	69.53
LANGOSTINO	3,179	51	1.60
OTRAS	1,242,808	1,567	0.14
TOTAL	1,520,938	196,723	12.93

Enfermedades

En camarones penaeidos se han aislado bacterias del género *Vibrio* como causantes de enfermedades, principalmente *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. harveyi* (Garriques y Arévalo, 1995) y *V. penaeicida* (Aguirre-Guzmán y Ascencio-Valle, 2000). En la Tabla V se enlistan las principales enfermedades causadas por bacterias y virus en camarones penaeidos (Aguirre-Guzmán y Ascencio-Valle, 2000). En México, diversos virus han provocado dramáticas pérdidas en los cultivos: *Baculovirus penaei* en 1998, Infección hipodérmica y necrosis hematopoiética (IHHNV) entre 1989 y 1990, síndrome del Taura (TSV) a partir de 1995, y muy recientemente el síndrome de la mancha blanca (WSSV) y la enfermedad de la cabeza amarilla (YHV) surgen como amenazas potenciales para la salud de los cultivos (De la Rosa-Vélez, 2001).

En Países como Ecuador, las enfermedades en los tanques de cultivo han provocado pérdidas por 1000 millones de dólares en 1999-2000, desplomándose la producción en un 80% durante los primeros meses del 2000 (Salinas, 2001). En México, las enfermedades causaron mortalidades por encima de lo habitual, y originaron cosechas tempranas y por ende con tallas pequeñas causando una disminución de exportaciones por tallas chicas, que no tienen un mercado atractivo de exportación, significando una disminución en los ingresos del 22% en el año 2000. Estos ejemplos nos dan una idea de los efectos causados por las enfermedades microbianas en esta actividad y ponen de manifiesto la vulnerabilidad existente en este aspecto (Salinas, 2001).

En los cultivos intensivos, debido a la alta densidad de población, el desarrollo y la transmisión de patógenos es sumamente peligrosa. Además del uso de los antibióticos, el control del número de microorganismos se basa en la regulación de las características del agua, la cual puede controlar parcial y momentáneamente el problema infeccioso; pero no permite conocer la condición de salud de la población cultivada, por lo que podrían presentarse nuevos cuadros infecciosos (Lightner, 1985).

Tabla V. Principales enfermedades causadas por bacterias y virus en camarones penaeidos.

BACTERIAS	VIRUS
Vibriosis	Síndrome del Taura (TVS)
Enfermedad por bacterias filamentosas	Síndrome de la mancha blanca (WSSV)
Hepatopancreatitis necrosante	Infección hipodérmica y necrosis hematopoiética (IHHNV)
Enfermedad por bacterias quitinolíticas	Baculovirus (BP)
Enfermedad de las patas rojas	Enfermedad de la cabeza amarilla (YHV)
Micobacteriosis	Enfermedad por Iridovirus (IROD)
Infección por ricketzias	Enfermedad por Rhabdovirus (RPS)

Tratamiento y control

Algunos productos microbianos, conocidos como inmunoestimulantes (Tabla VI), además de activar el sistema inmune no-específico de los organismos, pueden ser utilizados como tratamiento alternativo a los antibióticos, agentes químicos y vacunas utilizados frecuentemente en acuicultura para la prevención de enfermedades. Algunos de estos inmunoestimulantes se han aplicado con éxito en estadios larvales, juveniles y adultos, tanto en peces como en camarón (Leonard *et al*, 1985; Vargas-Albores *et al*, 1998; Biswas, 1999; Holmblad y Söderhäll 1999).

Tabla VI. Inmunoestimulantes aplicados en camarón (Song y Huang, 2000).

	Hongos			Bacterias	
	<i>Saccharomyces Cerevisiae</i> (β -1,3,6-glucono)	<i>Schizyphylum Commune</i> (β -1,3-glucono)	<i>Vibrio alginolyticus</i>	<i>Vibrio alginolyticus</i> Muerto por calor	<i>Bifidobacterium lactofermentum</i> (peptidoglicano)
Hospedero	<i>P. monodon</i>	<i>P. monodon</i>	<i>P. monodon</i>	<i>P. stylirostris</i>	<i>P. monodon</i>
Efecto antivibriosis	+	+	+	+	+
Efecto antiviral	+	n.d.	n.d.	n.d.	+
Duración de la protección (días)	18	120	n.d.	120	20
Crecimiento	+	n.d.	n.d.	n.d.	+
Supervivencia	+	n.d.	n.d.	n.d.	+
Aumento en la actividad fagocítica	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	+
Tolerancia al estrés	+	n.d.	n.d.	+	+

El establecimiento de un cuadro infeccioso en el cultivo no se debe únicamente a un incremento numérico de patógenos, sino que es altamente dependiente de la condición fisiológica de los animales. Desgraciadamente, hasta la fecha no se conoce una metodología precisa capaz de definir el estado de susceptibilidad de los camarones hacia las infecciones. De poderse desarrollar, se tendría la ventaja de regular paulatinamente las condiciones del estanque, evitando el estrés de los animales y la aparición de la enfermedad. Una de las posibilidades es conocer los mecanismos de defensa de los camarones, entender como se ataca y elimina a los patógenos, qué componentes se incrementan en caso de infección y cuáles de ellos se pueden incrementar para darle un estado de inmunidad a los camarones (Vargas-Albores, 1995).

Sistema inmunitario de los crustáceos: respuesta inmune frente a bacterias

La respuesta inmune innata o inespecífica

La respuesta celular

Las células sanguíneas de invertebrados son los primeros efectores de la inmunidad celular no específica en el hospedero, además de participar en numerosos procesos del sistema inmune como fagocitosis, melanización, encapsulación, coagulación y la formación de nódulos (Söderhäll y Cerenius, 1992).

Fagocitosis

La fagocitosis es el mecanismo de defensa más común entre todos los animales, incluyendo invertebrados (Söderhäll y Cerenius, 1992; Vargas-Albores, 1995; Dyrzynda *et al*, 1995; Kondo *et al*, 1998). En crustáceos decápodos, las células sanguíneas, llamadas hemocitos, se han clasificado en 3 categorías: células hialinas, semigranulares y granulares, de las cuáles en las semigranulares y granulares se ha observado capacidad fagocítica (Söderhäll y Smith, 1983; Hose *et al*, 1990; Vargas-Albores, 1995, Le Moullac *et al*, 1997).

Al igual que en los mamíferos, la fagocitosis en invertebrados consiste de los siguientes pasos: quimiotaxis, adherencia, ingestión, destrucción del patógeno o diana y expulsión del material de desecho por exocitosis.

Las células fagocíticas destruyen a los organismos englobados mediante dos tipos de mecanismos de defensa, el aerobio y el anaerobio. El mecanismo aerobio está ligado al estallido respiratorio. Durante este proceso, empleando NADPH o NADH como dador de electrones, se reduce un electrón del oxígeno para formarse el radical superóxido (O_2^-), el

cual dismuta a peróxido de hidrógeno espontáneamente o por acción de la superóxido dismutasa (SOD), produciéndose una nueva molécula de oxígeno.

El mecanismo anaerobio es atribuido a la acción de diversas enzimas microbicidas, como lisozimas y moléculas de bajo peso molecular como péptidos antimicrobianos (Nappi y Ottaviani, 2000).

En hemocitos de penaeidos, se ha demostrado la activación del estallido respiratorio mediante antígenos microbianos de superficie como β -1,3 glucano (laminarina), lipopolisacáridos (LPS) zymosan (Song y Hsieh, 1994), péptidoglicanos (Itami *et al*, 1998), y de bacterias como *Vibrio vulnificus* y *V. parahaemolyticus* (Sung *et al*, 1996; Campa-Córdova *et al*, 2002). Algunos de estos antígenos, además de activar a los hemocitos, pueden aumentar su capacidad fagocítica para destruir a los patógenos (Song y Hsieh, 1994).

Intermediarios reactivos de oxígeno y nitrógeno

Cuando los microorganismos son fagocitados por los hemocitos, se generan sustancias microbicidas que incluyen intermediarios reactivos de oxígeno (ROI) altamente reactivos, como anión superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radical hidroxilo (OH^\cdot) e intermediarios reactivos de nitrógeno (RNI) como óxido nítrico y peroxinitrito (Roch, 1999); estas respuestas celulares son rápidas y transitorias (Figura 2).

La generación de ROI y RNI como moléculas microbicidas, representa una respuesta inmune innata evolutivamente antigua que se presenta tanto en plantas como en animales (Nappi y Ottaviani, 2000).

La producción de ROI y RNI por las células fagocíticas está mediada en parte por la enzima NADPH oxidasa y por la enzima óxido nítrico sintetasa (NOS), respectivamente. Otras enzimas que median la producción de ROI incluyen a la xantina oxidasa, glucosa oxidasa y enzimas involucradas en el metabolismo del ácido araquidónico y en el transporte de electrones mitocondrial (Nappi y Ottaviani, 2000).

Los RNI son derivados del óxido nítrico, el cuál es sintetizado a partir de la L-arginina por la NOS. La NOS se ha encontrado en equinodermos, nemátodos, anélidos, insectos, crustáceos y moluscos (Jacklet, 1997).

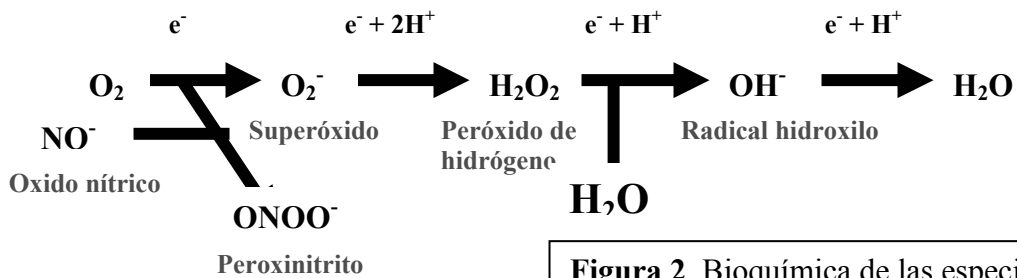


Figura 2. Bioquímica de las especies reactivas de oxígeno (ROI) y nitrógeno (RNI).

