

Acuabio 1, un estimulador del sistema inmune de camarones *Litopenaeus vannamei*

Ramón Franco^{1*}, Amilcar Arenal^{1*}, Leonardo Martín¹, Dayamí Santiesteban¹, Jorge Sotolongo¹, Rebeca Martínez², Mario P Estrada²

¹Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, CIGB
AP 387, Camagüey, Cuba

²Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, CIGB
Ave. 31 entre 158 y 190, Cubanacán, Playa, CP 10400, AP 6162, Ciudad de La Habana, Cuba
E-mail: amilcar.arenal@cigb.edu.cu

RESUMEN

Acuabio 1 es una mezcla de proteínas y aminoácidos esenciales que ejerce un efecto estimulador en el desarrollo de los organismos acuáticos. Sincroniza y estimula el crecimiento de larvas de peces y camarones. Con su empleo se activa y acelera el mecanismo de crecimiento desde edades muy tempranas, así como el desarrollo y la talla de los animales. En el presente trabajo se evidencia el efecto estimulador del sistema inmune del producto Acuabio 1 en camarones (*Litopenaeus vannamei*). Se determinó que al tratar los animales con este producto aumentó el número de hemocitos totales (5.4×10^6 hemocitos/mL) con respecto a los del grupo control (4.3×10^6 hemocitos/mL). Se observó que la hemolinfa de los camarones tratados tuvo mayor título de lectinas (16) comparado con el control (8). En los animales tratados con Acuabio 1 se encontró un aumento de las actividades específicas fenoloxidasas y peroxidasa comparadas con las del control, lo que indicó un aumento de la defensa oxidativa en estos animales. También se halló que Acuabio 1 disminuyó el número de unidades formadoras de colonias en el medio para *Vibrio* spp. y *Pseudomonas* spp., lo que sugiere una posible función prebiótica. Estas propiedades del producto Acuabio 1 lo hacen muy atractivo para su utilización en el mejoramiento de la producción, supervivencia y calidad de las larvas de camarones.

Palabras clave: sistema inmune, Acuabio 1, fenoloxidasa, hemocitos, camarón

Biotecnología Aplicada 2009;26:39-43

INVESTIGACIÓN

ABSTRACT

Acuabio 1, an enhancer of the immune system in *Litopenaeus vannamei* shrimps. Acuabio 1 is a mixture of proteins and essential amino acids that exerts a stimulating effect in the development of aquatic organisms. It synchronizes and accelerates fish and shrimp larvae growth on early developmental stages, as well as increases the development and size of these animals. In this work, the stimulating effect of Acuabio 1 on the immune system of *Litopenaeus vannamei* shrimps was demonstrated by obtaining (5.4×10^6 hemocytes/mL) greater than the control group (4.3×10^6 hemocytes/mL). The hemolymph of treated animals showed higher lectin titers (16) than the control group (8). Animals treated with Acuabio 1 increased their phenoloxidase and peroxidase activities, indicating an enhanced oxidative defense. Furthermore, Acuabio 1 decreased the number of *Vibrio* spp. and *Pseudomonas* spp. colony forming units in the culture medium, suggesting a possible prebiotic function. All these properties make Acuabio 1 very attractive to improve the production, survival rate and quality of shrimp larvae.

Keywords: immune system, Acuabio 1, phenoloxidase, hemocytes, shrimp

Introducción

Los niveles de producción mundial del cultivo de camarón alcanzaron 1.5 millones de toneladas métricas en el 2002, lo cual representa el 49% de la captura total de camarones. Se estima un crecimiento de esta industria del 12 al 15% en el año [1].

Aunque se han dado pasos de avance en la domesticación y cruzamiento genético de algunas especies de camarones, como *Penaeus monodon* [2] y *Litopenaeus vannamei* [3]; no se ha progresado lo suficiente, debido, entre otros factores, a la falta de comprensión de los procesos genéticos y bioquímicos de estas especies. Para mejorar el proceso productivo de una especie debe tenerse en cuenta la genética, reproducción, nutrición y fisiología del organismo seleccionado [4].

La importancia económica de los camarones ha motivado la intensificación de su cultivo. Sin embargo, el incremento de la densidad es asociado al desarrollo de epizootias, los cuales traen consigo la pérdida de

las producciones. El empleo de bacterias probióticas y el uso de inmunoestimulantes son los dos métodos, desarrollados en los últimos años, de más uso para evitar enfermedades en camarones [5].

