



T  
639.543  
M967  
C.2

## ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DEL LITORAL

FACULTAD DE INGENIERIA MARITIMA Y  
CIENCIAS DEL MAR



### “ DESARROLLO Y OPTIMACION DE ENSAYOS PARA EVALUAR EL ESTADO INMUNITARIO DEL CAMARON *P.vannamei* ”

Tesis de grado  
Previa obtención del Título de:

Acuicultor

Presentada por:

Marcelo Muñoz Naranjo

Guayaquil-Ecuador

1996

*En la piel de una gota  
mis alas volvieron rotas  
Y entre otras cosas  
ya no escriben con tinta de luz.*

*Enrique Bunbury.*

## AGRADECIMIENTOS

A Emma y Rodrigo por su dedicación y apoyo en cada instante de mi vida, siempre atentos por mi bienestar y felicidad.

A mis hermanos Segundo, Diego, Inés, Raúl y Franklin, compañeros de siempre.

Al C.E.N.A.I.M., por haberme dado la oportunidad de culminar mi carrera estudiantil y brindarme todas las facilidades para la realización de esta tesis.

Al Dr. Jorge Calderón director de C.E.N.A.I.M., por aceptar el desarrollo de esta tesis y su valiosa colaboración en el análisis estadístico de este trabajo.

A la Dra. Jenny Rodríguez, a una gran jefa y amiga, por la confianza depositada en mi persona cuando aceptó dirigirme en esta empresa y la paciencia demostrada al soportarme por cerca de un año. Muchas gracias por su ayuda en la redacción de este documento.

Al Dr. Eric Mialhe, mi gran amigo y grato compañero de trabajo, siempre atento para apoyarme cuando las cosas se presentaron difíciles con sus valiosos consejos e ideas. Muchas gracias también por tu ayuda en la redacción de este documento.

Al M.Sc. Jean Jacques Thibaut, por tu valiosa colaboración durante el desarrollo del presente trabajo, y mucho más importante, por tu amistad.

A la Dra. Evelyne Bachere (I.F.R.E.M.E.R.- D.R.I.M. Montpellier), por su gran ayuda, en la elaboración del presente trabajo.

Al Dr. Olivier Condamines, por su cooperación y supervisión en el

desarrollo del presente trabajo.

A la Bióloga Camila Parra, por ser una excelente compañera de trabajo y una buena amiga.

A la Dra. Lucía Carrera, por su paciencia y cooperación cuando requerí de su ayuda.

Al Q.F., César Molina por su colaboración en el análisis estadístico de algunos resultados.

A mis amigos Fernando Tapia y Fabricio Echeverría, por su cooperación en el desarrollo de este trabajo.

Un agradecimiento muy especial a mis compañeros ( Mara, Lorena, Paola, Lilia, César, Rubén, Eduardo) por su apoyo. Gracias por soportarme y aceptarme (T).

A todo el personal que labora en el C.E.N.A.I.M., por su ayuda en todas las labores que emprendimos juntos.

A mis amigos: Juan Carlos, David, Ransés, Fernando J, Arturo, Mario, Kléber, Javier, Xavieres, Walter, Isabel, Pepito, Ernesto, Philip, Antonio T, por ser una fuente inagotable de energía.

A José Melena, por su amistad, consejos y ayuda en la edición de este documento.

## DEDICATORIA

A mis padres:

Emma y Rodrigo.

A la memoria de  
Lucía Carrera.

## DECLARACION EXPRESA

“La responsabilidad por los hechos, ideas y doctrinas expuestos en esta tesis, me corresponden exclusivamente; y el patrimonio intelectual de la misma, a la ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DEL LITORAL”.

(Reglamento de Exámenes y Títulos profesionales de la ESPOL).



A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Marcelo Muñoz N.', is written over a horizontal line.

Marcelo Muñoz N.



---

Jorge Faytong Durango Ing.  
Presidente del Tribunal.



---

Jenny Rodríguez, Ph.D.  
Directora de Tesis.



---

Jorge Calderón, Ph.D  
Miembro del Tribunal.



---

Tamara de Ross M.Sc.  
Miembro del Tribunal.

## RESUMEN

La evaluación del estado inmunitario del camarón *Penaeus vannamei*, mediante un diagnóstico oportuno, surge como una alternativa para mejorar las condiciones de cultivo del camarón en el Ecuador.

En el presente trabajo se implementaron y optimizaron tres ensayos para evaluar la respuesta inmune de *P. vannamei*, la implementación de estos ensayos se basó en criterios celulares y humorales. Para la realización de los ensayos fue necesario optimizar la obtención y la preparación de muestras *in vitro*. Con el fin de evaluar la respuesta celular, se emprendió la preparación de hemogramas y se implementó con éxito un ensayo para la cuantificación del anión superóxido, radical tóxico producido durante la fagocitosis,; además otras técnicas de estimación de otros radicales tóxicos fueron exploradas. Para la evaluación de la respuesta humoral, se implementó un ensayo ELISA competitivo para cuantificar la proteína inmunitaria  $\alpha$  2 macroglobulina circulante.

Finalmente, a fin de evaluar la capacidad descriptiva de los ensayos, se realizó un ensayo rústico de toxicidad utilizando el pesticida Tilt como sujeto de prueba. Sobre las muestras de hemolinfa extraídas se realizaron hemogramas y un ELISA competitivo.

## Abreviaturas

- $^{\cdot-}\text{O}_2$  : Anión superóxido.
- $^1\text{O}_2$  : Singlet de oxígeno.
- A.B.A. : Alimentos balanceados.
- Ac.Mc. : Anticuerpos monoclonales.
- D.M.F. : Dimetil formamida.
- D.M.S.O. : Dimetil sulfóxido.
- E.D.T.A. : Etilén diamino tetra-acético.
- E.L.I.S.A. : Ensayo inmunosorbente de enzima ligada.
- F.C. : Factor de coagulación.
- Ig.G. : Inmunoglobulina G.
- L 15. : Medio Leibovitz
- MHBSS : Solución salina modificada de Hank's.
- MHBSS 1 X: Solución salina modificada de Hank's con 6mM de  $\text{Ca}^{++}$  y 13 mM de  $\text{Mg}^{++}$ .
- MHBSS 2 X: Solución salina modificada de Hank's con 12 mM de  $\text{Ca}^{++}$  y 26 mM de  $\text{Mg}^{++}$ .
- N.B.T. : Nitro blue tetrazolium.
- N.E.M. : N-ethylmaleimide.
- P.B.S. : Tampón fosfato salino sin  $\text{Ca}^{++}$  y  $\text{Mg}^{++}$ .
- P.B.S. 1 X : Tampón fosfato salino con  $\text{Ca}^{++}$  y  $\text{Mg}^{++}$ , dilución 1/10.
- P.B.S. 2 X : Tampón fosfato salino con  $\text{Ca}^{++}$  y  $\text{Mg}^{++}$ , dilución 1/5.
- P.M.A. : Phorbol 12-myristate 13-acetate.
- P.R.S. : Rojo de fenol salino.
- S.O.D. : Superoxidismutasa.
- Tween 20 : Polyoxyethylene-sorbitan monolaurate.