Enzimas antioxidantes

A pesar de que los ROI y los RNI se generan dentro de las células o de las vacuolas fagocíticas, una cantidad importante de estas moléculas es capaz de cruzar al ambiente extracelular y extravacuolar causando un daño potencial a las células (Warner, 1994).

Para prevenir este daño, los organismos utilizan estrategias de defensa antioxidantes que involucran componentes enzimáticos y no-enzimáticos. Los componentes no-enzimáticos son antioxidantes de bajo peso molecular como ascorbato, α -tocoferol, β -caroteno, flavonoides y vitamina E, que interactúan directamente con los ROI neutralizándolos. Los componentes enzimáticos incluyen superóxido dismutasas, catalasa y glutatión peroxidasa, que neutralizan a los ROI (Figura 3), o reparan el daño molecular en ácidos nucleicos, proteínas y lípidos (enzimas reparadoras de ADN, proteasas, lipasas, etc.) causado por los ROI (Warner, 1994). En síntesis, las superóxido dismutasas catalizan la conversión de dos moléculas de anión superóxido a peróxido de hidrógeno y oxígeno, el peróxido de hidrógeno, que también causa daño celular difundiendo libremente a través de la membrana celular hacia el ambiente extracelular, es eliminado principalmente por la catalasa y la glutatión peroxidasa (GPx).

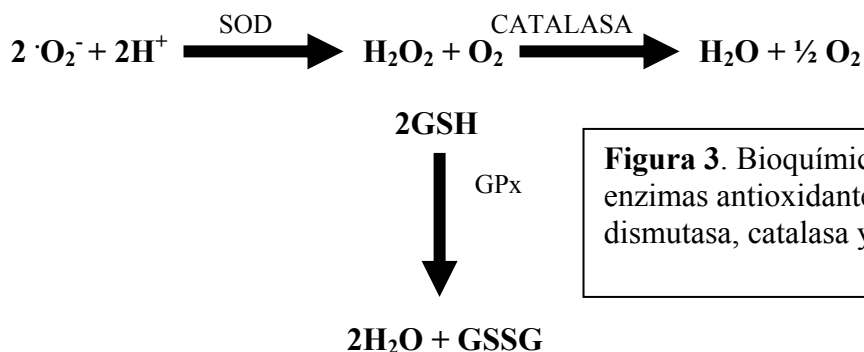


Figura 3. Bioquímica de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa, catalasa y glutatión

Las superóxido dismutasas (SOD) se han clasificado dependiendo de su contenido metálico. La manganeso superóxido dismutasa (Mn-SOD) se localiza en procariontas y mitocondria, la hierro superóxido dismutasa (Fe-SOD) en bacterias plantas y la cobre-zinc superóxido dismutasa (Cu/Zn-SOD) en el citosol de eucariotas. El cobre es esencial para la función catalítica de Cu/Zn-SOD y se piensa que el zinc juega un importante papel en la conformación estructural de la molécula (Fridovich, 1998). Folz y Crapo (1994), reportaron una superóxido dismutasa extracelular (EC-SOD) en mamíferos, cuya función principal es dismutar al anión superóxido liberado de las superficies celulares y regular la disponibilidad del óxido nítrico (Fridovich, 1998). Homblad y Söderhäll (1999) reportaron una EC-SOD en la langosta de agua dulce (*Carcinus maenas*) cuya función se relaciona con la cooperación en los procesos de fagocitosis y encapsulación de parásitos.

La catalasa es una enzima que transforma el H_2O_2 en agua y oxígeno. Esta enzima se localiza principalmente en los peroxisomas, pero también se ha detectado en el citoplasma y en la mitocondria (Radi *et al*, 1991, Kinnula *et al*, 1995).

La glutatión peroxidasa (GP_x) es una enzima dependiente de selenio, la cuál descompone el H_2O_2 y varios hidro- y lipo-peróxidos (Kinnula *et al*, 1995). La GP_x está dispersa a través del citoplasma, pero también se ha reportado actividad de la GP_x en mitocondria y fuera de la célula (Buettner, 1998; Yoshimura *et al*, 1994). Debido a que el selenio es esencial para la síntesis y actividad enzimática de la GP_x , la deficiencia severa de este elemento puede causar necrosis de hígado y enfermedades degenerativas en el corazón (Buettner, 1998).

El sistema antioxidante de los organismos aeróbicos ha sido desarrollado no solamente para evitar los efectos citotóxicos causados por el metabolismo celular, sino también para proteger a las células cuando se rompe el equilibrio entre la generación y eliminación de los ROI, conocido como estrés oxidativo (Neves *et al*, 2000; Downs *et al*, 2001). Las SOD son uno de los principales mecanismos de defensa en respuesta al estrés oxidativo causado por agentes contaminantes en el medio ambiente, a infecciones causadas por microorganismos, exposición de los organismos a hipoxia, a hiperoxia, a cambios de temperatura o a inmuoestimulantes (Fridovich, 1995; Neves *et al*, 2000). Es posible que estas moléculas antioxidantes jueguen un papel importante en la activación del sistema inmune, así como para prevenir la aparición de tumores, reducir el colesterol

en sangre y evitar enfermedades coronarias (Das *et al*, 2002). Algunos estudios como los realizados por Downs *et al* (2001) y Ellis (1996), enfatizan la importancia de las enzimas antioxidantes como moduladores de la respuesta inmune en organismos marinos, al incrementar los niveles de algunas enzimas antioxidantes y moléculas del sistema inmune mediante pruebas de estrés. Holmblad y Söderhäll (1999) reportaron una superóxido dismutasa extracelular en el cangrejo (*Pacifastacus leniusculus*) con la propiedad de ayudar a la peroxinectina, que funciona como opsonina, a generar compuestos tóxicos para eliminar a los patógenos.

Melanización

En camarón, como en otros crustáceos, la melanización es una manifestación común en invertebrados, cuyo proceso está comprendido por una cascada de reacciones enzimáticas conocido como sistema profenoloxidasa (proPO). El sistema proPO puede ser activado en forma natural por componentes microbianos, como son los β -glucanos de hongos, los péptidoglicanos y los lipopolisacáridos (LPS) bacterianos (Vargas-Albores, 1995). Durante su activación, la proPO es convertida a fenoloxidasa (PO), por acción de una proteinasa llamada enzima activadora de la profenoloxidasa (EaproPO). La PO promueve la oxidación de fenoles a quinonas, que se polimerizan de manera no-enzimática formando depósitos insolubles de melanina, que pueden ser observados como manchas oscuras en el caparazón de los camarones (Holmblad y Söderhäll, 1999). En camarón, ambas enzimas (proPO y EaproPO) se encuentran en forma inactiva en los gránulos de los hemocitos (Vargas-Albores, 1995).

Aunque a la melanina se le han atribuido propiedades microbicidas, durante la generación de quinonas se producen otros agentes microbicidas importantes, como anión superóxido y radicales hidroxilo (Nappi *et al*, 1995; Vargas-Albores *et al*, 1998).

Además de su papel en la melanización, el sistema proPO está involucrado en algunas reacciones celulares de defensa como son, la fagocitosis, la formación de nódulos, la encapsulación, la adhesión y la locomoción de hemocitos (Vargas-Albores, 1995).

Encapsulación

Cuando un parásito es demasiado grande para ser fagocitado, varios hemocitos colaborarán para retirar de circulación a la partícula extraña; este proceso de encapsulación se ha observado en crustáceos y en otros artrópodos (Söderhäll y Cerenius, 1992).

En crustáceos, se ha observado que los hemocitos semigranulares son los responsables de reconocer las moléculas de cualquier organismo invasor encapsulándolo mediante una proteína de 76 kD que funciona como opsonina, y que además esta asociada con la activación del sistema profenoloxidasa. Esta proteína multifuncional puede actuar como un factor de adhesión para células granulares y semigranulares, como un factor de degranulación para células granulares y semigranulares, y como un promotor de encapsulación (Söderhäll y Cerenius, 1992).

Formación de nódulos.

Cuando el organismo hospedero es invadido por un gran número de microorganismos, éstos están presentes en exceso y no pueden ser removidos por fagocitosis. Por este motivo, la formación de nódulos es un mecanismo eficiente empleado en invertebrados, incluyendo crustáceos (Söderhäll y Cerenius, 1992). El resultado de este proceso conlleva a atrapar a los microorganismos en varias capas de hemocitos, con la consiguiente activación del sistema profenoloxidasa y una posterior melanización de los microorganismos. Mediante este proceso, los microorganismos son removidos rápidamente de circulación, alojándose en branquias y entre los túbulos hepatopancreáticos (Söderhäll y Cerenius, 1992).

Coagulación.

El sistema de coagulación de la hemolinfa es una respuesta de defensa esencial en crustáceos. Previene pérdida de sangre (hemolinfa) a través de heridas en el exoesqueleto y la diseminación de bacterias a través del cuerpo (Song y Huang, 1999; Montaña-Pérez *et al*, 1999). La hemolinfa coagula mediante una cascada enzimática en la que intervienen enzimas proteolíticas que finalmente hidrolizan una proteína llamada coagulígeno. El coagulígeno es transformado a coagulina y posteriormente se polimeriza para conformar

el coágulo (Montaño-Pérez *et al*, 1999). La proteína involucrada en la coagulación en camarones penaeidos es denominada proteína coaguladora (CP) que se encuentra en el plasma. La polimerización de CP se lleva a cabo mediante la acción de la enzima transglutaminasa (TGasa) en presencia de calcio. La TGasa en crustáceos se encuentra en el interior de las células hialinas y es liberada al plasma por daño tisular o como respuesta de los hemocitos ante la presencia de LPS y β -1,3-glucanos (Martin *et al*, 1991; Yeh *et al*, 1998; Montaño-Pérez *et al*, 1999).