El producto Acuabio 1, es una mezcla exacta de proteínas y aminoácidos esenciales que ejercen un efecto nutricional importante en las etapas iniciales de desarrollo de los organismos acuáticos. Su efecto logra sincronizar y estimular el crecimiento de las larvas, de forma tal que se activa el mecanismo de crecimiento desde edades muy tempranas y se produce un efecto de aceleración del crecimiento, el desarrollo y la talla de peces, además de lograrse como efecto secundario una mayor resistencia a organismos parásitos [6].

Las cualidades descritas del producto Acuabio 1, lo hacen muy atractivo para su utilización en el incremento de la producción, supervivencia y calidad de las larvas en los organismos acuáticos, etapa crucial en el cultivo de estos animales.

1. Briggs M, Funge-Smith S, Subasinghe R, Phillips M. Introductions and movement of *Penaeus vannamei* and *Penaeus stylirostris* in Asia and the Pacific. Serial: RAP Publication (FAO) 2004; suppl 2004/10.

2. Macbeth M, Kenway M, Salmon M, Benzie J, Knibb W, Wilson K. Heritability of reproductive traits and genetic correlations with growth in the black tiger prawn *Penaeus monodon* reared in tanks. *Aquaculture* 2007;270(1):51-6.

3. Pérez-Rostro CI, Ibarra AI. Heritabilities and genetic correlations of size traits at harvest size in sexually dimorphic Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) grown in two environments. *Aquac Res* 2003;34(12):1079-85.

4. Gómez-Chiarri M, Smith GJ, de la Fuente J, Powers DA. Gene transfer in shellfish and algae. In: de la Fuente J, Castro FO. Editors. Gene transfer in aquatic organisms. Austin, Texas: RG Landes Company and Germany: Springer Verlag, 1998, p.107-25.

*Estos autores contribuyeron por igual a la realización de este trabajo

✉ Autor de correspondencia

Se han informado variaciones en la reactividad inmune de los invertebrados en respuesta a varios estímulos externos y artificiales, incluidos cambios en la temperatura y salinidad, contaminantes, infecciones naturales o inducidas artificialmente [7, 8].

En el presente trabajo se describe el efecto de Acuabio 1 en parámetros del sistema inmune del camarón *L. vannamei* (número total de hemocitos, actividad fenoloxidasas, actividad peroxidasa y título de lectinas) y en el conteo de *Vibrio* spp. y *Pseudomonas* spp. en el hepatopáncreas.

Materiales y métodos

Se utilizaron camarones juveniles de la especie *Litopenaeus vannamei* de 5.0 ± 0.2 g, los cuales se distribuyeron al azar en dos grupos con dos réplicas cada uno. Las réplicas se sembraron en acuarios de 50 L, a razón de 10 animales por acuario. El grupo control se trató con 100 mg/L de albúmina de suero bovino y el segundo grupo con Acuabio 1 a 100 mg/L, cada tres días. Se mantuvieron bajo iluminación y aireación constante. Con 34 g/L de salinidad del agua de cultivo y recambio diario de agua del 50%. A los 25 días se tomaron muestras de los camarones, de los que se extrajo hemolinfa del seno ventral situado en el celotórax, se utilizaron jeringuillas de 1 mL con anticoagulante citrato de sodio a 387 mM. Las muestras se transfirieron a tubos eppendorf y se mantuvieron en hielo (4 °C) para preservar las células.

Conteo total de hemocitos

Se determinó el número de hemocitos presentes en el plasma por conteo con cámara de Neubauer mediante un microscopio de contraste de fases. Se realizó utilizando un hematocitómetro de Neubauer y un microscopio a 40x (Olympus). Se aplicó la siguiente fórmula:

Donde:

NH = número de hemocitos (10^6 células/mL)

CTH = conteo de hemocitos en 8 cuadrantes

$$NH = \frac{\sum_{i=1}^8 CTH}{8} \times \text{dilución} \times 10^4$$

Título de lectinas

La sangre de conejo utilizada se colectó en una solución de D-glucosa 110 mM, citrato de sodio 37 mM, NaCl 72 mM y ácido cítrico 2.9 mM en una proporción 50% volumen/volumen (v/v) y almacenada a 4 °C hasta el momento del ensayo. Los eritrocitos colectados se lavaron dos veces en PBS 1X pH 7.2 (NaCl 136 mM, KCl 2.6 mM, Na_2HPO_4 8.0 mM, KH_2PO_4 1.5 mM). Para los lavados se centrifugó a 1500 rpm durante 5 min. Para el ensayo se preparó una suspensión de eritrocitos al 2% (v/v) en PBS 1X, pH 7.2. Se hicieron diluciones seriadas de las muestras de interés en PBS 1X, pH 7.2, en placas de 96 pocillos de fondo en U (Costar®, EE.UU.), en un volumen total de 100 μL en cada pocillo. Se añadieron 100 μL de la suspensión de eritrocitos de conejo al 2% (v/v) a cada pocillo y se incubó la placa 1 h a 28 °C. Se incluyó un control negativo de 100 μL de PBS 1X, pH 7.2. Se determinó el título de hemoaglutinación para cada muestra, y se consideró como título de lectinas la ma-

yor dilución de la muestra en la cual se observa la hemoaglutinación [9].

