

## **Inmunología de camarones: Conceptos básicos y recientes avances**

Luis Rendón<sup>1</sup>, José Luis Balcázar<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Universidad de Guayaquil. Facultad de Ciencias Naturales (Ecuador)  
Guayaquil (Ecuador)

<sup>2</sup> Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas "Edgar Arellano M."  
Guayaquil (Ecuador)  
e-mail: balcjos@hotmail.com

### **Resumen**

La intensificación de la producción de camarón, basada en el progreso de la zootecnología, se ha incrementado en los últimos años, pero se ha visto acompañada de la aparición de enfermedades infecciosas víricas y bacterianas. Por tanto, una mejor comprensión de la respuesta del sistema inmune de los camarones peneidos nos ayudará a diseñar estrategias más eficientes para el control de enfermedades.

### **Summary**

#### **Shrimp immunity: Basic concepts and recent advances**

With the intensification of the shrimp production, based on progress in zootechnology, has increased but has been accompanied by the development of infectious diseases from viral and bacterial. Therefore, a better understanding of penaeid shrimp immune response should help in the design of more efficient strategies for disease control.

### **Introducción**

Las enfermedades en acuicultura, vienen provocando anualmente pérdidas millonarias, por lo que la prevención y control encierra la mayor importancia a este problema. Gran parte de las enfermedades son causadas por virus y bacterias. Por ejemplo el virus de la Mancha Blanca (WSSV) ha registrado graves pérdidas en casi todas las áreas de cultivo de camarón en América (Berger, 2000).

Como se conoce, los crustáceos no poseen un sistema inmunitario específico ni con capacidad de memoria (Berger, 2000), lo que impide la utilización de vacunas. En la respuesta inmune de los crustáceos se distinguen los efectores celulares y humorales, que actúan en conjunto para eliminar los agentes extraños.

El empleo de estimulantes del sistema inmune, como agentes preventivos, viene siendo materia de investigación a fin de determinar con precisión sus mecanismos de acción y cuantificar su efecto en cultivos comerciales de camarón. La estimulación se provoca al nivel de los efectores humorales y no específicos. La inmunoestimulación se proyecta como una alternativa de prevención a los agentes virales, ya que existen evidencias publicadas que señalan el efecto protector de los  $\beta$ -glucanos y péptidoglicanos contra el WSSV.

## **Sistema inmune**

---

La función del sistema inmune es mantener la individualidad biológica, por ello, su principal actividad es diferenciar y eliminar todo material extraño de sus tejidos (Vargas y cols., 1996).

El sistema inmune de los invertebrados se diferencia del sistema inmune de los vertebrados, principalmente por la ausencia de moléculas del tipo inmunoglobulina y células linfoides.

El sistema de defensa de los crustáceos está basado en efectores celulares y humorales, los cuales se conjugan para eliminar microorganismos potencialmente infecciosos. Los hemocitos son cruciales en estas reacciones inmunitarias siendo capaces de fagocitosis, encapsulación, formación de nódulos y de citotoxicidad (Söderhäll y Cerenius, 1992). Ellos constituyen la fracción celular de la hemolinfa. En los crustáceos la circulación es abierta y la hemolinfa es un análogo de la sangre y la linfa de los vertebrados. Esta baña los tejidos, denominándose hemocele a los sitios donde ella circula. La hemolinfa presenta un color azul verdoso a causa de la hemocianina (proteína respiratoria abundante en la hemolinfa de todos los crustáceos).

## **Hemocitos**

---

Los hemocitos de crustáceos llevan consigo la fagocitosis, remueven partículas extrañas y agentes infecciosos (Raa, 1996). Para identificar y clasificar los hemocitos se han utilizado diferentes criterios: morfológicos, antigénicos, funcionales (Rodríguez, 1996). Básicamente se han descrito tres tipos hemocitarios, encontramos a los hemocitos hialinos (H), que no poseen gránulos; los hemocitos semigranulosos (SG), con abundantes gránulos; y los hemocitos granulosos (G) cargados de gránulos (Johansson y cols., 2000)

### **1. Hemocitos Hialinos**

Presentan un delgado citoplasma basófilo, un núcleo amplio y céntrico. Son células que se adhieren y se extienden fácilmente, no contienen gránulos densos. En el cangrejo de río, los hemocitos hialinos se caracterizan por la ausencia de gránulos pero contienen inclusiones citoplasmáticas, estas células son capaces de fagocitar (Johansson y Söderhäll, 1989; Söderhäll y Cerenius, 1992). Los hemocitos hialinos tienen capacidad fagocítica (Raa, 1996). Intervienen en la coagulación y no son refringentes en el microscopio de contraste de fases.