## INDICE GENERAL

RESUMEN.....	vi
ABREVIATURAS.....	vii
INDICE GENERAL.....	viii
INDICE DE FIGURAS.....	xiii
INDICE DE TABLAS.....	xvi
INTRODUCCION.....	17
ANTECEDENTES.....	19
1.1. Respuesta Inmune.....	19
1.2. Hemocitos.....	21
1.3. Fagocitosis y choque respiratorio.....	22
1.4 Encapsulación.....	24
1.5 Nodulación.....	24
1.6. Melanización y sistema profenoloxidasa.....	26
1.7. Reconocimiento y opsonización.....	27
1.7.1. Proteínas de reconocimiento.....	27
1.7.2. Opsoninas.....	28
1.7.3. Aglutininas.....	29
1.8. Inhibición de proteasas y $\alpha$ 2 macroglobulina.....	29
1.9 Coagulación.....	33
1.10. Factores microbicidas.....	33
II. MATERIALES Y METODOS.....	34
2.1. Material biológico.....	34
2.1.1. Camarones y hemolinfa.....	34
2.1.2. Anticoagulantes.....	35

2.2. Técnicas y medios de cultivo de hemocitos.....	35
2.2.1. Protocolos de cultivo de hemocitos.....	35
2.2.1.1. Primer protocolo para la obtención de primocultivos.....	36
2.2.1.2. Segundo protocolo para la obtención de primocultivos.....	37
2.2.2. Medios de cultivo.....	37
2.3. Hemogramas.....	38
2.3.1. Cuantificación del número de hemocitos.....	38
2.3.2. Citocentrifugación.....	38
2.3.3. Tinciones.....	39
2.4. Técnicas de evaluación del choque respiratorio en los hemocitos.....	39
2.4.1. Cuantificación del anión superóxido.....	39
2.4.1.1. Principio.....	39
2.4.1.2. Reactivos.....	40
2.4.1.3. Protocolo cualitativo.....	41
2.4.1.4. Protocolo cuantitativo.....	42
2.4.1.5. Análisis estadístico.....	42
2.4.2. Cuantificación del peróxido de hidrógeno extracelular.....	42
2.4.2.1. Principio.....	42
2.4.2.2. Reactivos.....	43
2.4.2.3. Protocolo.....	44
2.4.3. Cuantificación de la actividad quimioluminiscente.....	45
2.4.3.1. Principio.....	45

2.4.3.2.	Reactivos.....	46
2.4.3.3.	Protocolo.....	46
2.5.	Inmunodosificaciones.....	47
2.5.1.	Inmunofluorescencia .....	47
2.5.1.1.	Principio.....	47
2.5.1.2.	Reactivos.....	47
2.5.1.3.	Protocolo.....	48
2.5.2.	ELISA indirecto.....	48
2.5.2.1.	Principio.....	49
2.5.2.2.	Reactivos.....	49
2.5.2.3.	Protocolo.....	49
2.5.3.	ELISA competitivo.....	52
2.5.3.1.	Principio.....	52
2.5.3.2.	Reactivos.....	53
2.5.3.3.	Protocolo.....	53
III	RESULTADOS Y DISCUSION.....	57
3.1.	Desarrollo y optimación de primocultivos de hemocitos.....	57
3.1.1.	Evaluación de anticoagulantes.....	57
3.1.1.1	Solución modificada de Alsever.....	58
3.1.1.2	Citrato de Sodio al 10%.....	58
3.1.1.3	Solución de Cisteína al 2.5% en MHBSS.....	59
3.1.1.4	Solución de Citrato al 5% en MHBSS.....	59
3.1.1.5	Solución de Citrato al 5 % y Cisteína 1.25% en MHBSS.....	59
3.1.2.	Implementación de cultivos primarios de hemocitos.....	61
3.1.2.1.	PBS IX.....	62

3.1.2.2. PBS 2X.....	64
3.1.2.3. Agua de mar estéril.....	65
3.1.2.4. MHBSS.....	65
3.1.2.5. MHBSS con 6 mM de Ca <sup>++</sup> y 13 mM de Mg <sup>++</sup> .....	66
3.1.2.6. MHBSS con 12 mM de Ca <sup>++</sup> y 26 mM de Mg <sup>++</sup> .....	65
3.1.2.7. L15.....	66
3.2. Hemogramas.....	69
3.2.1. Selección del mejor anticoagulante para la determinación del hemograma.....	69
3.2.2. Comparación de técnicas para la determinación de los tipos hemocitarios.....	70
3.2.2.1. Tinciones.....	70
3.2.2.2. Microscopía de contraste de fases.....	71
3.2.3. Determinación de hemogramas.....	71
3.3. Exploración y optimación de ensayos para evaluar la actividad fagocítica de los hemocitos en <i>P. vannamei</i> .....	75
3.3.1. Implementación de un protocolo para la cuantificación del anión superóxido.....	75
3.3.1.1. Determinación de la solución de trabajo de NBT..	76
3.3.1.2. Implementación de primocultivos de hemocitos para ensayos de cuantificación del anión superóxido.....	77
3.3.1.3. Efecto del Ca <sup>++</sup> y Mg <sup>++</sup> sobre la producción de anión superóxido.....	81
3.3.1.4 Efecto del número de hemocitos y de diferentes estimulantes sobre	

la producción de anión superóxido.....	84
3.3.1.5 Protocolo optimizado para cuantificar la producción de anión superóxido.....	85
3.3.2. Exploración sobre la detección del peróxido de hidrógeno.....	91
3.3.2.1. Ensayo de peroxidación del rojo fenol.....	91
3.3.3. Ensayo de quimioluminiscencia.....	93
3.4. Implementación de un ensayo para la cuantificación de la $\alpha$ 2 macroglobulina .....	96
3.4.1. Implementación de una prueba ELISA estándar.....	97
3.4.2. Ensayo ELISA competitivo indirecto.....	101
3.5. Evaluación de los ensayos inmunitarios en un análisis de toxicidad usando Tilt.....	105
3.5.1. Efecto del fungicida Tilt sobre el. número total de hemocitos y subpoblaciones.....	106
3.5.2. Efecto del Tilt sobre la presencia. de $\alpha$ 2 macroglobulina.....	106
CONCLUSIONES.....	109
RECOMENDACIONES.....	111
ANEXOS.....	113
BIBLIOGRAFIA.....	129

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1.1:	Tipos hemocitarios.....	21
Figura 1.2:	Fagocitosis independiente del oxígeno.....	23
Figura 1.3:	Choque respiratorio.....	24
Figura 1.4:	Encapsulación y nodulación.....	25
Figura 1.5:	Sistema profenoloxidasa.....	27
Figura 1.6:	Opsonización.....	30
Figura 1.7:	Inhibición de proteasas y alfa 2 macroglobulina.....	32
Figura 2.1:	ELISA indirecto.....	51
Figura 2.2:	ELISA competitivo.....	55-56
Figura 3.1.1:	Hemocitos extraídos con diferentes anticoagulantes.....	63
Figura 3.1.2:	Primocultivos de hemocitos preparados en diferentes medios de cultivo.....	68
Figura 3.2.1.:	Tinciones de hemocitos citocentrifugados realizadas con el Kit hemacolor para determinar los diferentes tipos hemocitarios.....	72
Figura 3.2.2:	Observación de hemocitos en fresco realizadas con el microscopio de contraste de fases.....	72
Figura 3.2.3 :	Determinación de los hemogramas.....	74
Figura 3.3.1:	Efecto de diferentes medios de cultivo sobre la producción de anión superóxido conservando el plasma.....	79
Figura 3.3.2:	Efecto de diferentes medios de cultivo sobre la producción de anión superóxido sin conservar el plasma.....	80