Montaño-Pérez *et al* (1999) describieron tres mecanismos de coagulación de la hemolinfa en crustáceos. La coagulación de tipo A, caracterizada por una rápida aglutinación de hemocitos sin coagular el plasma. La de tipo B involucra la agregación celular acompañada una limitada coagulación del plasma y la de tipo C, manifiesta una franca solidificación del plasma. Los camarones penaeidos presentan el sistema de coagulación tipo C (Yeh *et al*, 1998).

Receptores de membrana.

El reconocimiento de los microbios patógenos por las células del sistema inmune en invertebrados, seguido por la inducción de una respuesta inmune efectiva, es esencial para la supervivencia de la mayoría de los organismos multicelulares. Actualmente, es poco el conocimiento adquirido respecto al mecanismo de comunicación célula a célula durante la respuesta inmune en invertebrados (Nappi y Ottaviani, 2000).

El sistema inmune innato identifica los agentes infecciosos mediante receptores celulares, los cuales son proteínas que se unen a macromoléculas de patógenos microbianos. Una familia de receptores, llamada receptores toll, fue originalmente identificada y descrita en la mosca de la fruta *Drosophila sp.* como receptores necesarios para el desarrollo dorso-ventral durante la embriogénesis, y en adultos como activadores de la respuesta inmune antifungal. Los receptores toll homólogos a los toll de *Drosophila* son llamados receptores toll-like (TLRs) (Hashimoto *et al*, 1988).

Los receptores toll de *Drosophila* y de mamíferos son proteínas transmembranales que no solo detectan la presencia de una infección, sino que también discriminan entre diferentes clases de patógenos (Bowie y O'Neill, 2000). El papel que desempeñan en el sistema de defensa del hospedero los receptores toll TLR2 y TLR4, sugiere que el TLR2

es más importante para la respuesta inmune a levaduras y bacterias gram-positivas, mientras que el TLR4 tiene como papel principal responder a bacterias gram-negativas, teniendo como vía de reconocimiento al LPS (Bowie y O'Neill, 2000).

Aproximadamente 16 receptores toll-like se han reportado en humanos y cada uno de ellos parece reconocer un componente diferente de bacterias u hongos, y colectivamente probablemente puedan reconocer todos los microbios. Los TLRs son la base del reconocimiento inmune innato, como las inmunoglobulinas y las células T que son la base en el reconocimiento adquirido (Beutler, 2001).

Los homólogos toll de *Drosophila* han sido descritos como partícipes en el sistema de defensa en humanos, ratones, invertebrados y plantas. Las proteínas toll representan un mecanismo de defensa que ha sido conservado durante millones de años de evolución. Por lo tanto, su estudio enfatiza la importancia de los receptores toll en el sistema inmune innato de los organismos (Janeway y Medzhitov, 2000).

Respuesta humoral.

Dependiendo del tipo de acción que ejercen sobre los patógenos, en el plasma de crustáceos se encuentran sustancias inhibitoras del crecimiento bacteriano, inhibidores enzimáticos, sustancias causantes de lisis celular, aglutininas y precipitinas (Bachère *et al*, 2000).

Péptidos antimicrobianos.

Los péptidos antimicrobianos son moléculas encontradas tanto en plantas como en animales (vertebrados e invertebrados) que actúan como antibióticos endógenos y son considerados como elementos clave de la inmunidad innata (Destoumieux *et al*, 2000). Los péptidos antimicrobianos son sustancias producto de las reacciones del sistema inmune desarrollados por los organismos vivos para combatir infecciones causadas por microorganismos (Bachère *et al*, 2000). Hasta la fecha, se han descrito una amplia variedad de péptidos antimicrobianos. Se han clasificado basándose en su secuencia de aminoácidos, su estructura secundaria y similitudes funcionales (Bullet *et al*, 1999).

La producción de péptidos antimicrobianos es un mecanismo distribuido ampliamente entre el reino animal, el cuál está presente en bacterias, protozoarios,

invertebrados o vertebrados y en plantas. Estos efectores de la inmunidad innata se caracterizaron originalmente en insectos. En la mayoría de los casos, el modo de acción de los péptidos antimicrobianos es perforar las membranas microbianas, aunque otros péptidos interrumpen la biosíntesis de membrana, resultando en una posterior muerte celular (Destoumieux *et al*, 2000).

Los péptidos antimicrobianos son producidos en células fagocíticas de vertebrados, invertebrados y tunicados. También se han encontrado en diferentes tejidos como el epitelio intestinal de mamíferos o en el cuerpo graso de insectos (equivalente al hígado en mamíferos).

En camarón blanco (*P.vannamei*), se han caracterizado tres péptidos antimicrobianos clasificados como penaeidinas, los cuáles fueron aislados de los gránulos del citoplasma en hemocitos granulares y semigranulares (Destoumieux *et al*, 2000). Adicionalmente, se ha comprobado que las células hialinas pueden secretar penaeidinas al plasma como lo hacen las células del cuerpo graso en insectos (Meister *et al*, 1997). Al demostrarse que los hemocitos son el sitio de producción y almacenamiento de estos péptidos, se sugiere que su presencia en el plasma de camarón es el resultado de su secreción o liberación al degranular los hemocitos como resultado de una estimulación o por estrés (Bachère *et al*, 2000). La actividad antimicrobiana de penaeidinas está dirigida predominantemente contra bacterias gram-positivas y hongos.

Se ha comprobado que la presencia de péptidos antimicrobianos en diferentes tejidos tiene una importante interacción entre la función inmune y el desarrollo del exoesqueleto en camarón. Esta posible propiedad multifuncional de los péptidos antimicrobianos representa una nueva e importante área de investigación (Bachère *et al*., 2000).

Lisozimas.

La lisozima es una enzima presente en todos los organismos vivos, asociada con el mecanismo de defensa y con el sistema digestivo, donde su principal función es la degradación de bacterias para su nutrición (Viana y Raa, 1992). De acuerdo a su función, la lisozima es definida como una enzima que actúa contra los agentes infecciosos de varias formas, pero principalmente atacando a los mucopolisacáridos presentes en la

pared celular de las bacterias gram-negativas (Lie *et al*, 1989). No obstante, algunas lisozimas también presentan alguna actividad esterasa o quitinasa (Viana y Raa, 1992).

Las enzimas lisozomales participan en la muerte y degradación de microorganismos dentro y fuera de los hemocitos (Carajaraville *et al*, 1995) o modificando la conformación molecular de la superficie celular de microorganismos patógenos, favoreciendo el reconocimiento de dichos patógenos por las células fagocíticas (Cheng, 1983). Además, las enzimas lisozomales participan durante la fagocitosis matando y degradando partículas fagocitadas, y en algunos casos, son liberadas de la célula del hospedero hacia el plasma u otros tejidos para degradar partículas invasoras (Cheng, 1992).

Lectinas.

Las lectinas son proteínas no-enzimáticas o glicoproteínas que reconocen a carbohidratos. Debido a sus propiedades de opsonización y a su habilidad para aglutinar células, las lectinas de invertebrados son vistas como moléculas de reconocimiento primitivas (Nappi y Ottaviani, 2000).

Algunos estudios han demostrado la habilidad de las lectinas de invertebrados para aglutinar e inmovilizar patógenos y parásitos, lo que facilita una posterior eliminación de estos organismos por fagocitosis o encapsulación. Se ha visto que algunas lectinas endógenas de invertebrados promueven la activación del sistema proPO (Ratcliffe *et al*, 1991). La función que realizan las lectinas depende del tipo de organismo en el que estén presentes (Tabla VII).

Tabla VII. Función de las lectinas en los organismos

ORGANISMO	FUNCION
MICROORGANISMOS (Bacterias, virus, hongos, parásitos)	<ul style="list-style-type: none">• Determinar la patogenicidad de bacterias y de parásitos• Reconocimiento de determinantes no inmunes en la fagocitosis.• Reconocimiento de determinantes de la adhesión celular.
PLANTAS	<ul style="list-style-type: none">• Unión de bacterias fijadoras de nitrógeno en leguminosas.• Protección contra fitopatógenos.
ANIMALES	<ul style="list-style-type: none">• Regulación de migración y adhesión celular.• Endocitosis y translocación intracelular de glicoproteínas.• Reconocimiento de la adhesión no inmune en la fagocitosis.• Unión de las bacterias a células epiteliales.

Citocinas

En vertebrados, las citocinas están involucradas en muchos aspectos de la respuesta inmune, como son la activación, la proliferación y la diferenciación de linfocitos B y T, la activación y expansión de células asesinas naturales y de células T citotóxicas, la activación de fagocitos mononucleares y el reclutamiento de células inmunocompetentes en los sitios de infección (Taylor y Hoole, 1995).

En invertebrados, las citocinas son producidas por células del sistema inmune, siendo clave en la inducción de los mecanismos efectores que median las respuestas antimicrobianas. Algunos análogos funcionales de las citocinas en vertebrados, conocidas como citocinas-like, incluyen las interleucinas IL-1, IL-2, IL-6 y TNF- α (factor de necrosis tumoral alfa), que han sido identificadas en diferentes grupos de invertebrados como anélidos, tunicados, moluscos y equinodermos (Cooper *et al*, 1996; Ottaviani y

Franceschi, 1997). Se ha comprobado que estas citocinas-like comparten funciones biológicas similares a las de los vertebrados (Nappi y Ottaviani, 2000).

Una familia de proteínas conocidas como proteínas de estrés (HSP) o chaperoninas, son capaces de proteger o restaurar proteínas que han sido dañadas por estar expuestas a altas temperaturas o a otros factores estresantes (Frankenberg *et al*, 2000). Esto sugiere que dichas HSP podrían utilizarse como útiles modelos en estudios de estrés por calor, hipoxia, inmunoestimulación o por contaminantes (Clegg *et al*, 1998).