Actividad antiproteasa

Se tomaron 20 μL de hemolinfa y se incubaron con igual volumen de una solución de tripsina 5 mg/mL por 10 min a 22 °C. Posteriormente se añadieron 200 μL de tampón fosfato 100 mM (pH 7) y 250 μL de azocaseína al 2% peso/volumen (p/v), y se incubó a 22 °C durante 1 h. Transcurrido ese tiempo se añadieron 500 μL de ácido tricloroacético (TCA) al 10% (p/v) y se incubó 30 min a 22 °C. La mezcla se centrifugó a 6000 rpm por 5 min. Se transfirieron 100 μL del sobrenadante a una placa de 96 pocillos que contenían 100 μL por pocillo de NaOH 1 M. La reacción se leyó a 450 nm. Como control 100% se añadió tampón fosfato en lugar de hemolinfa. Como blanco se usó tampón fosfato en lugar de la hemolinfa y tripsina. El porcentaje de inhibición de la actividad de la tripsina para cada muestra se calculó en comparación con el control 100%. Todas las muestras se analizaron por duplicado [10].

Actividad específica peroxidasa

Se midió empleando Pirogallol (Sigma, EE.UU.) como sustrato para la enzima y se aplicó el siguiente protocolo: en una cubeta de sílica de 1 cm de paso de luz se mezclaron 64 μL de tampón fosfato 100 mM (pH 6.0), 32 μL de H_2O_2 147 mM, 64 μL de la solución de Pirogallol a 180 mM y 420 μL de H_2O destilada. A esta mezcla se añadieron 20 μL de plasma de la hemolinfa, se agitó y se leyó su absorbancia a 420 nm después de pasados 0.33 min, para ello se utilizó como referencia agua destilada. Una unidad de peroxidasa se define como la cantidad de enzima necesaria para catalizar la producción de 1 mg de purpurogallina a partir del pirogallol en 0.33 min a 20 °C [11]. La actividad enzimática específica se calculó por la relación entre la actividad enzimática y la concentración de proteínas. La concentración de proteínas totales se determinó a partir de 20 μL de hemolinfa, mediante el método de Bradford [12].

Actividad específica fenoloxidasas

Se midió la actividad fenoloxidasas mediante la detección espectrofotométrica de la formación de un cromógeno a partir de la L-dihidroxifenilalanina (L-DOPA). Se colocaron 15 μL de plasma de hemolinfa en placas de 96 pocillos y se añadió 50 μL de L-DOPA 1.5 M. Después de 10 min a 25 °C se leyó la absorbancia a 490 nm. Una unidad de fenoloxidasas es la variación de la absorbancia en 0.001 UA/min [13]. La actividad enzimática específica se calculó por la relación entre la actividad enzimática y la concentración de proteínas.

Número de colonias de *Vibrio* spp. y *Pseudomonas* spp. en hepatopáncreas

Se tomaron 100 mg de hepatopáncreas y se resuspendieron en 1 mL de PBS 1X estéril. Se realizaron diluciones seriadas en solución salina (NaCl 150 mM) hasta llegar a 10^{-10} , de cada dilución se tomaron 100 μL , y se sembraron en tres placas de agar-tiosulfato-citrato-bilis-sacarosa (TCBS, extracto de levadura 5 g/L, peptona de carne 5 g/L, triptefina 5 g/L, citrato de sodio 10 g/L, tiosulfato de sodio 10 g/L, bilis de buey 8 g/L,

5. Gullian M, Thompson F, Rodriguez J. Selection of probiotic bacteria and study of their immunostimulatory effect in *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* 2004;233:1-14.

6. Martínez R, Carpio Y, Gómez Y, Raíces M, Morales A, Herrera F, et al. Acuabio 1 estimula el metabolismo anaerobio y el sistema inmune innato de las larvas de goldfish y tilapia. *Biotechnol Apl* 2006; 23(4):287-94.