### **2. Hemocitos Semigranulosos**

Poseen un núcleo esférico o en forma de herradura y muchos gránulos pequeños de forma redondeada. En los camarones, estas células intervienen en la fagocitosis, encapsulación y en la liberación del sistema profenoloxidasa proPO (melanización). Además ellas sintetizan y liberan las peneidinas, péptidos antimicrobianos (Dextoumieux y cols., 2000). Tienen moderada refringencia cuando se observan al microscopio de contraste de fases.

### **3. Hemocitos Granulosos**

Se caracterizan por ser células grandes. Poseen grandes gránulos, alta relación citoplasma-núcleo y excéntrico, inclusiones citoplasmáticas, así como un retículo

endoplasmático liso y ribosomas libres en citoplasma. Estos hemocitos almacenan las enzimas que constituyen el sistema proPO en los crustáceos a un nivel más alto que los semigranulosos. Estas enzimas son liberadas por exocitosis cuando estos hemocitos son estimulados por la peroxinectina y la proteína fijadora de  $\beta$ -glucanos (Smith y Söderhäll, 1983). Al igual que los hemocitos SG ellos sintetizan y almacenan las peneidinas (Dextoumieux y cols., 2000). Intervienen además en el mecanismo de encapsulación. Tienen mucha refringencia cuando se observa al microscopio de contraste de fases.

## **Mecanismos de defensa a medición celular**

---

### **1. Fagocitosis**

Es una reacción de defensa celular. La eliminación de material particulado en los crustáceos la realizan dos tipos de células: los hemocitos libres y los fagocitos fijos (en los sinus hemales del hepatopáncreas en la mayoría de los decápodos). Johnson (1987) menciona que la fagocitosis es la eliminación de materiales extraños del hemocele de crustáceos decápodos, donde se ven involucradas varias clases de células. Proteínas y pequeños virus son eliminados por los podocitos, células especializadas en picnocitosis, ubicadas en las branquias y en la glándula antenal (Rodríguez, 1996). La fagocitosis junto con otros mecanismos humorales constituye la primera línea de defensa inmunitaria cuando una partícula atraviesa la primera barrera de defensa que constituye la cutícula (Söderhäll y Cerenius, 1992).

### **2. Nodulación**

En los nódulos los agentes extraños son aprisionados por varias capas de hemocitos, formando pequeñas cápsulas desde las cuales ciertos hemocitos se desprenden y se infiltran en la masa bacteriana intentando fagocitarla. El resultado final de la formación de nódulos es que los microorganismos son atrapados por varios hemocitos, y normalmente el nódulo es fuertemente melanizado por una fuerte actividad fenoloxidasa (Söderhäll y Cerenius, 1992).

### **3. Encapsulación**

La encapsulación es un tipo de respuesta multicelular para eliminar partículas extrañas que no puede ser destruida por los mecanismos humorales (Vázquez y cols., 1998). Actúa cuando una partícula es demasiado grande para ser fagocitada, muchos hemocitos cubren a la partícula grande formando capas alrededor de ella (Söderhäll y Cerenius, 1992). Las cápsulas son fuertemente melanizadas.

### **4. Coagulación**

Otro importante proceso en los crustáceos es el rápido sello de las heridas que previenen la pérdida de la hemolinfa y evitan el ingreso de partículas extrañas al organismo (Söderhäll y Cerenius, 1992). La proteína de la coagulación es un dímero plasmático cuyo monómero tiene aproximadamente 200 kDa.

### **5. Sistema Profenoloxidasa**

El sistema proPO al ser activado, se manifiestan una serie de reacciones enzimáticas en cascada (Vázquez y cols., 1998). El sistema proPO de los camarones se encuentra en el interior de los gránulos de los hemocitos granulosos

y semigranulosos que puede ser liberado por estimulación de péptidoglicanos (PG),  $\beta$ -glucanos o lipopolisacáridos (LPS). Una vez liberado el contenido granular por degranulación, el proPO es activado en fenoloxidasa (PO).