La respuesta inmune adquirida o específica

La respuesta inmune adaptativa en invertebrados ha sido tema de estudio debido al creciente interés que existe, particularmente en crustáceos, en el desarrollo de estrategias inmunoprotectoras contra organismos patógenos (Kenkyu, 1994). En la Tabla VIII se muestran los mecanismos de defensa reportados para invertebrados y vertebrados.

La respuesta inmune adquirida o de memoria es aquella que se presenta en distinta forma y función que la respuesta primaria (Kaattari, 1994).

Hasta el momento, se asume que la inmunidad adquirida está ausente en invertebrados debido a que no se ha comprobado la presencia de inmunoglobulinas (Ig), de receptores T (TCR) y del complejo mayor de histocompatibilidad (Mhc) (Arala-Chaves y Sequeira, 2000). En vertebrados, la activación de las células T promueve la proliferación celular, la producción de Ig y citocinas, y la generación de células B de memoria (Banchereau *et al*, 1994).

Tabla VIII. Componentes del sistema inmune innato y adaptativo presentes en vertebrados e invertebrados. Abreviaciones: IgM, Inmunoglobulina M; NK, Células asesinas naturales; +, Presencia; -, Ausencia.

	Inmunidad Innata		Inmunidad Adaptativa	
	Fagocitos	Células NK	Anticuerpos	Linfocitos T y B
Invertebrados	Protozoarios	+	-	-
	Esponjas	+	-	-
	Anélidos	+	+	-
	Artrópodos	+	-	-
Vertebrados	Elasmobranquios (tiburones, rayas, pez guitarra)	+	+	+ (solo IgM)
	Teleósteos (peces comunes)	+	+	+ (IgM, otros?)
	Anfibios	+	+	+ (2 o 3 clases)
	Reptiles	+	+	+ (3 clases)
	Aves	+	+	+ (3 clases)
	Mamíferos	+	+	+ (7 u 8 clases)

En invertebrados, la mayoría de los estudios de respuesta inmune se han hecho en insectos (Medzhitov *et al*, 1997). En un estudio con la mosca de la fruta *Drosophila sp.*, se comparó la proliferación celular de hemocitos (HPR) después de un reto sencillo y de un segundo reto con hongos, observándose que después del segundo reto se incrementó significativamente la HPR, aunque el incremento en la respuesta secundaria observada en *Drosophila* es mucho menor que la obtenida en vertebrados (Arala-Chaves y Sequeira, 2000).

En *P. japonicus* se observó un incremento significativo en HPR después del segundo reto con hongos, comparado con la respuesta inmune obtenida al ser retado en una sola ocasión (Sequeira *et al*, 1999).

Por lo descrito anteriormente, la hipótesis de este estudio esta enfocada en la determinación de las respuestas oxidativas (producción de anión superóxido) y antioxidantes (actividad de la SOD) en *P. vannamei*, y en este sentido, se discute la posibilidad de que estos efectores sean utilizados como indicadores de la activación del sistema inmune innato inducida por algunos inmunoestimulantes como son, β - glucano, LPS, fucoidán y una bacteria patógena viva o muerta por calor, y además se determina si estos inmunoestimulantes son capaces de inducir respuestas inmunes de magnitud diferente.

OBJETIVO DEL TRABAJO

El objetivo del presente trabajo es contribuir al conocimiento de la respuesta inmune del camarón blanco (*P. vannamei*), a través de:

- Determinación de anión superóxido y óxido nítrico en hemocitos de *P. vannamei* activados con β - glucano, polisacárido sulfatado y *V. parahaemolyticus* vivo.
- Determinación de la actividad de la enzima superóxido dismutasa en hemocitos y músculo de *P. vannamei* activados con β - glucano y polisacárido sulfatado
- Determinación de la actividad de la enzima superóxido dismutasa en juveniles de *P. vannamei* activados con β - glucano, LPS, fucoidán y *V. penaeicida* muerto por calor.

RESULTADOS

Para conocer la respuesta oxidativa y antioxidante del camarón blanco *P. vannamei* en respuesta a la activación su sistema inmune por inmersión en β -glucano, polisacárido sulfatado y *V. parahaemolyticus* vivo, se determinaron los siguientes parámetros: generación de anión superóxido en hemocitos, actividad de la enzima superóxido dismutasa en hemocitos y en músculo, conteo de hemocitos circulantes, contenido de proteína soluble en hemocitos y en músculo. La descripción detallada de la metodología utilizada, así como de las figuras obtenidas serán referidas por los números romanos de los dos primeros manuscritos generados de esta información.

Generación de anión superóxido.

Para evaluar la respuesta oxidativa generada en *P. vannamei*, se determinó la generación de anión superóxido y óxido nítrico en hemocitos activados con β -glucano (0.5 mg/l) y polisacárido sulfatado (1 μ g/l), para lo cuál se sumergieron los organismos en los tratamientos durante 1, 3 y 6 h (Anexo I), con el fin de establecer el tiempo de inmersión adecuado para la activación y respuesta de los hemocitos.

Para la determinación de óxido nítrico se utilizó la metodología descrita por Espinosa *et al* (2002), encontrando valores cercanos a cero.

La generación de anión superóxido en hemocitos de camarón se incrementó entre 1.5 y 2.0 veces mas 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. 1 A, Anexo I).

La respuesta inmune de los camarones tratados con *V. parahaemolyticus* vivo fue más rápida que con β -glucano y polisacárido sulfatado (Fig. 1 A, Anexo I), pues alcanzó un valor de 1.5 veces mayor que el control al tiempo 0, obteniéndose su máximo valor 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.

La exposición de los organismos al β -glucano y polisacárido sulfatado durante 1 y 3 horas, generó la máxima respuesta oxidativa entre las 24 y 48 horas post-reto (Fig. 1 B, Anexo I). La exposición durante 6 horas, nos permitió observar dos incrementos en la respuesta respecto al grupo control, a las 24 y 48 horas post-reto (Fig. 2 A, Anexo I).

Se comparó la respuesta oxidativa entre los hemocitos activados 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 B, Anexo I).

Actividad de la enzima Mn-SOD.

La actividad de la enzima Mn-SOD en músculo y en hemocitos se utilizó como parámetro de medición de la respuesta inmune de camarones adultos de *P. vannamei* al exponerse por inmersión a β -glucano y polisacárido sulfatado durante 3 y 6 horas (Anexo I y II). Una vez expuestos los organismos a los tratamientos, se determinó la actividad de la enzima en músculo cada 24 horas (0, 24, 48, 72 y 120 h), encontrando la máxima actividad a las 24 horas post-reto (Fig. 3 A y 3 B, Anexo I). Adicionalmente, se registró un decremento en la actividad de la enzima respecto al grupo control entre las 36 y las 48 horas posteriores al reto, recuperando los valores basales a las 72 horas (Fig. 3 A y 3 B, Anexo I).

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 C y 1 B, Anexo I y II, respectivamente). 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. 1 B, Anexo II).

Los siguientes resultados serán referidos al anexo III, en el cuál se diseñó un bioensayo con juveniles (entre 0.7 y 1.2 g) de camarón blanco *P. vannamei* para determinar la actividad de la enzima SOD en respuesta a la activación de su sistema

inmune utilizando β -glucano, LPS, fucoidán y una cepa de *V. penaeicida* muerto por calor. Los organismos fueron expuestos a los tratamientos por inmersión durante 6 horas. Después de 10 días de la exposición con los inmunoestimulantes, los juveniles se retaron con *V. penaeicidae* vivo durante 2 h.

La actividad de la enzima se incrementó significativamente ($p < 0.05$) a las 48 h posteriores al reto con los inmunoestimulantes (Fig. 1, Anexo III) y disminuyó debajo de los valores control de las 72 a las 96 h en todos los tratamientos. Los camarones retados con fucoidán, no mostraron un incremento significativo ($p > 0.05$) en la actividad de la Mn-SOD durante el experimento.

La Fig. 2, Anexo III, muestra la respuesta antioxidante de los juveniles previamente expuestos a los inmunoestimulantes y a un reto posterior con *V. penaeicidae* vivo. Se expuso un grupo de camarones denominado control positivo (sin previa inmunoestimulación) a la bacteria patógena viva y otro denominado control negativo, el cual no se expuso a la bacteria. El control positivo mostró un incremento significativo ($p < 0.05$) en la actividad de la enzima a las 2 h posteriores del reto y el grupo de camarones tratados con β -glucano, y fucoidán, mostró un incremento significativo ($p < 0.05$) en la actividad de la Mn-SOD a las 48 h (Fig. 2, Anexo III). Los camarones expuestos al β -glucano, incrementaron la respuesta antioxidante después del segundo reto (2.5 veces mayor que el grupo control. Fig. 2, Anexo III) que después del primero (2 veces mayor que el control. Fig. 1, Anexo III). Además, los juveniles tratados con fucoidán no presentaron incremento en la actividad de la Mn-SOD antes del reto con la bacteria viva (Fig. 1, Anexo III), pero se presentó un incremento significativo ($p < 0.05$) después del segundo reto (Fig. 2, Anexo III). Los camarones del control positivo y los expuestos al LPS mostraron una respuesta antioxidante más temprana (a las 2 h) que los grupos tratados con β -glucano, y fucoidán (48 h), además, se observaron valores antioxidantes similares en los camarones del grupo control positivo y los del β -glucano (Fig. 2, Anexo III). En la Fig. 1, Anexo III, los camarones expuestos a los inmunoestimulantes (excepto los tratados con fucoidán), mostraron un incremento significativo ($p < 0.05$) en la actividad de la enzima Mn-SOD a las 48 h después del reto, pero no mostraron una mayor respuesta antioxidante (excepto los tratados con β -glucano) después del segundo reto hecho con la bacteria viva (Fig. 2, Anexo III).