7. Vogan CL, Rowley AF. Effects of shell disease syndrome on the haemocytes and humoral defences of the edible crab, *Cancer pagurus*. *Aquaculture* 2002;205:237-52.

8. Le Moullac G, Haffner P. Environmental factors affecting immune responses in Crustacea. *Aquaculture* 2000;191:121-31.

9. Raman T, Arumugam M, Mullaianadhan P. Agglutinin-mediated phagocytosis-associated generation of superoxide anion and nitric oxide by the hemocytes of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Fish Shellfish Immunol* 2008;24:337-45.

10. Bowden TJ, Butler IR, Bricknell IR, Ellis AE. Serum trypsin inhibitory activity in five species of farmed fish. *Fish Shellfish Immunol* 1997;7:377-85.

11. Wallerstein JS, Alba RT, Hale MG, Levy H. Studies on oxidase activity in potato tubers BBA - *Bioch et Bioph Act* 1947;1:327-34.

12. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of proteing-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-54.

13. Hernández López J, Gollas Galván T, Vargas Albores FX. Activation of the prophenoloxidasas system of the brown shrimp *Penaeus californiensis* Holmes. *Comp Biochem Physiol C* 1996;113:61-6.

sacarosa 20 g/L, NaCl 10 g/L, citrato férrico 1g/L, Azul de bromotimol 40 mg/L, Azul de timol 40 mg/L, agar 15 g/L; pH 8.6 ± 0.2; medio diseñado para la detección de *Vibrios* spp. y *Pseudomonas* spp. [14]). Una vez absorbida la suspensión, la placa se incubó a una temperatura de 28° C. Cuando se observó crecimiento, se contaron las unidades formadoras de colonias (u.f.c.) en la dilución que tenía entre 30 y 300 u.f.c.

Análisis estadísticos

En los casos del conteo total de hemocitos, la actividad hemoaglutinante y el número de colonias de *Vibrio* spp. y *Pseudomonas* spp. se comparó la mediana de los valores aplicando Mann-Whitney. En los casos de la actividad específica peroxidasa y de la actividad específica fenoloxidasas se evaluó la normalidad por la prueba de Kolmogorov-Smirnov, se realizó un análisis de varianza con el empleo de una prueba F y la diferencia entre los grupos se detectó por la prueba t de Student. En el caso de actividad antiproteasa, los valores en porcentaje se transformaron de escala arcosen (X/100)^{1/2} y posteriormente se procedió de modo similar a los análisis con las actividades enzimáticas específicas. El tratamiento estadístico de los datos experimentales se realizó con la ayuda de los programas STATISTICA versión 6.0 (2004, StatSoft, EE.UU.) y GraphPad Prism versión 4.00 (2003, GraphPad Software, EE.UU.).

Resultados

Para evaluar el efecto de Acuabio 1 en el sistema inmune en *L. vannamei* se midieron en la hemolinfa varios parámetros que caracterizan la respuesta frente a elementos patógenos de camarones peneidos. En los animales tratados con el producto Acuabio 1, el número de hemocitos por mililitro de hemolinfa fue 25% mayor (P < 0.05) que en los animales que no recibieron tratamiento con el producto (Figura 1). Ello indica que Acuabio 1 es capaz de estimular la proliferación de hemocitos en la hemolinfa de *L. vannamei*.

Entre los parámetros de la inmunidad innata se destacan las lectinas, que funcionalmente pueden estar

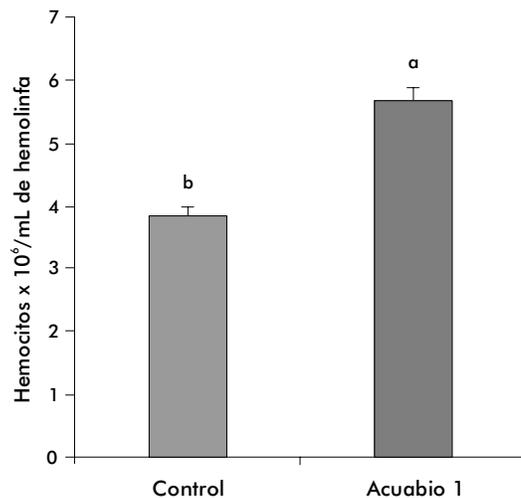


Figura 1. Número de hemocitos/mL de hemolinfa de los grupos Control y Acuabio 1. Datos expresados como la media ± error estándar. Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas, análisis de Mann-Whitney (P < 0.05, n = 10).

involucradas en la defensa del hospedero. Se analizó la capacidad de aglutinar eritrocitos de conejo en la hemolinfa de los camarones tratados con el producto Acuabio 1 por la presencia de lectinas. Se detectó que el título de lectinas en la hemolinfa de los camarones tratados con Acuabio 1 fue 2 veces mayor (P < 0.05) que en la hemolinfa de los animales sin tratar (Figura 2).