La enzima activadora es una serina-proteasa de tipo tripsina llamada *Profenoloxidasa Activating Protein* (ppA) (Vargas y Yepiz, 1998). La fenoloxidasa es la enzima responsable de la melanización observada en crustáceos e insectos (Söderhäll y Cerenius, 1992). Esta última es responsable de la oxidación de fenoles en quinones los cuales se polimerizan en melanina. La melanina es un pigmento pardo-negro al cual, se le adjudican diversas propiedades biológicas tal como la inhibición de la actividad de enzimas bacterianas y fúngicas (Smith y Söderhäll, 1983).

La activación del sistema proPO, medido en términos de actividad de la fenoloxidasa (PO), ha sido muy usado por algunos investigadores para medir la inmunoestimulación en camarones (Sung y cols., 1994; Sung y cols., 1996).

## 6. Síntesis y liberación de péptidos antimicrobianos

Los péptidos antimicrobianos son proteínas que presentan actividades antibacterianas (bacterias Gram positivas) y antifúngicas. En particular, muchos estudios han investigado la caracterización de péptidos antimicrobianos, que matan o inhiben el crecimiento de microorganismos (Destoumieux y cols. 2000). Estos mismos autores demostraron que las peneidinas son mayormente sintetizadas en los hemocitos, donde ellas son continuamente procesadas y almacenadas; y en tal caso almacenadas dentro de los gránulos citoplasmáticos.

Las peneidinas se clasifican dentro de tres grupos distintos basados en secuencias de aminoácido, estructuras secundarias y similaridad funcional (Bulet y cols., 1999).

## 7. Proteínas de reconocimiento

La presencia de compuestos microbianos en el sistema inmune pueden activar directamente las funciones celulares de defensa tales como fagocitosis, melanización encapsulación y coagulación; las proteínas reconocedoras presentes en el plasma amplían ese estímulo. El uso de factores purificadores del sistema proPO y separación de hemocitos han hecho posible demostrar en el cangrejo de agua dulce dos proteínas que están directamente implicadas en la comunicación celular entre diferentes hemocitos.

Una de estas proteínas es la  $\beta$ -1,3-Glucan Binding Protein (BGBP) presente en el plasma, también aparece en función como un reconocedor de proteínas en el sistema inmune de artrópodos (Söderhäll y Cerenius, 1992). La BGBP ha sido descrita como componente del sistema inmune en Artrópodos (Vargas y Yepiz, 2000), identificada en el plasma del camarón blanco *Penaeus vannamei* por Vargas y cols. (1996). Esta proteína reacciona con los  $\beta$ -glucanos, y el complejo glucano BGBP induce a la degranulación y activación del sistema proPO. La otra proteína es la *Lipopolysaccharide Binding Protein* (LPSBP9 reconocedora de lipopolisacáridos. Esta proteína fue descrita como una aglutinina y es capaz de aglutinar bacterias, una vez que reacciona con el LPS o bacterias, esta proteína se une a los hemocitos y estimula la fagocitosis (Vargas y cols., 1996).

La BGBP y la LPS-binding estimulan las funciones celulares solamente después de reaccionar con los  $\beta$ -glucanos y Lipopolisacáridos respectivamente (Vargas y Yepiz, 2000).

## Los inmunoestimulantes

---

Los problemas virales para los cuales no existe la alternativa de los antibióticos, han incrementado el interés en la prevención mediante inmunoestimulación. En años recientes, los inmunoestimulantes han sido usados para aumentar la resistencia de camarones contra bacterias e infecciones virales (Sung y cols., 1994). Las sustancias inmunoestimulantes tienen la cualidad de alertar al sistema inmune no específico y son por regla general extraídas de las paredes de microorganismos, como bacterias Gram negativas (lipopolisacáridos), bacterias Gram positivas (péptidoglicanos) y de hongos, levaduras y algas ( $\beta$ -glucanos) .

La supervivencia de postlarvas alimentadas con  $\beta$ -glucano por 15 días fue significativamente más alta que el grupo alimentado con la dieta control cuando fueron desafiados con WSV (Chang y cols., 1999). Todos los camarones del grupo control murieron en 5 días. Por el contrario, el promedio de supervivencia en el grupo alimentado con  $\beta$ -glucano fue del 12.2% sobre 6 días. Por otra parte usando diferentes extractos de  $\beta$  1,3-1,6 glucanos de levaduras de paredes celulares Song y cols. (1997) observaron un aumento de la resistencia de *Penaeus monodon* frente a la infección de WSSV.