Comparando los valores de la respuesta antioxidante entre los grupos de camarones tratados con inmunoestimulantes, observamos que el grupo expuesto a *V. penaeicidae* muerto por calor, registró la mayor respuesta (3 veces más que el control) a las 48 h después del reto (Fig. 1, Anexo III).

Contenido de proteína.

La concentración de proteína (RPC) en músculo de *P. vannamei* no presentó variaciones significativas ($p > 0.05$) al exponer a los organismos al β -glucano y al polisacárido sulfatado durante 6 horas (Fig. 2 A, Anexo II).

Los resultados encontrados del contenido proteico en hemocitos de camarón al utilizar doble activación con β -glucano, mostraron un incremento de 1.4 veces respecto al control a las 48 horas, alcanzando diferencias significativas ($p < 0.05$) en los valores de los tratamientos a las 72 y 120 horas respecto a los valores del grupo control (Fig. 2 B, Anexo II). La concentración de proteína en hemocitos activados en una sola ocasión (0 horas) presentó valores significativos ($p < 0.05$) 1.6 veces superiores al control a las 120 horas posteriores al reto con β -glucano (Fig. 2 B, Anexo II). Podemos observar que la doble activación de los camarones con β -glucano, permite alcanzar un incremento más rápido en los valores de la proteína soluble en hemocitos que utilizando una sola activación.

Los siguientes resultados (referidos en el anexo III) proceden de un bioensayo realizado con juveniles de camarón blanco *P. vannamei* (entre 0.7 y 1.0 g), exponiéndolos por inmersión durante 6 h a β -glucano, fucoidán, lipopolisacárido y *V. penaeicida* muerto por calor, con el propósito de determinar la variación en el RPC cada 24 h durante 4 días. Después de 10 días de la exposición con los inmunoestimulantes, los juveniles se retaron con *V. penaeicidae* vivo durante 2 h.

La exposición de juveniles de camarón blanco a diferentes inmunoestimulantes durante 6 h (Fig.3, Anexo III) presenta un incremento general en el RPC a las 24 h posteriores al reto. El RPC en los camarones expuestos al β -glucano y fucoidán, se incrementó significativamente ($p < 0.05$) desde las 24 a las 72 h post-reto (Fig. 3, Anexo III). Comparando el incremento en el RPC entre los camarones tratados, se observó que los expuestos al β -glucano presentaron los valores más altos a las 72 h (3 veces mayor

que el grupo control). Los juveniles expuestos a los inmunoestimulantes presentaron valores basales (cerca de los presentados por el grupo control) de RPC dentro de las primeras 6 h y los valores más bajos de RPC se registraron en los camarones tratados con LPS a las 48 h, con β -glucano y con *V. penaeicida* muerto por calor a las 96 h (Fig. 3, Anexo III).

Como se mencionó anteriormente, después de 10 días de la exposición con los inmunoestimulantes, los juveniles se retaron con *V. penaeicidae* vivo durante 2 h (Fig. 4, Anexo III), encontrando en el grupo control positivo, un incremento significativo ($p < 0.05$) en el RPC desde las 2 a las 24 h después del reto con la bacteria viva. Los juveniles tratados previamente con los inmunoestimulantes, no presentaron un incremento significativo ($p > 0.05$) en el RPC después del reto con *V. penaeicidae* vivo, al menos durante las primeras 48 h (Fig. 4, Anexo III).

Hemocitos circulantes.

El conteo de hemocitos circulantes en hemolinfa, muestra la misma tendencia que el contenido de proteína soluble en hemocitos (Fig. 5 y 3, Anexo I y II, respectivamente). Esto es, el incremento no significativo ($p > 0.05$) en los hemocitos circulantes se obtuvo a las 72 h posteriores al reto utilizando una o doble activación con β -glucano (Fig. 3, Anexo II). 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 superiores no significativos para $p < 0.05$ (1.9 veces respecto al control) a los valores observados en los tratamientos con doble activación (1.6 veces respecto al control).

DISCUSION

Muchos factores celulares y humorales han sido estudiados con el objeto de poder ser utilizados como indicadores efectivos de la eficiencia de inmunoestimulantes potenciales (Hennig *et al*, 1998; Sritunyaluckasana *et al*, 1999). Existen reportes previos del mejoramiento de la supervivencia de camarón a bacterias patógenas después de ser retados con inmunoestimulantes (Itami *et al*, 1998; Takahashi *et al*, 1998; Sritunyalucksana *et al*, 1999), pero es poco el conocimiento con relación a las respuestas celulares y humorales del camarón hacia los inmunoestimulantes (Vargas-Albores, 1995).

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 y 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 (Sung *et al*, 1994; Adema *et al*, 1991).

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 y 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 *et al* (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 cuál dependió del tipo de tratamiento suministrado (Anexo I, Figura 1 A).

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 (Itami *et al*, 1998). 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 (Sung *et al*, 1994; Muñoz *et al*, 2000; Downs *et al*, 2001).

La capacidad fagocítica de las células hialinas del cangrejo *C. maenas* fue confirmada con la detección del estallido respiratorio en estas células (Bell y Smith, 1993). Encontraron diferentes respuestas inmunes en las células hialinas causadas por los activadores utilizados. Tal fue el caso de la laminarina, quien falló en la activación del estallido respiratorio en *C. maenas*. En nuestro estudio, la activación de los hemocitos de *P. vannamei* para la generación del óxido nítrico falló con el uso de laminarina como activador. Espinosa *et al* (2002) midió la producción de óxido nítrico en hemocitos del camarón *P. schmitti* utilizando como activador al LPS.

Este estudio no explora cuanto tiempo se mantiene la respuesta oxidativa en camarón como respuesta a una activación con inmunoestimulantes. Sung *et al* (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 *et al* (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 *et al* 1998; Alabi *et al*, 1999).

Las superóxido dismutasas son una de las principales rutas de defensa antioxidante en respuesta a estrés oxidativo (Fridovich, 1995). 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. En contraste, el óxido nítrico y el peroxinitrito son sustancias microbicidas conocidas como intermediarios reactivos de nitrógeno (RNI) y su producción en las células mejora la respuesta inmune innata.

En camarones adultos, el incremento en RPC a las 48 h posteriores al reto con inmunoestimulantes (anexo II), pudo deberse al incremento en las proteínas involucradas en estrés (Jennissen, 1995). Rodríguez *et al* (2000) reportaron *P. vannamei*, variaciones hasta de un 40% en el contenido total de proteína en plasma respecto a los valores control, al someter a los organismos a diferentes niveles de proteína. Chu y La Pierre (1989) encontraron variaciones similares en el contenido total de proteína en hemocitos del ostión *Crassostrea virginica* cuando los organismos fueron expuestos a diferentes niveles de infección con el parásito *Perkinsus marinus*. Por otro lado, Karunasagar *et al* (1999) sugirió que ciertas proteínas son inducidas después de un previo tratamiento con inmunoestimulantes. Rodríguez *et al* (2000) encontraron que los camarones alimentados con 50% de proteína en la dieta, incrementaron los niveles de aglutinina, α_2 -macroglobulina y factor de coagulación. Downs *et al* (2001) reportó incrementos en los niveles de Mn-SOD, glutatión, chaperoninas y ubiquitina en el camarón *P. pugio* después de someterlo a estrés por calor, específicamente en respuesta a la proteína incrementada y a la desnaturalización (Ellis, 1996), indicando que la mitocondria estuvo experimentando y respondiendo al estrés oxidativo. Fridovich (1995) reportó que los niveles incrementados en Mn-SOD provee tolerancia a los factores que inducen estrés oxidativo, y más aún, la Mn-SOD es un indicador específico de que la mitocondria está experimentando estrés oxidativo. De acuerdo con estos autores, el incremento en la

actividad de la Mn-SOD en los hemocitos de *P. vannamei* puede promover la generación de otras inmunoproteínas después de las 48 horas posteriores al reto (anexo II).

El incremento en THC está relacionado con el estatus nutricional del camarón. Le Moullac *et al* (1999) encontró 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%. Rodríguez *et al* (2000) concluyeron que la concentración de proteínas plasmáticas podría ser considerada como un indicador del estado de salud en camarón.

Se ha reportado la utilización de THC como un potencial indicador del estado inmune del camarón (Hennig *et al*, 1998; Le Moullac *et al*, 1998; Lorenzon, *et al*, 1999). El incremento en THC y en el contenido de proteína en hemocitos después de 48 horas post-reto puede relacionarse con un efecto protector del sistema inmune del camarón contra patógenos potenciales (Chisholm y Smith, 1995), considerando que las respuestas celulares son las principales herramientas inmunes en invertebrados (Truscott y White, 1990; Johansson y Söderhäll, 1992; Sequeira *et al*, 1996). En contraste, Le Moullac *et al* (1997) encontró en *P. stylirostris* una correlación entre la resistencia a la vibriosis y la actividad de la fenoloxidasas, pero no con el THC durante el ciclo de muda.

Los hemocitos juegan un papel importante en la remoción de bacterias presentes en la hemolinfa, principalmente por fagocitosis (Ratner y Vinson, 1983). El decremento en RHC observado a las 6 y 24 h seguidas a la inmersión del camarón en los inmunoestimulantes (anexo II, Figura 3) puede ser asociada al estrés oxidativo y a la posibilidad de susceptibilidad del camarón a los patógenos potenciales (Johansson y Söderhäll, 1992). Por otro lado, Sequeira *et al* (1996) concluyó que un decremento en el THC en respuesta al reto con bacterias, es compensado por un incremento posterior.