Muchas bacterias producen toxinas proteolíticas que digieren las proteínas de los tejidos hospederos como una fuente de aminoácidos; por tanto, la actividad antiproteasa constituye otro factor importante de la inmunidad innata. Cuando los camarones *L. vannamei* se trataron con el producto Acuabio 1, la actividad antiproteasa en la hemolinfa fue 50% mayor (P < 0.05) que en la hemolinfa de los animales que no recibieron tratamiento (Figura 3).

La actividades peroxidasa y fenoloxidasas caracterizan la defensa oxidativa en la hemolinfa de los camarones peneidos. Al tratar camarones *L. vannamei* con Acuabio 1 se determinó en la hemolinfa un in-

14. Kobayashi T, Enomoto S, Sakazaki RA, Kuwahara S. A new selective isolation medium for pathogenic vibrios: TCBS-Agar. Jap J Bact 1963;18;391-7.

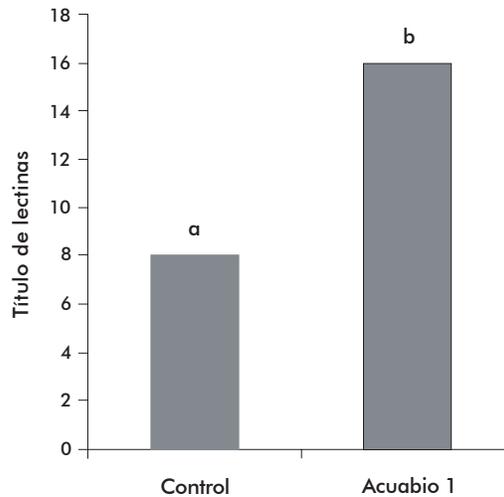


Figura 2. Título de lectinas de la hemolinfa de los grupos Control y Acuabio 1. Datos expresados como la mediana. Letras diferentes indica diferencias estadísticas significativas, análisis de Mann-Whitney (P < 0.05, n=10).

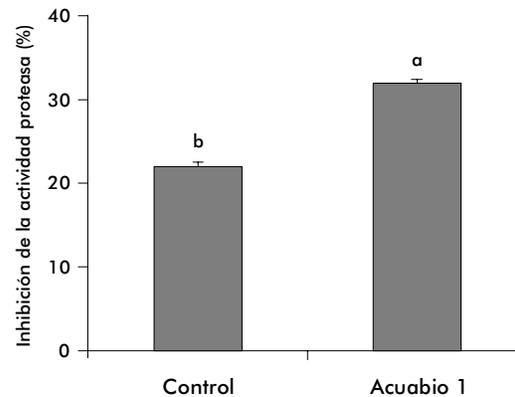


Figura 3. Actividad antiproteasa de los grupos Control y Acuabio 1. Transformación de escala arcosen (X/100)^{1/2}. Datos expresados como la media ± error estándar. Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas, prueba T (P < 0.05, n = 10).

cremento del 67% ($P < 0.05$) en la actividad específica peroxidasa con respecto a la hemolinfa de los animales que no recibieron tratamiento (Figura 4A). Los mismos animales tratados con el producto incrementaron en 40% ($P < 0.05$) la actividad específica fenoloxidasa (Figura 4B).

Por las características del producto Acuabio 1, se decidió evaluar su influencia en la flora bacteriana de *Vibrios* spp. y *Pseudomonas* spp. en hepatopáncreas (elementos patógenos potenciales) de los camarones. Se realizaron conteos del total de u.f.c. por mg de hepatopáncreas crecidos en TCBS. Se determinó que en los camarones tratados con Acuabio 1, disminuye la carga de *Vibrio* spp. y *Pseudomonas* spp. en un 40% ($P < 0.05$) con respecto a los animales no tratados (Figura 5).