La finalidad ha sido diseñar un protocolo de utilización de estos aditivos. Otero y cols. (2000) determinaron que las mejores concentraciones de  $\beta$ -glucanos para provocar una excitación durable del sistema inmune del camarón, fueron las de 73 y 104 ppm de  $\beta$ -glucanos por Kg de alimento.

Adicionalmente estudios realizados por Cornejo (2001) mostraron que inmunoestimulando postlarvas PL-15 con  $\beta$ -glucanos se obtuvo un efecto protector que se extendió durante 2 meses, con una supervivencia del 34% contra el 11% del control (sin diferencias significativas). Los animales que recibieron una segunda dosis de inmunoestimulación durante la corrida tuvieron una supervivencia del 48 %, siendo esta significativamente mayor al control.

Estudios realizados por Itami y cols. (1998) reportaron que la administración oral de péptidoglicanos (PG) derivados de *Bifidobacterium thermophilum*, fueron efectivos para la prevención de la mancha blanca durante 7 días de tratamiento. En este experimento, el PG fue administrado a camarones *Penaeus japonicus* a través de la dieta, 0.2 mg/Kg de peso corporal al día, alternado con 7 días sin PG, obteniéndose una tasa de supervivencia en el grupo alimentado con PG significativamente mayor que el control ( $p < 0.01$ ). Este mismo autor desafió a los camarones con WSV, donde el grupo alimentado con PG fue significativamente mayor que el grupo control ( $p < 0.01$ ).

### 1. Beta-glucanos

Son estructuras polisacáridas de paredes celulares de hongos y levaduras compuestas por unidades de glucosa que son enlazados a través de  $\beta$ -1,3- $\beta$ -1,6. El  $\beta$ -1,3 glucano está presente en la pared celular de levadura de pan (*Saccharomyces cerevisiae*) (Raa, 1996).

El  $\beta$ -glucano es una micropartícula con un diámetro de alrededor de 2-4  $\mu$ m, compuesta de más de un 95% de glucosa. Este componente se encuentra en la

pared celular de levaduras y hongos los cuales tienen dos componentes: fibrilares y amorfos. Los primeros contienen la quitina y la celulosa conformando las microfibrillas; mientras que los amorfos o matriciales contienen el glucano (Duvic y Söderhäll, 1994).

## 2. Péptidoglicanos (PG)

Alrededor de la membrana citoplasmática de las bacterias Gram positivas se encuentra una rígida pared celular de péptidoglicano que da forma a la bacteria. El péptidoglicano consiste de un columna vertebral de polisacárido alternando residuos de N-acetilglucosamina (NAG) y N-ácido acetilmurámico (NAM) con pépticos (Whitt, 1994).

## 3. Lipopolisacáridos (LPS)

Los LPS se encuentran formando parte de las paredes de las bacterias Gram negativas, inducen efectos inflamatorios y por ende activan los mecanismos de defensa del huésped (Patrick y Larkin, 1995). Por otra parte, estudios realizados demuestran que los LPS causa un aumento exponencial en el número de hemocitos circulantes en camarones *Litopenaeus schmitti* (Espinosa y cols., 2002).

## Agradecimientos

El presente trabajo fue realizado bajo el financiamiento del Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas "Edgar Arellano M."

## Bibliografía

- Berger, C. (2000) Aportes de la bio-tecnología a la alimentación y a la inmunoestimulación de camarones peneidos. Asociación Langostina Peruana (ALPE). 102-110
- Bulet P., C. Hetru, J.L. Dimarcq, D. Hoffmann (1999). Antimicrobial peptides in insects; structure and function. *Dev. Comp. Immunol.*, 23:329-344
- Chang, C.F., M.S. Su, H.Y. Chen, C.F. Lo, G.H. Kou y I.C. Liao (1999) Effect of dietary  $\beta$ -1,3 glucanos on resistance to white spot syndrome virus (WSSV) in postlarval and juvenile *Penaeus monodon*. *Dis. Aquat. Org.*, 36:163-168
- Cornejo, F. (2001) Estudio de la resistencia contra el virus de la Mancha blanca (WSSV) en *Penaeus vannamei* inmunoestimulado y su posible relación con inmunidad adaptativa. Escuela Académica Profesional de Pesquera. Perú.
- Destomieux, D., M. Muñoz, C. Cosseau, J. Rodriguez, P. Bulet, M. Comps y E. Bachère (2000) Penaeidins, antimicrobial peptides with chitin-binding activity, are produced and stored in shrimp granulocytes and released after microbial challenge. *J. Cell Science*, 113:461-469
- Duvic, B. y K. Söderhäll (1992) Purification and partial characterization of a 1,3  $\beta$ -glucanos-binding protein-membrane receptor from blood cells of the crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *Eur.J. Biochem.*, 207:223-228
- Espinosa, G., T. Rodríguez, J. Marrero, L. Ramos, Y. Borrell, U. Bécquer, F. Nodas y N. Hernández (2002) Efectores inmunitarios como herramientas en la prevención de enfermedades en el camarón blanco *Litopenaeus schmitti*. I Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura. 765-777
- Itami, T., M. Asano, K. Tokushige, K. Kubono, A. Nakagawa, N. Takeno, H. Nishimura, M. Maeda, M. Kondo y Y. Takahashi (1998) Enhancement of disease resistance of kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, after oral administration of peptidoglycan derived from *Bifidobacterium thermophilum*. *Aquaculture*, 164:277-288
- Johansson, M., P. Keyser, K. Sritunyaluksana, y K. Söderhäll (2000) Crustacean haemocytes and haematopoiesis. *Aquaculture*, 191:45-52