Figura 3.3.3:	Efecto de diferentes concentraciones de los iones de $\text{Ca}^{++}$ y $\text{Mg}^{++}$ sobre la producción de anión superóxido.....	83
Figura 3.3.4:	Gráfico que representa los datos cuantitativos de reducción de NBT utilizando diferentes concentraciones de $\text{Ca}^{++}$ y $\text{Mg}^{++}$ .....	84
Figura 3.3.5:	Hemocitos estimulados con diferentes concentraciones de PMA.....	86
Figura 3.3.6:	Efecto de diferentes estimulantes sobre la producción de $\text{O}_2^-$ .....	86
Figura 3.3.7:	Efecto de diferentes estimulantes y concentraciones celulares sobre la producción de anión superóxido.....	87
Figura 3.3.8:	Protocolo optimizado de cuantificación del anión superóxido.....	89-90
Figura 3.3.9:	Cinética de producción de $\text{H}_2\text{O}_2$ de hemocitos con y sin estimulantes .....	92
Figura 3.3.10:	Ensayo de quimioluminiscencia dependiente del luminol.....	94
Figura 3.4.1:	Estimación de la D.O. en función de la $\alpha 2$ macroglobulina en una muestra de hemolinfa.....	97
Figura 3.4.2:	Señales obtenidas con diferentes sustancias de saturación utilizando PBS-Tween 0.1%.....	99
Figura 3.4.3:	D.O. obtenidas con diferentes sustancias de saturación utilizando PBS-Tween 0,1%-Leche 0.1%.....	99
Figura 3.4.4:	Estimación de la cantidad de la D.O. en función de la	

	cantidad de anticuerpo.....	100
Figura 3.4.5:	Curva que relaciona la D.O contra su correspondiente factor de dilución.....	102
Figura 3.4.6:	Curva obtenida a partir de los porcentajes de inhibición contra el factor de dilución.....	103
Figura 3.4.7:	Porcentaje de inhibición de la $\alpha$ 2 macroglobulina utilizando muestras de hemolinfa de 10 camarones de una población homogénea.....	104
Figura 3.5.1:	Efecto del pesticida Tilt sobre los hemogramas.....	107
Figura 3.5.2:	Efecto del pesticida Tilt sobre la cantidad de $\alpha$ 2 macroglobulina.....	108

## INDICE DE TABLAS

Tabla I	Proporción de hemolinfa que puede ser obtenida con diferentes anticoagulantes y el efecto del anticoagulante sobre el aspecto morfológico de los hemocitos.....	60
Tabla II	Características presentadas por los hemocitos al ser cultivados en diferentes medios de cultivo.....	64

## INTRODUCCION

La acuicultura en el Ecuador se ha caracterizado por su desarrollo explosivo y por estar dedicada de manera exclusiva al cultivo de camarón. El respaldo tecnológico, necesario para asegurar o incrementar la producción de la naciente industria, fue implantándose según las necesidades inmediatas del sector, sin contar con una estrategia para el "Desarrollo sostenido" del recurso. Como consecuencia el sector camaronero, nunca ha estado preparado para enfrentar las dificultades que se han presentado.

Por otra, parte la gran extensión del cultivo se ha traducido en daños al medio ambiente, siendo estos en algunos casos irreversibles, como la desaparición de manglares, el cual constituye el hábitat de muchas especies animales, incluyendo el mismo camarón. Además muchas camaroneras fueron construidas en zonas poco adecuadas, como el golfo de Guayaquil, el cual presentaba ya, una contaminación por desechos industriales y agrarios, y donde la calidad del agua del mar no puede ser controlada.

Los desordenes en las interacciones normales del camarón con su hábitat, pueden provocar alteraciones fisiológicas y debilitar a los animales haciéndolos más susceptibles a la aparición y propagación de enfermedades infecciosas y no infecciosas. A fin de asegurar la productividad del recurso, es necesario aprovechar o restablecer el equilibrio entre el camarón y el medio en el que se cultiva, controlar los

patógenos y profundizar estudios, que nos ayuden a comprender los mecanismos de defensa de estos crustáceos. En efecto el sistema inmunitario se encuentra estrechamente asociado al estado fisiológico y algunos mecanismos inmunitarios pueden servir como marcadores de la condición de los animales.

Con la finalidad de disponer a corto plazo de pruebas que permitan evaluar el sistema inmunitario de *Penaeus vannamei*, se han desarrollado y optimizado ensayos, tomando en cuenta varios aspectos del sistema inmunitario de los crustáceos, siendo estos, la determinación de hemogramas, la cuantificación "in vitro" de radicales tóxicos que se producen durante la fagocitosis, la dosificación de proteínas inmunitarias mediante el uso de anticuerpos monoclonales y la estimación de la actividad microbicida de la hemolinfa. Estos ensayos permitirían evaluar eficientemente los efectos potencialmente positivos del uso de inmunoestimulantes, o los efectos negativos de contaminantes.



# CAPITULO I.

## ANTECEDENTES

### 1.1 RESPUESTA INMUNE DE LOS CRUSTACEOS.

La respuesta inmune se encuentra asociada a la resistencia a las enfermedades, la cual en el caso de los vertebrados ha sido definida por Singleton and Sainsbury (1987) como “ La respuesta de una persona o animal a un contacto inmunológico con un antígeno”. Contrariamente a los vertebrados los crustáceos no poseen un sistema inmunitario con memoria inmunológica y estricta especificidad, debido a su incapacidad de producir inmunoglobulinas (Hall y Söderhall, 1984). Sin embargo ellos poseen la capacidad de hacer frente a los patógenos por medio de mecanismos, celulares y humorales en los cuales están implicados los diferentes constituyentes de la hemolinfa (Soöderhäll and Cerenius, 1992). Los mecanismos celulares implican directamente a los hemocitos y generalmente están relacionados con la respuesta inmune inmediata no inducible, es decir con los mecanismos de defensa que se desencadenan inmediatamente luego de que el animal ha sufrido la agresión del patógeno o una herida ( Johanson y Söderhäll, 1989). En tanto, que los mecanismos humorales necesitan una estimulación previa antes de activarse y estan basados en la presencia de factores microbicidas circulantes, los mismos que incrementan la resistencia del huésped por un corto período de tiempo. Ellos forman parte de la respuesta inmune inducida (Chadwick y Dunphy, 1986).

## 1.2. Hemocitos.

Los tipos hemocitarios pueden ser definidos en base a criterios estructurales citoquímicos, antigénicos y funcionales. En los crustáceos existen tres tipos de hemocitos morfológicamente distintos que pueden ser clasificados como hialinos, semigranulosos y granulosos (Smith and Söderhäll, 1983; Tsing, 1987; Rodríguez *et al*, 1995).

Los hemocitos hialinos poseen un diámetro de 4 a 10  $\mu\text{m}$  (figura 1.1; Tsing, 1987), estas células presentan un núcleo central rodeado por un delgado citoplasma basófilo, no hay presencia de gránulos o estos están presentes en pequeño número. En el cangrejo de río ellos estarían implicados en procesos de fagocitosis (Johansson and Söderhäll, 1989), en los peneidos estas células no tienen actividad fagocítica y cumplirían un rol en la coagulación (Omori, 1989).

Los hemocitos semigranulosos (HSG) tienen de 6 a 10  $\mu\text{m}$  (Tsing, 1987) de diámetro, poseen un núcleo esférico, o en forma de herradura, con dos lóbulos, central o periférico, tienen muchos gránulos pequeños de forma redondeada (fig 1.1). En *Penaeus japonicus*, los HSG presentan numerosos lisosomas cargados de enzimas hidrolíticas (Tsing, 1989). En esta especie se ha preparado un anticuerpo monoclonal que reconoce estos hemocitos y a los hemocitos hialinos, indicando que existiría un parentesco antigénico entre estos dos grupos hemocitarios (Rodríguez *et al*, 1995). Estos hemocitos se encuentran asociados a procesos de fagocitosis, encapsulación y nodulación.