Discusión

Los crustáceos, entre otros invertebrados, representan un grupo de gran interés económico por su fácil adaptación a la acuicultura. Diversas especies de crustáceos son afectadas por elementos patógenos (generalmente oportunistas) que llegan a mermar la producción. El presente trabajo muestra por primera vez la influencia de Acuabio 1 sobre el sistema inmune de camarones *L. vannamei*. Los invertebrados carecen de una respuesta inmune humoral basada en anticuerpos y de una respuesta celular basada en células especializadas como los linfocitos, por lo que aparentemente carecen de una especificidad y memoria inmunológica [15]. La inmunidad en los crustáceos está basada en efectores humorales y celulares. Los hemocitos remueven las partículas extrañas en la hemolinfa mediante encapsulación y formando agregados nodulares [16]. Los hemocitos participan además, en el saneamiento de heridas mediante encapsulación y aglutinación celular, lo que permite iniciar el proceso de coagulación mediante la liberación de los factores requeridos del plasma [17].

Los resultados obtenidos mostraron que el grupo tratado con Acuabio 1 evidenció un aumento significativo de hemocitos totales en hemolinfa con respecto al grupo control. Resultados similares se han reportado al usar probióticos estimuladores del sistema inmune en camarones [18] y con los prebióticos Bio-Mos® y β -1,3-D-glucano [19]. Un incremento del número de hemocitos totales provee un incremento de la capacidad inmune durante períodos de alta actividad metabólica [20]. El conteo de hemocitos circulantes en la hemolinfa es un indicador de la salud de los individuos, debido a que las enfermedades infecciosas modifican la composición de la hemolinfa de los crustáceos [21].

Otro parámetro de la inmunidad de los crustáceos que se obtuvo fue la titulación de lectinas. Las lectinas de los crustáceos decápodos tienen características estructurales y especificidad idéntica a las lectinas séricas de los humanos. Se han identificado prácticamente todas las lectinas de las especies de camarones que se cultivan. Las lectinas en invertebrados participan en el reconocimiento del agente extraño [15, 22] inducen aglutinación de estas células y desencadenan, actuando como opsoninas, diversos eventos celulares como la fagocitosis [23].

Los resultados mostraron que el grupo tratado con Acuabio 1 presentó el mayor título de lectinas, lo que

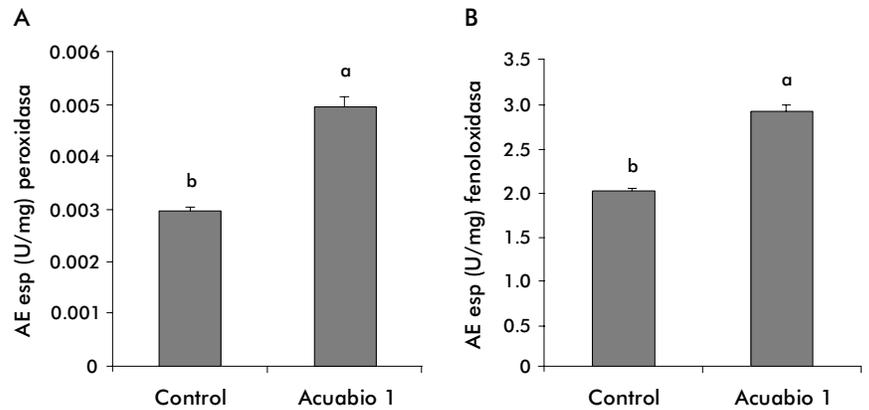


Figura 4. Defensa oxidativa en camarones *L. vannamei* tratados con el producto Acuabio 1. A. Actividad enzimática específica (AEsp) peroxidasa de los grupos Control y Acuabio 1. B. Actividad específica fenoloxidasa de los grupos Control y Acuabio 1. Datos expresados como la media \pm error estándar. Letras diferentes indican diferencias estadísticas, prueba T ($P < 0.05$, $n = 10$).

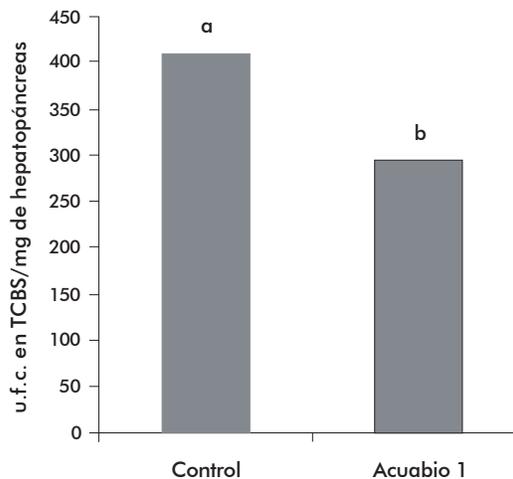


Figura 5. Número de u.f.c./mg de hepatopáncreas de los grupos Control y Acuabio 1. Datos expresados como la mediana. Letras diferentes indican diferencias estadísticas, análisis de Mann-Whitney ($P < 0.05$, $n = 10$).