10. Johansson, M. y K. Söderhäll (1989) Cellular Immunity in Crustaceans and the proPO System. Reprinted from Parasitology Today. 5(6): 171-176
11. Johnson, P. (1987) A review of fixed phagocytic and pinocytotic cells of decapod crustaceans, with remarks on hemocytes. Dev. Comp. Immunol., 11: 679-704
12. Otero, V., C. Molina, R. Cedeño, M. Sotomayor y J. Rodríguez (2000) Evaluación del efecto inmunoestimulante de los  $\beta$ -glucanos . El Mundo Acuicola, 6(2):46-51
13. Patrick S. y M.J. Larkin (1995) Non-Clonal Recognition and Immunomodulation. In: Immunological and Molecular Aspects Bacterial Virulence. 7-25
14. Raa, J. (1996) The use of immunostimulatory substances in fish and shellfish farming. Reviews in Fisheries Science, 4(3):229-288
15. Rodríguez, J. (1996) Estado del arte de la investigación científica en inmunología de Penaeidos". En: Calderón J., F. Magallón, E. Andratta, R. Sánchez (Eds). La investigación científica en Penaeidos de Iberoamérica. San Pedro de Manglaralto-Ecuador. 37-45
16. Smith, V.J. y K. Söderhäll (1983) Induction of degranulation and lysis of hemocytes in the freshwater crayfish *Astacus astacus* by components of the prophenoloxidase activating system in vitro. Cell and tissue research, 233:295-303
17. Söderhäll, K. y L. Cerenius (1992) Crustacean immunity. Ann Rev of Fish Diseases, 3-23
18. Song Y.L., J.J. Liu, L.C. Chan y H.H. Sung (1997) Glucan induced disease resistance in tiger shrimp *Penaeus monodon*. Fish Vaccinal, 90:413-421
19. Sung, H, G. Kou y L. Song (1994) Vibriosis resistance induced by glucan treatment in tiger shrimp (*Penaeus monodon*). Fish Pathology, 29(1):11-17
20. Sung, H., Y. Yang y Y. Song (1996) Enhancement of microbicid activity in the tiger shrimp *Penaeus monodon* via immunostimulation. J. Crustacean Biology, 16(2):278-284
21. Vargas, F., I. Higuera, F. Jiménez, J. Hernández, T. Gollas y G. Yepiz (1996) Posibilidades de inestimulación del camarón a través del alimento. Avances en Nutrición Acuicola III. Memorias del Tercer Simposium Internacional de Nutrición Acuicola. 433-439.
22. Vargas, F. y G. Yepiz (1998) Shrimp Immunity. Trends in Comparative Biochem. & Physiol, 5: 195-210
23. Vargas, F. y G. Yepiz (2000) Beta glucan binding protein and its role in shrimp immune response. Aquaculture, 191:13-21
24. Vázquez, L., C. Sierra, S. Juárez, C. Agundis, A. Zavala y E. Zenteno (1998) Mecanismos de inmunidad en crustáceos. Interciencia, 23(6): 344-348
25. Whitt, S. (1994) Cell surface structure of bacteria. En: Abigail A. Salyers and Dixie D. Whitt. (Eds) Bacterial pathogenesis: a molecular approach. ASM Press Washinton, D.C. 339-342