Los hemocitos granulosos cuya talla oscila entre 7 y 9  $\mu\text{m}$  (Tsing,

1987), poseen grandes gránulos, tienen un núcleo pequeño y excéntrico, presenta inclusiones citoplasmáticas así como un retículo endoplasmático liso, tienen ribosomas libres en el citoplasma. Un

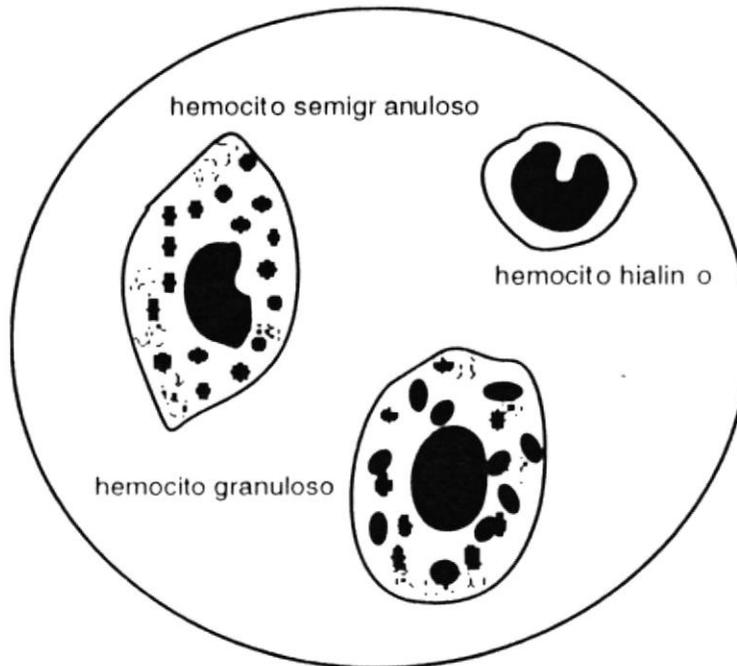


Figura 1.1: Tipos hemocitarios

anticuerpo monoclonal contra este tipo de hemocito ha sido preparado en *P. japonicus* (Rodríguez *et al*, 1995). Estos hemocitos son el depósito de las enzimas que forman parte del sistema profenoloxidasas (Söderhall and Smith, 1983).

### 1.3. Fagocitosis y choque respiratorio.

La fagocitosis es la más común de las reacciones de defensa celular y constituye, junto a otros componentes humorales, la primera línea de defensa cuando un elemento extraño ha sobrepasado la primera barrera física que constituye la cutícula (Söderhäll and Cerenius, rev

1992). Las partículas pequeñas como las bacterias son fagocitadas por hemocitos circulantes, tanto como por fagocitos inmóviles (Johansson and Söderhäll, rev 1989). En los camarones los fagocitos inmóviles se ubican en la glándula antenal, la superficie de las arteriolas del sinus hemal del hepatopáncreas, en el organo linfoide y en las branquias (Johnson, 1987). En este órgano los fagocitos son conocidos como podocitos branquiales y probablemente tengan funciones de eliminar proteínas y micropartículas inferiores a 30 nm, en tanto que los otros fagocitos eliminan material de mayor talla (Johnson, 1987).

Los hemocitos implicados en la fagocitosis actúan como macrófagos, éstos pueden reconocer directamente los microorganismos por medio receptores presentes sobre la superficie de los mismos, o por el intermedio de opsoninas (ver más adelante) que facilitan la ingestión. Una vez que la partícula es englobada dentro de la célula, se forma una vacuola digestiva denominada fagosoma, ésta se fusiona con la membrana de los lisosomas y forma una nueva vacuola llamada fagolisosoma, Los lisosomas contienen una variedad de hidrolasas, tales como la lisosima, fosfolipasa A<sub>2</sub>, ribonucleasas, desoxiribonucleasas, y proteasas que colectivamente participan en la destrucción de organismos atrapados (figura 12; Prescott, Harley and Klein, 1993).

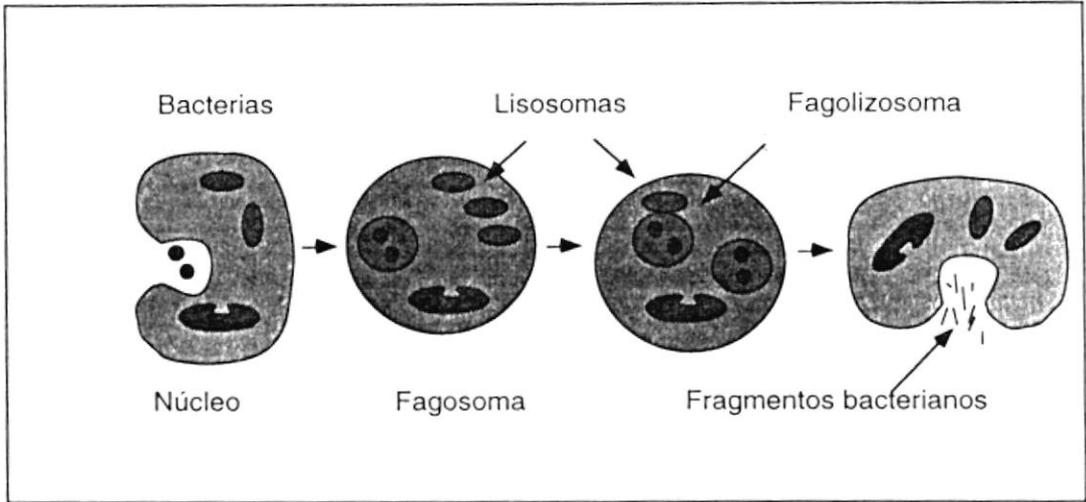


Figura 1.2: Eventos destructivos oxígeno independientes de la Fagocitosis.

Además de estos procesos digestivos enzimáticos se observa otro mecanismo destructivo propio de estas células, que conduce a la formación de radicales de oxígeno (figura 1.3), altamente reactivos y tóxicos. Este proceso oxidativo es conocido como choque respiratorio. El choque respiratorio se caracteriza por el incremento de la actividad metabólica de los fagocitos, como respuesta a estímulos provocados por partículas foráneas; este mecanismo puede ser identificado por un aumento en el consumo de oxígeno y la activación de una enzima membranaria la NAD(P)H oxidasa. Esta enzima cataliza la reducción parcial del oxígeno en anión superóxido ( $O_2^-$ ); por un proceso de dismutación este puede ser convertido en ( $H_2O_2$ ); otras reacciones químicas formarán el singlet de oxígeno  $^1O_2$ , el radical hidroxilo ( $OH^-$ ), e hipohalógenos. Todos estos radicales poseen la capacidad de inhibir o destruir a los microorganismos (Klein, 1982).