indicó un aumento de la capacidad de aglutinación frente a un agente extraño. Recientemente se definió que el suministro de estimuladores del sistema inmune en seres humanos aumenta los niveles de las lectinas que unen manosa [24]. Alineamientos múltiples de secuencias muestran que los primeros dominios de reconocimiento de carbohidratos de la lectina (L v LT) de *L. vannamei* conservan completamente los 23 aminoácidos de las lectinas que unen manosa y otras lectinas de peces. Los cuatro residuos importantes en la formación de los tres dominios de reconocimiento de carbohidratos se unen de forma completamente conservada [25]. Por otra parte, se ha demostrado que las lectinas en *L. setiferus* participan en la activación de la respuesta inmune de los hemocitos granulares inducidos por NADPH y otras vías oxidativas mediante un receptor específico [26].

En el presente estudio, la actividad antiproteasa en la hemolinfa de los animales tratados con Acuabio 1 fue mayor, comparada con el control negativo. Se ha descrito que el plasma de los camarones contiene nu-

15. Vázquez L, Pérez A, Millán D, Agundis C, Martín G, Cooper EL, et al. Morphological analysis of haemocytes from the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *J Morphol* 1997;234:147-53.

16. Söderhäll K, Cerenius L. Crustacean Immunity. *Annu Rev Fish Dis* 1992;2:3-23.

17. Johansson MW, Söderhäll K. Cellular immunity in crustaceans and the proPO system. *Parasitol Today* 1989;5:171-6.

18. Hai NV, Buller N, Fotedar R. Effects of probiotics (*Pseudomonas synxantha* and *P. aeruginosa*) on the growth, survival and immune parameters of juvenile western king prawns (*Penaeus latisulcatus* Kishinouye, 1896). *Aquaculture Res* 2009;40: 590-602.

19. Hai NV, Fotedar R. Comparison of the effects of the probiotics (Bio-Mos and [beta]-1,3-D-glucan) and the customised probiotics (*Pseudomonas synxantha* and *P. aeruginosa*) on the culture of juvenile western king prawns (*Penaeus latisulcatus* Kishinouye, 1896). *Aquaculture* 2009; 289:301-306.

merosos inhibidores de proteasas, principalmente α 1-antiproteinasa y α 2-macroglobulina [27]. También se ha establecido que la diferencia en la actividad de la α 1-macroglobulina entre dos especies de trucha está relacionada con la resistencia ante la infección por *Aeromonas salmonicida* [28]. Por tanto, un aumento en este parámetro es beneficioso para la salud de los camarones tratados con Acuabio 1.

La defensa oxidativa, reflejada como actividades peroxidasa y fenoloxidasas, puede ser usada para medir las condiciones de salud de los animales [29]. En el presente trabajo, los animales tratados con Acuabio 1 presentaron mayor actividad de las enzimas oxidativas. La cascada del sistema de fenoloxidasas puede causar la formación de melanina, la estimulación de la fagocitosis, la formación de nódulos, encapsulación y aglutinación [30] así como mediar la síntesis de proteínas como los péptidos antibacterianos [31]. La actividad peroxidasa en plasma es relacionada con la generación y eliminación de oxígeno reactivo durante la fagocitosis [32]. Un incremento en la defensa oxidativa en camarones se ha informado al emplear probióticos [33] e inmunoestimulantes como β -1,3-D-glucano [34, 35].

Los resultados obtenidos en el presente trabajo con los factores asociados a la respuesta innata de los camarones indican el papel de Acuabio 1 como estimulador

del sistema inmune; lo que sugiere que los camarones tratados con este producto tienen mayor resistencia a agentes patógenos al afrontar las condiciones de los estanques. Algunos artículos han publicado evidencias del efecto inmunoestimulante de sustancias administradas en camarones bajo diferentes regímenes; sin embargo, los datos presentados en ellos no respaldan sus conclusiones. En muchos de estos casos existe un mal diseño experimental o ausencia de límites estadísticos que validen las conclusiones [36].

La disminución del número total de u.f.c. por miligramo de hepatopáncreas en TCBS indicó una reducción de la población de la flora de *Vibrios* spp. y *Pseudomonas* spp. Similares resultados se obtuvieron al usar el inmunoestimulante TimsenTM (40% cloruro de N-alquildimetilbenzilamonio) en camarones *P. monodon* [37]. Recientemente, el empleo de un inmunoestimulante endógeno, antilipopolisacárido factor 3, evitó la vibriosis en camarones *P. monodon* [38]. Los resultados obtenidos en el presente trabajo sugieren la función prebiótica del producto Acuabio 1, a causa de la disminución de la población de bacterias patógenas en el hepatopáncreas de los camarones. Tanto la función prebiótica como la de inmunoestimulante de Acuabio 1 en camarones, lo hace un producto de gran interés para la camaronicultura.