En crustáceos, el THC es un indicador de estrés, pero varía no-específicamente de acuerdo a los ritmos naturales del medio, tales como, el estrés químico y el fisico-químico, como por ejemplo, las respuestas de adaptación del camarón a la hipoxia (Hill *et al*, 1991). La respuesta del camarón *P. stylirostris* expuesto a hipoxia severa ($1\text{mg O}_2\text{ mL}^{-1}$), se midió en términos de THC por Le Moullac *et al* (1998). La hipoxia indujo una disminución significativa en THC con un decremento significativo de células semi-

granulares y hialinas. En *P. monodon*, la actividad fagocítica de los hemocitos fue menos eficiente en los camarones expuestos a hipoxia (Direkbusarakom y Danayadol, 1998).

El estudio de la actividad antioxidante realizado con juveniles de *P. vannamei* (Anexo III), presentó un incremento en la actividad de la Mn-SOD a las 48 h posteriores al reto con β -glucano, LPS y *V. penaeicidae* muerto por calor. Adicionalmente, encontramos que, tanto en adultos como en juveniles, la actividad de la enzima disminuyó después de 48 h de exposición a los inmunoestimulantes similar a la actividad enzimática de la SOD reportada para el camarón *Palaemonetes argentinus* relacionada con estrés oxidativo (Neves *et al*, 2000).

La variación en la actividad de la enzima Mn-SOD en juveniles de *P. vannamei* expuestos a inmunoestimulantes ha sido reportada por otros autores. Song y Hsieh (1994) mencionaron que la respuesta del sistema inmune a los inmunoestimulantes puede variar significativamente, dependiendo de la estructura o del número de receptores en las membranas celulares. Las diferencias en las respuestas inmunes entre especies pueden deberse a la habilidad de sus receptores celulares para reconocer las señales externas localizadas en la superficie del patógeno o en los componentes de la pared celular de los inmunoestimulantes (Song y Hsieh, 1994). Los receptores transmembranales de invertebrados no solo detectan la presencia de microorganismos infecciosos, sino que también son capaces de discriminar entre las diferentes clases de patógenos (Bowie y O'Neill, 2000). Por lo tanto, la respuesta inmune puede ser detectada en invertebrados después del reto con ciertos antígenos, pero no con otros (Arala-Chaves y Sequeira, 2000).

Después de retar a los juveniles de *P. vannamei* con *V. penaeicidae* vivo (Anexo III), se observó un incremento significativo ($p < 0.05$) en la respuesta antioxidante del control positivo a las 2 h posteriores al reto, similar al estudio reportado por Campa-Córdova *et al* (2002) en donde encontraron que la respuesta inmune temprana encontrada con *V. parahaemolyticus* vivo, se debió a la facilidad de la bacteria viva para invadir la hemolinfa y otros tejidos. El incremento en la respuesta antioxidante en juveniles de camarón blanco expuestos al β -glucano (Anexo III), fue similar al reportado en adultos (Anexo II).

Se observó un incremento significativo ($p < 0.05$) en el RPC en camarones juveniles a las 24 posteriores al reto con inmunoestimulantes. Downs *et al* (2001) reportó que el incremento en RPC en el camarón *P. pugio*, se debió a incremento de otras inmunoproteínas.

Sung *et al* (1994) y Dugger (1999) reportaron que exponiendo al camarón a la laminarina (β -1,3 glucano) dos veces por semana, es suficiente para mantener una activación óptima del sistema inmune del camarón. En este estudio, utilizando una sola exposición por 6 horas con β - glucano fue suficiente para activar las respuestas oxidativas en hemocitos así como RPC y THC.

Probablemente cuando un receptor en la superficie del hemocito reconoce una molécula de inmunoestimulante, se rompe el equilibrio metabólico y la respuesta celular oxidante y antioxidante promueve la producción de promotores como citocinas y chaperoninas, las cuales pueden estimular el incremento de hemocitos circulantes. En vertebrados, el programa genético activado por la respuesta inmune innata también incluye la expresión de citocinas que estimulan la activación de macrófagos y células naturales asesinas (Schuster y Nelson, 2000).

CONCLUSIONES

La activación de los hemocitos de *P. vannamei* con laminarina (β 1,3-glucano), generó un incremento en la producción anión superóxido, pero no de óxido nítrico.

La utilización por inmersión de β -glucano, de polisacárido sulfatado y *V. parahaemolyticus* en adultos de *P. vannamei*, generó un incremento en la producción anión superóxido en hemocitos entre 1.5 y 2.0 veces respecto al grupo control.

La utilización por inmersión del β -glucano en juveniles y en adultos de *P. vannamei*, indujo un incremento en la actividad de la enzima Mn-SOD entre las 24 y 48 h posteriores al reto. La capacidad antioxidante obtenida por los juveniles de *P. vannamei* fue similar a la generada por los adultos (2 veces mayor que los valores del grupo control).

En este estudio, la respuesta oxidativa y antioxidante del sistema inmune en juveniles y adultos de *P. vannamei*, se presentó más temprana utilizando bacterias vivas que utilizando inmunoestimulantes comerciales.

La máxima respuesta oxidativa y antioxidante entre las 24 y 48 h está asociada con la actividad de los hemocitos que lleva a eliminar el material extraño que ha ingresado en la hemolinfa.

La disminución de la respuesta oxidativa y antioxidante está relacionada con el estrés oxidativo que sufren las células del hospedero al eliminar el material extraño de la hemolinfa y a la susceptibilidad de los organismos a las enfermedades.

Los juveniles tratados con fucoidán no presentaron un incremento significativo ($p < 0.05$) en la actividad de la SOD, pero sí en el RPC.

El incremento en el contenido de proteína en juveniles y adultos de *P. vannamei* en respuesta a la exposición por inmersión en los inmunoestimulantes probados en este estudio, puede asociarse con la generación de proteínas de estrés y de inmunoproteínas, principalmente.

El incremento en el contenido total de hemocitos en adultos de *P. vannamei* en respuesta a la exposición previa con β -glucano y polisacárido sulfatado, se relaciona con una protección potencial del organismo a las enfermedades causadas por patógenos. Por el contrario, la disminución del contenido de hemocitos circulantes, está asociada a la

susceptibilidad momentánea de los camarones a los patógenos, causada por el estrés oxidativo que experimentan las células durante las primeras 48 horas posteriores al reto con inmunoestimulantes. Por esta razón, es importante diseñar estudios enfocados a cuáles componentes son regulados por la diferenciación y proliferación de hemocitos circulantes después del reto con inmunoestimulantes, así como las condiciones en peces y en humanos, en donde se ha observado que las citocinas y chaperoninas juegan un papel importante como moduladores de la respuesta inmune.

La determinación de anión superóxido y la actividad de la SOD, pueden ser utilizados como efectores de la activación del sistema inmune de *P. vannamei*. Sin embargo, es recomendable conocer qué otros efectores están siendo activados por los inmunoestimulantes probados en este estudio.

La utilización de β -glucano, LPS, polisacárido sulfatado, *V. parahaemolyticus* vivo y *V. penaeicidae* vivo, o muerto por calor, generaron un incremento en la actividad oxidante y antioxidante en *P. vannamei*, por lo cuál se sugieren como candidatos potenciales a utilizarse como inmunoestimulantes en acuicultura.

PERSPECTIVAS

Del presente estudio se desprenden algunos puntos clave para la planeación y la futura la realización de estudios con base al conocimiento generado en cuanto al tiempo de inmersión, dosis y vía de administración de los inmunoestimulantes.

Debido a que no se ha comprobado la presencia de memoria inmune en invertebrados, esto ha limitado el diseño de vacunas para mejorar la respuesta inmune contra los agentes infecciosos oportunistas presentes en los cultivos. De aquí la importancia del diseño de estrategias conducidas a conocer la capacidad de la respuesta inmune de los camarones inmunoestimulados ante la presencia de bacterias patógenas, para con ello conocer si estos agentes activadores realmente ayudan a los organismos a mejorar dicha respuesta, traduciéndola finalmente en incremento de la supervivencia y en el uso óptimo de los mismos, pues se ha visto que la utilización no adecuada de algunos inmunoestimulantes puede causar efectos adversos en los organismos de cultivo.

La utilización de técnicas bioquímicas para determinar respuesta inmune en invertebrados tiene la limitante de obtener resultados con altas variaciones entre los organismos. Ya se ha mencionado en este trabajo que dichas variaciones son dependientes de las condiciones fisiológicas de los organismos, causadas por factores genéticos, de cultivo, nutricionales, de estrés, entre otros. Para evitar estas variaciones, la utilización de técnicas moleculares es una herramienta muy útil para la identificación de moléculas que intervienen en el sistema inmune del camarón con el propósito de utilizarlas como biomarcadores, en donde la mayoría de ellas aún no han sido reportadas en el banco de datos genómico. En este sentido, hemos realizado avances para la identificación de algunas moléculas que intervienen en el sistema inmune de invertebrados como son chaperoninas, péptidos antimicrobianos, receptores toll, y la propia superóxido dismutasa, basándonos en las secuencias reportadas en el banco de datos genómico (GenBank). Para la amplificación de receptores toll y la Mn-SOD, se alinearon las secuencias nucleotídicas reportadas para invertebrados, eligiendo las regiones más conservadas para el diseño de los oligos degenerados. A partir de ARNm (mensajero), los productos amplificados para toll (300 pb) y la Mn-SOD (440 pb), fueron clonados en un vector comercial y secuenciados.

En segundo término, a partir de las secuencias nucleotídicas reportadas en el banco de datos genómico, se elaboraron oligos específicos para la amplificación de la chaperonina HSP-70KDa, el péptido antimicrobiano penaeidina 2 a, la enzima antioxidante Mn-SOD. Una vez que se obtengan los fragmentos amplificados por PCR, se elaborarán sondas marcadas para medir los niveles de expresión de dichos genes en el ARNm de camarón en respuesta a una activación previa del sistema inmune. Estos biomarcadores potenciales, pueden ser utilizados para ver el efecto del estrés oxidativo en los organismos causado por cambios de temperatura, cambios de oxígeno, de salinidad, por exposición a contaminantes, inmunoestimulación, estudios de nutrición, entre otros. De esta manera, se podrá determinar la capacidad individual de expresión de moléculas del sistema inmune en respuesta a una previa activación del mismo.