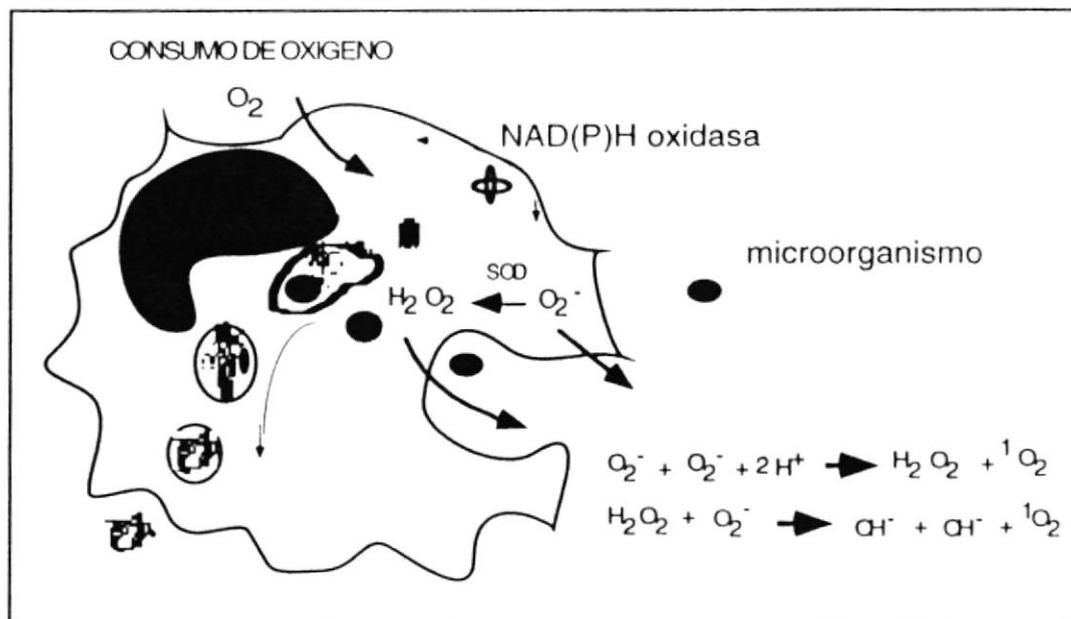


Figura 1.3: Choque respiratorio

#### 1.4. Encapsulación.

Cuando una partícula es demasiado grande para ser fagocitada, muchos hemocitos la cubren, formando capas alrededor de ella (Söderhäll and Cerenius, rev 1992). La muerte de los organismos encapsulados probablemente sea provocada por asfixia, por su conversión a desechos o por la acción tóxica de los radicales intermediarios de oxígeno (Fig. 1.4).

#### 1.5. Nodulación.

Cuando masas bacterianas se forman en el hemocele, por ejemplo aglutinadas por lectinas, los hemocitos los rodean para formar nódulos melanizados (Fig. 1.4). Los nódulos son pequeñas

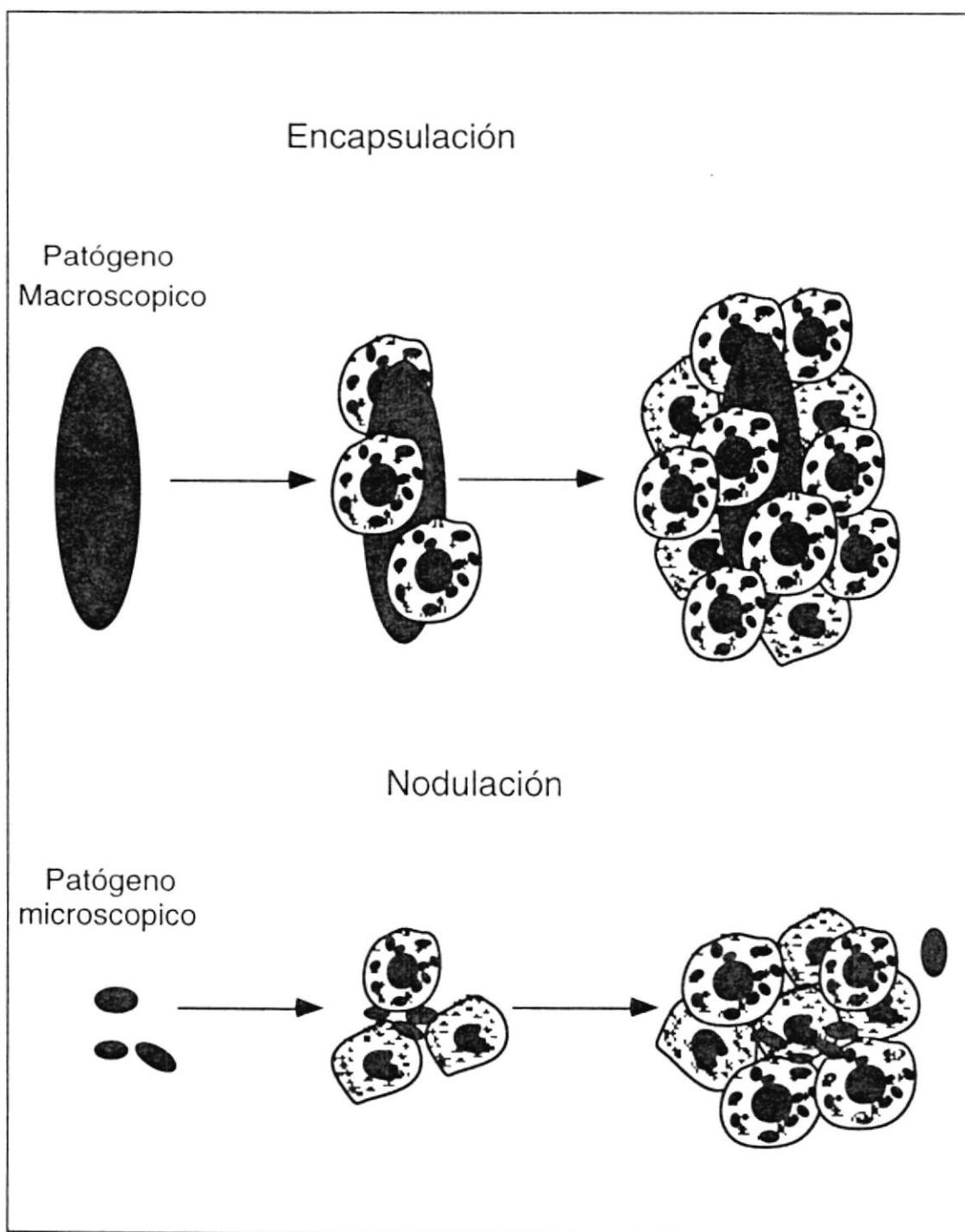


Fig. 1.4: Encapsulación y Nodulación.

cápsulas desde las cuales ciertos hemocitos se desprenden por sí mismos y se infiltran en la masa de bacterias intentando fagocitarlas. La formación de nódulos representa un híbrido de encapsulación y reacciones fagocíticas (Amirante, 1986), que dan origen a los quíno-nes, quienes son precursores de melaninas (Salt, 1963; Nappi, 1977; Poinar et al., 1979).