20. Truscott R, White KN. The influence of metal and temperature stress on the immune system of crabs. *Funct Ecol* 1990;4: 455-61.

21. Perazzolo LM, Gargioni R, Ogliari P, Barracco MA. Evaluation of some hemato-immunological parameters in the shrimp *Farfantepenaeus paulensis* submitted to environmental and physiological stress. *Aquaculture* 2002;214:19-33.

22. Mullainadhan P, Renwanz L. Lectin-dependent recognition of foreign cells by hemocytes of the mussel, *Mytilus edulis*. *Immunobiology* 1986;171:263-73.

23. Bayne CJ. Phagocytosis and non-self-recognition in invertebrates. *Bioscience* 1990; 40:723-731.

24. Gravholt CH, Leth-Larsen R, Lauridsen AL, Thiel S, Hansen TK, Holmskov U, et al. The effects of GH and hormone replacement therapy on serum concentrations of mannan-binding lectin, surfactant protein D and vitamin D binding protein in Turner syndrome. *Eur J Endocrinol* 2004;150:355-62.

25. Ma THT, Tiu SHK, He JG, Chan SM. Molecular cloning of a C-type lectin (LvLT) from the shrimp *Litopenaeus vannamei*: Early gene down-regulation after WSSV infection. *Fish Shellfish Immunol* 2007;23:430-7.

26. Alpuche J, Rosas C, Vázquez L, Guevara J, Pereyra A, Agundis C, et al. Activation of immunological responses in *Litopenaeus setiferus* hemocytes by a hemocyanin like-lectin. *Aquaculture* 2009;292:11-5.

27. Armstrong PB, Quigley JP, Rickles FR. The Limulus blood cell secretes 2-macroglobulin when activated. *Biol Bull* 1990;178:137-43.

28. Freedman SJ. The role of α 2-macroglobulin in furunculosis: a comparison of rainbow trout and brook trout. *Comp Biochem Physiol B* 1991;98:549-53.

29. Hellio C, Nilles AB, Gagnaire B, Renault T, Thomas-Guyon H. Demonstration of a true phenoloxidase activity and activation of a ProPO cascade in Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg) *in vitro*. *Fish Shellfish Immunol* 2007;22:433-40.

30. Sritunyalucksana K, Söderhäll K. The proPO and clotting system in crustaceans. *Aquaculture* 2000;191:53-69.

31. Lee SY, Soderhall K. Early events in crustacean innate immunity. *Fish Shellfish Immunol* 2002;12:421-37.

32. Le Moullac G, Soyec C, Saulnier D, Ansquer D, Christophe J, Levy P. Effect of hypoxic stress on the immune response and the resistance to vibriosis of the shrimp *Penaeus stylirostris*. *Fish Shellfish Immunol* 1998;8: 621-9.

33. Chiu CH, Guu YK, Liu CH, Pan TM, Cheng W. Immune responses and gene expression in white shrimp *Litopenaeus vannamei*, induced by *Lactobacillus plantarum*. *Fish Shellfish Immunol* 2007;2:364-77.

34. Chang CF, Su MS, Chen HY, Liao IC. Dietary β -1,3-glucan effectively improves immunity and survival of *Panaeus monodon* challenged with white spot syndrome virus. *Fish Shellfish Immunol* 2003;15:297-310.

35. Thanardkit P, Khunrae P, Suphantharika M, Verduyn C. Glucan from spent brewer's yeast: preparation, analysis and use as a potential immunostimulant in shrimp feed. *World J Microbiol Biotechnol* 2002;18:527-39.

36. Smith VJ, Brown JH, Hauton C. Immunostimulation in crustaceans: does it really protect against infection? *Fish Shellfish Immunol* 2003;15:71-90.

37. Sunga HH, Lina SC, Chena WL, Tingb YY, Chao WL. Influence of Timsenk on *Vibrio* populations of culture pond water and hepatopancreas and on the hemocytic activity of tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Aquaculture* 2003;219:123-33.

38. Ponprateep S, Somboonwivat K, Tassanakajon A. Recombinant antilipoplysaccharide factor isoform 3 and the prevention of vibriosis in the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Aquaculture* 2009;289:219-24.

Recibido en enero de 2009. Aprobado en marzo de 2009.