Es importante tener en cuenta que el estado nutricional de los organismos es fundamental para responder favorablemente a la presencia de organismos patógenos en los cultivos, pero se ha visto que el estado de salud de los camarones en cultivo dista mucho de ser resuelto utilizando solo dietas comerciales, por lo cual los resultados favorables obtenidos en Asia y Ecuador utilizando algunos inmunoestimulantes ha resultado una alternativa prometedora en la solución de problemas infecciosos.

REFERENCIAS

- Adema, C. M., Van der Knaap, W. P. W. and Sminia, T. (1991). Molluscan haemocyte-mediated cytotoxicity: the role of reactive oxygen intermediates. *Reviews in Aquatic Sciences* 4, 201-223.
- Beauchamp, C. and Fridovich, I. (1971). Superoxide dismutase: improved assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry* 44, 276-287.
- Aguirre-Guzmán, G. and Ascencio-Valle, F. (2001). Infectious disease in shrimp species with aquaculture potential. *Recent Research of Developmental Microbiology* 4, 333-348.
- Alabi, A. O., Jones, D. A. and Latchford, J. W. (1999). The efficacy of immersion as opposed to oral vaccination of *Penaeus indicus* larvae against *Vibrio harveyi*. *Aquaculture* 178, 1-11.
- Arala-Chaves, M. and Sequeira, T. (2000). Is there any kind of adaptive immunity in invertebrates? *Aquaculture* 191, 247-258.
- Bachère, E., Destoumieux, D. and Bulet, P. (2000). Penaeidins, antimicrobial peptides of shrimp: a comparison with other effectors of innate immunity. *Aquaculture* 191, 71-88.
- Banchereau, J., Bazan, F., Blanchard, D., Briere, F., Galizzi, J. P. van Kooten, C., Liu, Y. L., Rousset, F. and Sealand, S. (1994). The CD40 and antigen and its ligand. *Annual Review of Immunology* 12, 881-922.
- Bell, K. L. and Smith, V. J. (1993). In vitro superoxide anion production by hyaline cells of the shore crab *Carcinus maenas* (L.). *Developmental and Comparative Immunology* 17, 211-219.
- Beutler, B. (2001). Nagging questions take Toll on researchers (1). Mouse mutants pinpoint Gram-negative sepsis co-receptor. *The Scientist* 15, 17.
- Biswas, C. and Mandal, C. (1999). The role of amoebocytes in endotoxin-mediated coagulation in the innate immunity of *Achatina fulica* snails. *Scandinavian Journal of Immunology* 49, 131-138.
- Bowie, A. and O'Neill, A.J. (2000). The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products. *Journal of Leukocyte Biology* 67, 508-514.
- Buettner G. R (1998) Antioxidant enzymes and functions. Naturally occurring antioxidants. *Oxygen*, Washington DC, USA. 1:1-20.

- Bulet, P., Hetru, C., Dimarcq, J.-L. and Hoffmann, D. (1999). Antimicrobial peptides in insects; structure and function. *Developmental and Comparative Immunology* 23, 329-344.
- Campa-Córdova, A. I., Hernández-Saavedra, N. Y., De Philippis, R., and 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.
- Carajaraville, M. P., Pal, S. G. and Robledo, Y. (1995). Light and electron microscopical localization of lysosomal acid hydrolases in bivalve haemocytes by enzyme cytochemistry. *Acta Histochemistry. Cytochemistry* 28, 409-416.
- Cheng, T. C. (1983). The role of lysosomes in molluscan inflammation. *American Zoology* 23, 129-144.
- Cheng, T. C. (1992). Selective induction of release of hydrolases from *Crassostrea virginica* hemocytes by certain bacteria. *Journal of Invertebrate Pathology* 59, 197-200.
- Chisholm, J. R. S. and Smith, V. J. (1995). Comparison of antibacterial activity in the hemocytes of different crustacean species. *Comparative Biochemical and Physiology* 1, 39-45.
- Chu, F. L. E. and La Peyre, J. F. (1989). Effect of environmental factors and parasitism on hemolymph lysozyme and protein of american oysters (*Crassostrea virginica*). *Journal of Invertebrate Pathology* 54, 224-232.
- Clegg, J. S., Uhlinger, K. R., Jackson, S. A., Cherr, G. N., Rifkin, E. and Friedman, C. S. (1998) Induced thermotolerance and the heat shock protein-70 family in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *American Zoology* 7, 21-30.
- Das, S., Yadav, D., Narang, R. and Das, N. (2002). Interrelationship between lipid peroxidation, ascorbic acid and superoxide dismutase in coronary artery disease. *Current Science* 83, 488-491.
- De la Rosa-Vélez, J. (2001). Virus de la mancha blanca (WSSV) y cabeza amarilla (YHV), dos amenazas potenciales a los cultivos camaronícolas en México. *Panorama Acuicola* 6, 18-19.
- Destoumieux, D., Munoz, M., Bulet, P. and Bachère, E. (2000). Penaeidins, a family of antimicrobial peptides from penaeid shrimp (Crustacea, Decapoda). *Cellular and Molecular Life Sciences* 57, 1260-1271.
- Direkbusarakom, S., Danayadol, Y. (1998). Effect of oxygen depletion on some parameters of the immune system in black tiger shrimp (*P. monodon*). In: Flegel, T. W. (Ed.), *Advances in shrimp biotechnology*, National center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok, 147-149.

- Downs, C., Fauth, J. E., and 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.
- Dugger, D. (1999). Bio-modulation of the non-specific immune response in marine shrimp with beta-glucan. *Aquatic Magazine*. January/February, 81-89.
- Dyrynda, E. A., Pipe, R. K. and Ratchliffe, N.A. (1995). Host defense mechanisms in marine invertebrate larvae. *Fish & Shellfish Immunology* 5, 569-580.
- Ellis, R. J. (1996). Stress proteins as molecular chaperones. In: *Stress Proteins in Medicine*, Van Eden, W., and D. B. Young (eds.) New York, N. Y.: Marcel Dekker, Inc.
- Espinoza, G., Rodríguez-Ramos, T., Marrero, J., Ramos, L., Borrell, Y., Bécquer, U., Nodas, F. y Hernández, N. D. (2002). Efectores inmunitarios como herramientas en la prevención de enfermedades en el camarón blanco *Litopenaeus schmitti*. I Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura (<http://www.civa2002.org>) 765-777.
- Folz R. J. and Crapo J. D. (1994) Extracellular superoxide dismutase (SOD3): Tissue-specific expression, genomic characterization, and computer-assisted sequence analysis of the human ECSOD gene. *Genomics* 22, 162-171.
- Frankenberg, M. M., Jackson, J. S. and Clegg, J. S. (2000). The heat shock response of adult *Artemia franciscana* *Journal of Thermal Biology* 25, 481-490.
- Fridovich, I. (1995). Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annual Review of Biochemistry* 64, 97-112.
- Fridovich, I. (1998). Oxygen toxicity: a radical explanation. *Journal of Experimental Biology* 201, 1203-1209.
- Garriques, D. and Arevalo, G. (1995). An evaluation of the production and use of a live bacterial isolate to manipulate the microbial flora in the commercial production of *Penaeus vannamei* postlarvae in Ecuador. *World Aquaculture Society*, 53-59.
- Hashimoto, C., Hudson, K. L. and Anderson, K. V. (1988) The Toll gene of *Drosophila*, required for dorso-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell* 52, 269-279.
- Henning, O., Itami, T., Maeda, M., Kondo, M., Natsukari, T. and Takahashi, T. (1998). Analyses of hemolymph immunoparameters in kuruma shrimp infected with panaeid rod-draped DNA virus. *Fish Pathology* 33, 389-393.
- Hill, A. D., Taylor, A. C., Strang, R. H. C. (1991). Physiological and metabolic responses of the shore crab *Carcinus maenas* (L.) during environmental anoxia and subsequent recovery. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 150, 31-50.

- Homblad, T. and Söderhäll, K. (1999). Cell adhesion molecules and antioxidative enzymes in a crustacean, possible role in immunity. *Aquaculture* 172, 111-123.
- Hose, J. E., Martin G. G. and Gerard, A. A. (1990). A decapod hemocyte classification scheme integrating morphology, cytochemistry, and function. *Biological Bulletin* 178, 33-45.
- Itami, T., Takahashi, Y. and 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. and 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.
- Jacklet, J. W. (1997). Nitric oxide signalling in invertebrates. *Invertebrate Neuroscience* 3, 1-14.
- Janeway, C. A. and Medzhitov, R. (2000). Viral interference with IL-1 and Toll signaling. *PNAS* 97, 10682-10683.
- Jennissen, H. P. (1995). Ubiquitin and the enigma of intracellular protein degradation. *European Journal of Biochemistry* 231, 1-30.
- Johansson, M. W. and Soderhall, K. (1992). Cellular defense and cell adhesion in crustaceans. *Animal Biology* 1, 97-107.
- Kaattari, S. L. (1994). Development of a piscine paradigm of immunological memory. *Fish and Shellfish Immunology* 4, 447-457.
- Karunasagar, I., Otta, S. K., Devaraj, T. N., Shubha, G. and Iddya, K. (1999). Immunostimulation of *Penaeus monodon* through the oral route. *Workshop: Shrimp immunity and disease control*. Thailand.
- Kenkyu, G. (1994). Vibriosis resistance induced by glucan treatment in tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Fish Pathology* 29, 11-17.
- Kinnula, V. L., Crapo, J. D. and Raivio, K.O. (1995) Generation and disposal of reactive oxygen metabolites in the lung. *Laboratory Investigation* 73, 3-19.
- Kondo, M., Itami, T., Takahashi, Y., Fujii, R. and Tomonaga, S. (1998). Ultrastructural and cytochemical characteristics of phagocytes in kuruma prawn. *Fish Pathology* 33, 421-427.
- Le Moullac, G., Le Groumellec, M., Ansquer, D., Froissard, S., Levy, P. and Aquacop. (1997). Haematological and phenoloxidase activity changes in the shrimp *Penaeus*