#### 1.6. Melanización y sistema profenoloxidasa.

Algunas reacciones de defensa en invertebrados son acompañadas por la melanización del microorganismo invasor (Söderhäll, 1982; Söderhäll and Smith, 1986). La enzima que funciona como llave de la síntesis del pigmento melanina, es la fenoloxidasa (Po), la cual está presente en la sangre de los artrópodos (hemolinfa) como una pro-enzima inactiva, la profenoloxidasa (proPO), ver la figura 1.5 (Johansson and Söderhäll, 1989). La proPO es liberada a partir de granulocitos y es activada en Po por componentes de las paredes celulares de microorganismos, tales como  $\beta$  1-3 glucanos de hongos, lipolisacáridos (LPS) de bacterias Gram negativas y péptidoglicanos de bacterias Gram positivas, (Söderhäll and Smith, 1983). La fenoloxidasa actúa en la transformación enzimática de núcleos fenólicos (obtenidos a partir de la tirosina) en quinones y en la polimerización no enzimática de estos últimos en melanina (Figura 1.5). Ha sido demostrado que la melanina y sus precursores tienen propiedades microbicidas. (Kuo and Alexander, 1967; Söderhäll and Ajaxon, 1982; Saint Léger *et al.*, 1988; Rowley *et al.*, 1990)

Probablemente el sistema proPO, no esté exclusivamente implicado en la melanización, algunos de sus componentes estimulan otras reacciones de defensa celular (Johansson and Söderhäll, 1989). Así muchos hemocitos fagocitarios y encapsuladores se activan gracias a la liberación de fenoloxidasa por los granulocitos estimulados con  $\beta$  1-3 glucanos (Smith and Söderhäll, 1984).

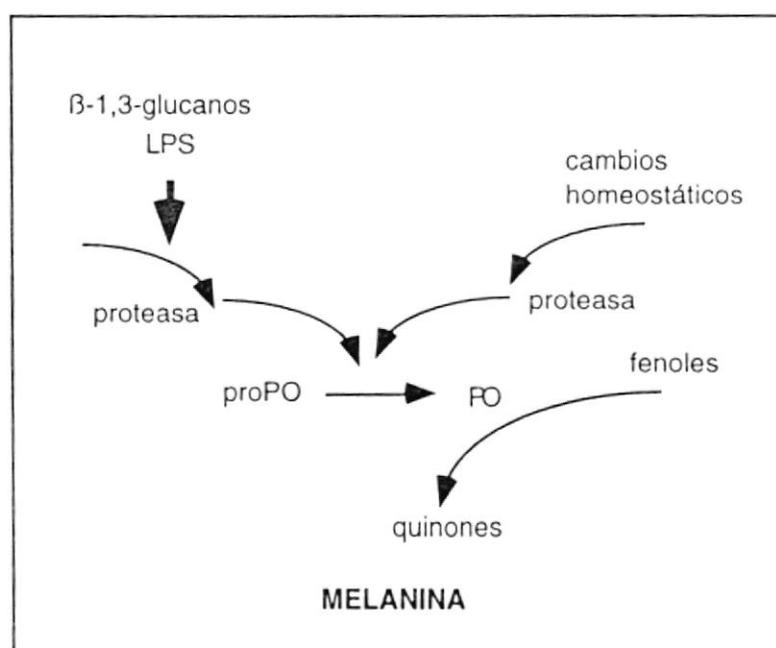


Figura 1.5: Sistema proPo.

## 1.7. Reconocimiento y opsonización.

### 1.7.1. Proteínas de reconocimiento.

Las proteínas de reconocimiento en los artrópodos, son moléculas del sistema inmunitario encargadas del reconocimiento de las partículas extrañas. Ellas identifican

residuos de glucídicos que se encuentran en las paredes celulares de los microorganismos, como los  $\beta$  1-3 glucanos ( $\beta$ GBP), LPS y péptidoglicanos.

En los cangrejos *Pacifastacus leniusculus* y *Carcinus maenas* han sido aisladas y caracterizadas proteínas de reconocimiento de ( $\beta$ GBP). Las  $\beta$ GBP son capaces de activar mecanismos inmunitarios, como el sistema proPO ver fig. 1.6, (Thörnqvist et al., 1994).

En otros artrópodos se han aislado proteínas de fijación de lipopolisacáridos; LPS, (Jomori. Kubo y Natori, 1989), los cuales son componentes de las paredes de las bacterias gram (-).

#### 1.7.2. Oponinas.

Las oponinas son factores que incrementan la capacidad encapsuladora y fagocítica de los hemocitos (Singleton y Sainsbury, 1993). En el cangrejo de río, *P. leniusculus*, ha sido aislada la peroxinectina, una proteína de 76 kDa, que actúa como un promotor de adhesión y aplastamiento de los hemocitos sobre una superficie sólida (Kobayashi. Johansson y Söderhäll, 1990). Esta proteína facilita también la fagocitosis y la encapsulación (Johansson y Söderhäll, 1989). Una proteína de propiedades similares ha sido aislada del cangrejo *C. maenas*. (Thörnqvist et al., 1994).

### 1.7.3. Aglutininas.

lectinas de  
microorganismos

Las aglutininas son proteínas que causan la aglutinación de partículas extrañas y forman parte de la respuesta inmune no inducida de los crustáceos. Algunas aglutininas tienen la propiedad de aglutinar eritrocitos y son conocidas como hemaglutininas. Otras aglutininas tienen la capacidad de aglutinar microorganismos, secuestrándolos de la hemolinfa para facilitar la actividad de fagocitosis de los hemocitos (Liszewski K. and Atkinson J. P., 1993). La actividad y cantidad de las aglutininas varían de una especie a otra.

La caracterización de las aglutininas ha conducido frecuentemente a la identificación de lectinas, que son glicoproteínas que actúan sin actividad catalítica para unir carbohidratos. En los mamíferos han sido caracterizadas numerosas lectinas, las cuales actúan como opsoninas y factores de activación del complemento. Algunas lectinas de crustáceos tienen afinidad por el ácido siálico y causan aglutinación de diferentes tipos de células tales como eritrocitos de mamíferos o bacterias (Ratanapo and Chulavatnatol, 1990; Vargas-Albores *et al.*, 1993; Söderhäll and Cerenius, 1992; Kopacek, *et al.*, 1993).

### 1.8. Inhibición de proteasas y $\alpha$ 2 macroglobulina.

La  $\alpha$  2 macroglobulina es una proteína encargada de inhibir proteasas por medio de una secuencia especial que contiene sitios de unión para muchas proteasas de diferentes tipos (Harpel, 1973;

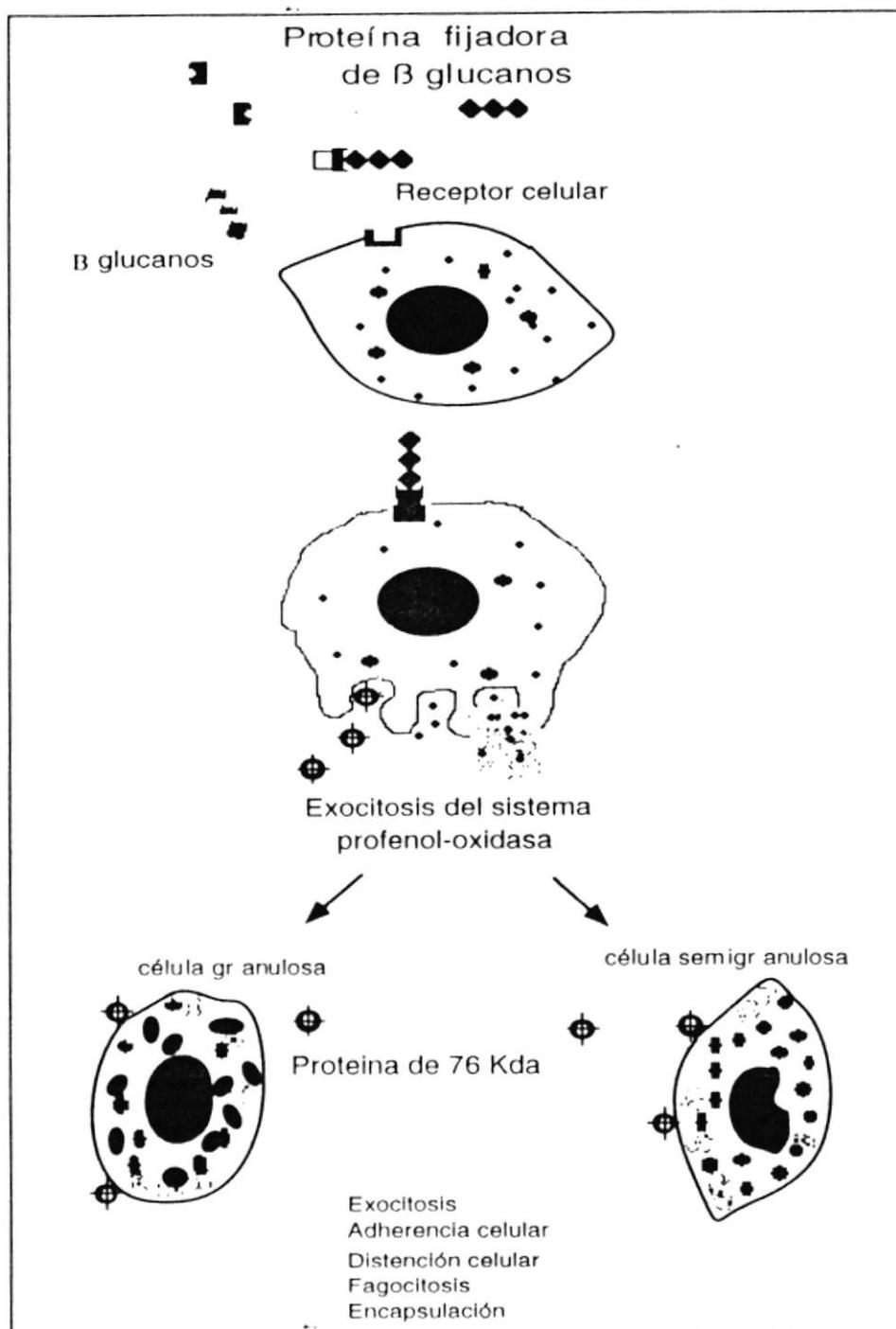


Figura 1.6: Opsonización.

Sottrup-Jensen *et al*, 1989; Barrett and Starkey, 1993). Esta secuencia especial es llamada región de carnada y está expuesta en la superficie de la proteína y por lo tanto fácilmente accesible a las proteasas (Barret and Starkey, 1993) (figura 1.7). Cuando las proteasas se unen a la región carnada, un cambio conformacional es inducido en la gran  $\alpha 2$  macroglobulina que atrapa la proteasa como una trampa. El sitio activo de la proteinasa no es inhibido, pero está escondido por la  $\alpha 2$  macroglobulina bloqueando así su accesibilidad a substratos de gran talla por encumbramiento estérico (Hall, 1992). La presencia y funcionalidad de esta proteína en crustáceos ha sido reportada por Amstron (1991), Hergenbahn (1988) y Hall (1992).

En los vertebrados la  $\alpha 2$  macroglobulina tiene una importancia como modulador de la respuesta inmune. Se fija a endopeptidasas y péptidos antimicrobianos, facilitando así la internalización de éstas en las células por endocitosis, gracias a la fijación del complejo en receptores de membrana (Panyutich and Ganz, 1991). En el cangrejo de río esta proteína tiene la capacidad de reticularse con el factor de coagulación. De esta manera la  $\alpha 2$  macroglobulina estaría presente en el coágulo, donde su rol consistiría en inhibir las proteasas liberadas por agentes patógenos. Aunque no haya sido completamente comprobado, esta proteína intervendría, asimismo, en la regulación del sistema proPO, neutralizando las proteasa, que lo activan y controlando, de esta manera, los daños que este sistema podría provocar en los tejidos del huésped (Hall, 1992).

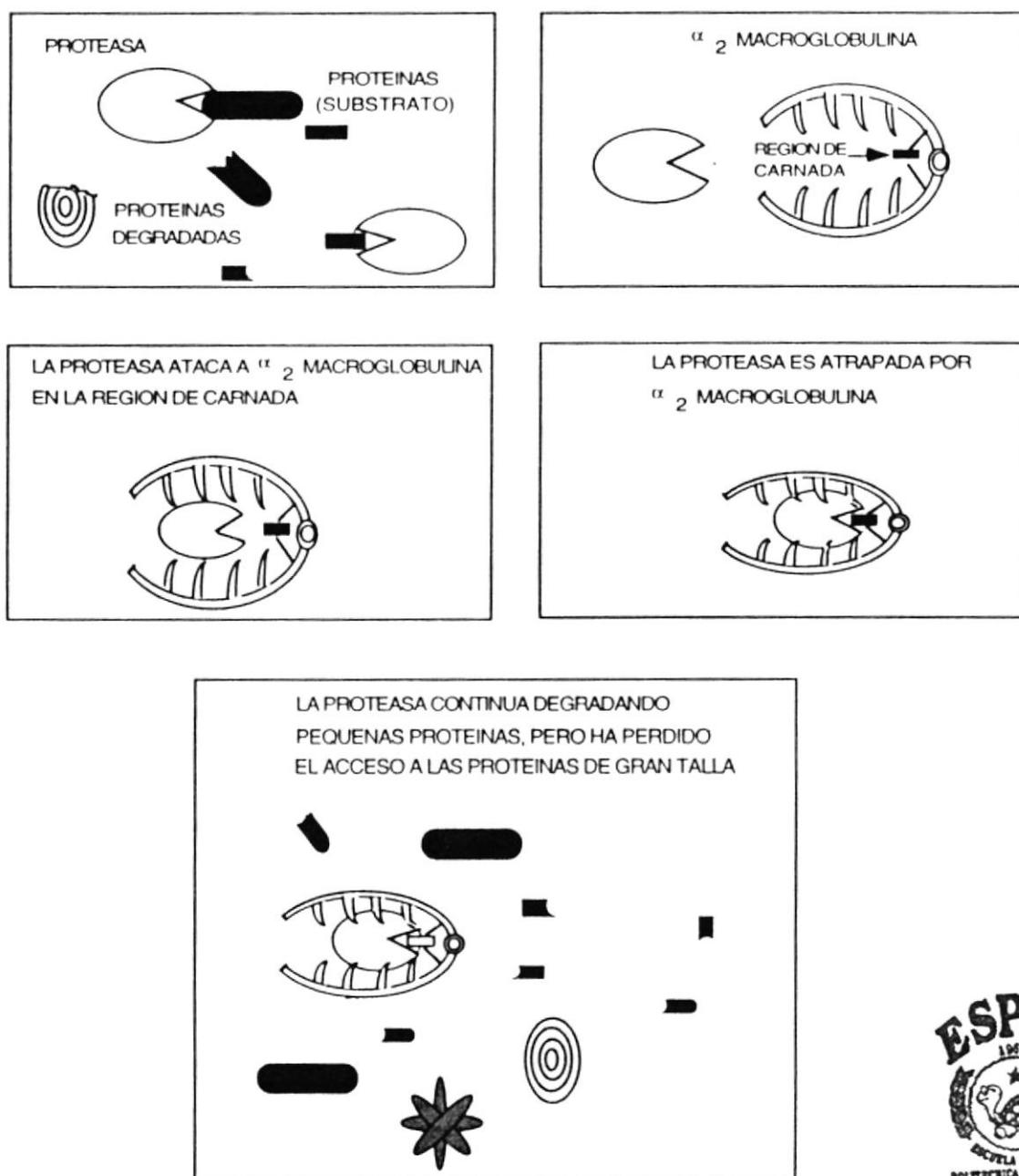


Figura 1.7: Inhibición de proteasas por acción de la  $\alpha_2$  macroglobulina.