- stylirostris* in relation with the moult cycle: protection against vibriosis. *Fish & Shellfish Immunology* 7, 227-234.
- Le Moullac, G., Soyeux, C., Saulnier, D., Ansquer, D., Avarre, J. C., Levy, P. (1998). Effect of hypoxic stress on the immune response and the resistance to vibriosis of the shrimp *Penaeus stylirostris*. *Fish Shellfish Immunology* 8, 621-629.
- Le Moullac, G., Rodriguez, J., Saulnier, D., Cuzon, G, and Chim, L. (1999). Immunomodulation: nutritional aspects and immunostimulation. *IFREMER-Aquacop, Taravao, Tahiti. CENAIM-ESPOL, Guayaquil, Ecuador. Forum*.
- Leonard, K., Söderhäll, K. and Ratcliffe, N.A. (1985). Studies on prophenoloxidase and protease activity of *Blumerus craniifer* haemocytes. *Insect Biochemistry* 15, 803-810.
- Lie, O., Evensen, O., Sorensen, A. and Froysadal, E. (1989) Study on lysozyme activity in some fish species. *Diseases of Aquatic Organisms* 6, 1-5.
- Lightner, D, 1985. CRC Handbook of mariculture. *Crustacean aquaculture* 1, 289-319.
- Lorenzon, S., Guarrini, S., Smith, V. J., Ferrero, E. A. (1999). Effects of LPS injection on circulating haemocytes in crustaceans *in vivo*. *Fish & Shellfish Immunology* 9, 31-50.
- 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.
- Martin, G. G., Hose, J. E., Omori, S., Clong, C., Hoodbhoy, T. and Mcbrell, N. (1991). Localization and roles of coagulation and transglutaminase in hemolymph coagulation in decapod crustaceans. *Comparative Biochemistry and Physiology* 100 B, 517-522.
- Medzhitov, R., Preston-Hulburt, P. and Janeway, C. A. Jr. (1997). A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388, 394-397.
- Meister, M., Lemaitre, B. and Hoffman, J. A. (1997). Antimicrobial peptide defense in *Drosophila* *BioEssays* 19, 1019-1026.
- Montaño-Perez, K., Reyes-Izquierdo, T. y Vargas-Albores, F. (1999). El proceso de coagulación en camarones penaeidos. *Ciencia* 50, 23-28.
- Muñoz, M., Cedeño, R., Rodríguez, J., Van der Knaap, W. P., Mialhe, E. and Bachère, E. (2000). Measurement of reactive oxygen intermediate production in haemocytes of the penaeid shrimp, *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* 191, 89-107.

- Nappi, A. J., Vass, E., Frey, F. and Carton, Y. (1995). Superoxide anion generation in *Drosophila* during melanotic encapsulation of parasites. *European Journal of Cell Biology* 68, 450-456.
- Nappi, A. J. and Ottaviani, E. (2000). Cytotoxicity and cytotoxic molecules in invertebrates. *BioEssays* 22, 469-480.
- Neves, C. A., Santos, E. A. and Bainy, A. C. D. (2000). Reduced superoxide dismutase activity in *Palaemonetes argentinus* (Decapoda, Palaemonidae), infected by *Probopyrus ringueleti* (Isopoda, Bopyridae). *Disease of Aquatic Organisms* 39, 155-158.
- Ottaviani, E. and Franceschi, C. (1997). The invertebrate phagocytic immunocyte: clues to a common evolution of immune and neuroendocrine systems. *Immunology Today* 18, 169-174.
- Radi R, Turrens J. F., Chang L. Y., Bush K. M., Crapo J. D. and Freeman, B. A. (1991) Detection of catalase in rat heart mitochondria. *Journal of Biological Chemistry* 266, 22028-22034.
- Ratcliffe, N. A., Brookman, J. L. and Rowley, A. F. (1991). Activation of the prophenoloxidase cascade and initiation of nodule formation in locusts by bacterial lipopolysaccharides. *Developmental and Comparative Immunology* 15, 33-39.
- Ratner, S. and Vinson, S. B. (1983). Phagocytosis and encapsulation: cellular immune responses in arthropoda. *American Zoology* 23, 185-194.
- Roch, P. (1999). Defense mechanisms and disease prevention in farmed marine invertebrates. *Aquaculture* 172, 125-145.
- Rodríguez, J., Cedeño, R., Molina, C., Otero, V., Valenzuela, E. y Sotomayor, M. A. (2000). Efecto de la calidad de la dieta sobre la respuesta inmune del camarón *Penaeus vannamei*. *Avances en Nutrición Acuicola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuicola* 57-71.
- Rosenberry, B. (1999). World Shrimp Farming 1999. *Shrimp News International*, San Diego, California, 320 p.
- Rosenberry, B. (2001). World Shrimp Farming 2001. *Shrimp News International* San Diego, California, 316 p.
- SAGARPA, (2001). Anuario Estadístico de Pesca. Secretaría de Agricultura y Recursos Naturales y Pesca, pp. 253.
- Salinas, A. (1999). Instituto Nacional de la Pesca... y de Acuicultura. *Panorama Acuicola* 4, 26 p.
- Salinas, A. (2001). Camaronicultura en México, una industria de fuerzas opuestas. *Panorama Acuicola* 6, 18 p.

- Salinas, A. (2002). Curso de comercialización de camarón. *Panorama Acuicola* 7, 32-34.
- Schuster, J. M. and Nelson, P. S. (2000). Toll receptors: an expanding role in our understanding of human disease. *Journal of Leukocyte Biology* 67, 767-773.
- Sequeira, T., Tavares, D. & Arala-Chaves, M. (1996). Evidence for circulation hemocyte proliferation in the shrimp *Penaeus japonicus*. *Developmental and Comparative Immunology* 20, 97-104.
- Sequeira, T., Caramalho, I., Corral, L., Azevedo, C., Vieira, P. and Arala-Chavez, M. (1999). Secondary responses can be induced in the shrimp *Penaeus japonicus*. *Developmental and Comparative Immunology* 20, 97-104.
- Söderhäll, K. and Smith, V. J. (1983). Separation of the haemocyte populations of *Carcinus maenas* and other marine decapods, and prophenoloxidase distribution. *Developmental and Comparative Immunology* 7, 229-239.
- Söderhäll, K. and Cerenius, L. (1992). Crustacean immunity. *Annual Review of Fish Diseases* 2, 3-23.
- Song, Y. L. and Hsieh, Y. T. (1994). Immunostimulation of tiger shrimp (*Penaeus monodon*) hemocytes for generation of microbicidal substances: analysis of reactive oxygen species. *Developmental and Comparative Immunology* 18, 201-209.
- Song, Y. L. and Huang, C. C. (1999). Application of Immunostimulants to Prevent Shrimp Diseases. *Recent Advances in Marine Biotechnology* 5, 173-187.
- Sritunyaluksana, K., Sithisarn, P., Withayachumnarnkul, B and Flegel, T. W. (1999). Activation of prophenoloxidase, agglutinin and antibacterial activity in haemolymph of the black tiger prawn, *Penaeus monodon*, by immunostimulants. *Fish & Shellfish Immunology* 9, 21-30.
- Sung, H. H., Kou, G. H. and Song, L. (1994). Vibriosis resistance induced by glucan treatment in tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Fish Pathology* 29, 11-17.
- Sung, H. H., Yang, Y. L. and Song, L. (1996). Enhancement of microbicidal activity in the tiger shrimp *Penaeus monodon* via immunostimulation. *Journal of Crustacean Biology* 16, 278-284.
- Takahashi, Y., Uehara, K., Watanabe, R., Okumura, T., Yamashita, T., Omura, H., Yomo, T., Kawano, T., Kanemitsu, A., Narasaka, H., Suzuki, N. and Itami T. (1998). Efficacy of oral administration of fucoidan, a sulfated polysaccharide, in controlling white spot syndrome in kuruma shrimp in Japan. In Flegel TW (ed) *Advances in shrimp biotechnology*. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok.

- Taylor, M. J. and Hoole, D. (1995) The chemiluminescence of cyprinid leucocytes in response to zymosan and extracts of *Ligula intestinalis* (Cestoda). *Fish & Shellfish Immunology* 5, 191-198.
- Truscott, R. and White, K. N. (1990). The influence of metal and temperature stress on the immune system of crabs. *Functional Ecology* 4, 455-461.
- Vargas-Albores, F. (1995). Sistemas de defensa del camarón café (*Penaeus californiensis*). *Ciencia* 46, 33-45.
- Vargas-Albores, F., Hernandez-Lopez, J., Gollas-Galvan, T., Montano-Perez, K., Jimenez-Vega, F. and Yepiz-Plascencia, G. (1998). Activation of shrimp cellular defense functions by microbial products. In Flegel TW (ed) *Advances in shrimp biotechnology*. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok, 161-166.
- Viana, M. T. and Raa, J. (1992). Lysozyme-like enzyme from the scallop *Chlamys islandica*. *Ciencias Marinas* 18 1, 93-107.
- Warner, H. R. (1994). Superoxide dismutase, aging, and degenerative disease. *Free Radical Biology and Medicine* 3, 249-258.
- Yeh, M. S., Chen, Y. L. and Tsia, I. H. (1998). The hemolymph clottable proteins of tiger shrimp, *Penaeus monodon*, and related species. *Comparative Biochemistry and Physiology* 121 B, 169-176.
- Yoshimura S., Suemizu, H., Taniguchi, Y., Arimori, K., Kawabe, N. and Moriuchi, T. (1994) The human plasma glutathione peroxidase-encoding gene: organization, sequence and localization to chromosome 5q32. *Gene* 145: 293-297.