### 1.9 Coagulación. ✓

El sistema circulatorio de los camarones es abierto y por consiguiente la coagulación debe ser rápida a fin de evitar las hemorragias. Este proceso ha sido estudiado en numerosos crustáceos. La gelación del plasma se produce por polimerización y reticulación del factor de coagulación (FC), proceso que depende de la acción de una enzima celular, la transglutaminasa, activada por cambios homeostáticos (Bruner-Lorand *et al.*, 1966) requiriendo la presencia de  $\text{Ca}^{++}$  (Durliat and Vrankx, 1976; Kopacek *et al.*, 1993).

### 1.10. Factores microbicidas. ✕

La hemolinfa de muchos invertebrados posee factores encargados de la destrucción directa de bacterias, por medio de mecanismos poco conocidos. En los insectos y el *Limulus* varios péptidos y proteínas han sido aislados y caracterizados (Nakamura *et al.*, 1988; Mitaya *et al.*, 1989; Hoffman *et al.*, 1992). Algunas familias de factores microbicidas se describen en el anexo 1. En los crustáceos, los datos son extremadamente limitados. Sin embargo, una fuerte actividad microbicida ha podido ser evidenciada en la hemolinfa de diferentes crustáceos (Chisholm and Smith, 1994; Chisholm and Smith, 1995).

Peptidos antimicrobianos

## CAPITULO II

### MATERIALES Y METODOS.

#### 2.1. Material biológico.

##### 2.1.1. Camarones y hemolinfa.

Los camarones *P. vannamei*, fueron obtenidos del departamento de larvicultura del CENAIM, de las camaroneras OPUMAR.SA y Fuentes, ubicadas cerca de Palmar, provincia del Guayas.

Camarones de 2 a 13 gr., fueron usados para el desarrollo e implementación de todos los ensayos, después de un periodo de 15 días de aclimatación.

Estos animales fueron mantenidos en tanques de 500 litros con recambio continuo de agua y aireación constante. Fueron alimentados con el 3% de la biomasa diaria. El alimento se distribuyó en 3 raciones, dos en la mañana y una en la noche, respectivamente, con alimento balanceado (Tamaño 3/4 25 % de proteína, ABA) y una tercera ración de calamar en la tarde. Cada ración representaba el 1% de la biomasa.

Los camarones en estado de intermuda fueron lavados con agua de mar estéril. La hemolinfa fue tomada a nivel del sinus ventral con la ayuda de una jeringuilla de 1 ml,

con una aguja de 23 G 1 (BD), para camarones de más de 5 gramos de peso; y, con agujas de 26 G 1/2, para camarones de 1 a 5 gr. Previo a la extracción de la hemolinfa las jeringuillas fueron cargadas con 300 µl de una solución de anticoagulante.

La hemolinfa diluída en la solución de anticoagulante fue transferida de las jeringuillas a microtubos (1,5 ml, Biopur). Los volúmenes de hemolinfa y anticoagulante fueron anotados a fin de estimar el coeficiente de dilución de la hemolinfa total, a partir del cual posteriormente, se establecerá el número total de hemocitos y la cantidad de hemolinfa en las muestras.

#### 2.1.2. Anticoagulantes.

Las siguientes soluciones de anticoagulantes fueron probadas: Solución modificada de Alsever (Bachere,1988), solución salina de camarón (Vargas A., 1993), cisteína al 2.5%, citrato al 10%, y variantes de los dos últimos compuestos. Las composiciones químicas de estos compuestos están presentes en el anexo 2.

### 2.2. Técnicas y medios de cultivo de hemocitos.

#### 2.2.1. Protocolo de cultivo de hemocitos.

Todos los procedimientos para la obtención de

primocultivos de hemocitos, deben ser realizados rápidamente y manteniendo las células a 4 ° C, usando hielo, a fin de preservar las células en buen estado.

Para los ensayos de tipo cualitativo, los primocultivos de hemocitos, fueron realizados sobre placas que poseen 3 hoyos individuales (marca Dynatech), y sobre los hoyos de placas de poliestireno de 96 hoyos para los ensayos cuantitativos (Corning, Sigma M-0156). Estas placas permiten realizar análisis espectrofotométrico de microplacas (Labsystems, tipo multiskan 348). Los primocultivos de hemocitos fueron realizados utilizando 2 protocolos.

#### 2.2.1.1. Primer protocolo para la obtención de primocultivos.

El primer protocolo se utilizó para repartir un número determinado de hemocitos por hoyo. Previamente el plasma es eliminado. Con este fin, las muestras de hemolinfa son centrifugadas en los microtubos ( 800 X G, 10 min.). El sobrenadante (plasma) fue separado y almacenado para realizar los ensayos de actividad antibacteriana e inmunodosificación. El sedimento de hemocitos fue resuspendido con el volumen de medio de cultivo necesario para obtener la concentración celular deseada.

#### 2.2.1.2. Segundo protocolo para la obtención de primocultivos.

El segundo protocolo de primocultivos consiste simplemente en distribuir la hemolinfa total ( plasma y células ) en las placas de cultivo. Un volumen igual de medio de cultivo es añadido para reactivar los procesos celulares, diluyendo la concentración del anticoagulante.

#### 2.2.2. Medios de cultivo.

Para la preparación de primocultivos, diferentes medios de cultivo fueron probados (anexo 3), usando referencias de trabajos realizados en otros crustáceos, insectos y moluscos. Los medios seleccionados fueron: El medio L15 de Leibovitz, utilizado a una concentración de 2X, según descripciones hechas por Boulo (1995); una solución salina fisiológica cuya composición fue establecida por La Peyere (1990) para cultivar células del cangrejo azul, *Carcinus sapidus* ; Agua de mar estéril pura o diluída en agua destilada (50%, 60%, 70%, 80%); Solución salina modificada de Hank's sin  $\text{Ca}^{++}$ , sin  $\text{Mg}^{++}$ , sin rojo de fenol, 780 mOsm, pH 7,2 (MHBSS), usada por Song y Hiegh (1994), para las células de *Penaeus monodon* y por Boulo *et al.* (1995, en prep.) para las células de *Penaeus japonicus* ; MHBSS conteniendo 6 mM de  $\text{Ca}^{++}$  y 13 mM de  $\text{Mg}^{++}$ , la concentración de los iones de  $\text{Ca}^{++}$  y  $\text{Mg}^{++}$  estan basadas en

descripciones hechas por La Peyere (1990) para *C. sapidus* ; y una solución de tampón fosfato salino con calcio y magnesio que fue utilizada a una concentración de 1 y 2 X.

### 2.3. Hemogramas.

#### 2.3.1. Cuantificación del número de hemocitos.

Para facilitar el conteo de los hemocitos en caso de que existan muchos hemocitos en la muestra, mantenerlos con un buen aspecto morfológico y evitar la agregación celular, se diluye una parte de hemolinfa total, en dos partes de formaldehído al 3%. Las muestras de hemolinfa con formaldehído, deben ser analizadas hasta el día siguiente de su obtención, pero pueden ser almacenadas a 4°C y deben permanecer cerradas para impedir la evaporación.

Se coloca 10 µl de la muestra tratada con formaldehído, en el hemocitómetro (Cámara de Neubauer, Erma), y se determina el número y los tipos hemocitarios en un microscopio óptico, provisto de un dispositivo de contraste de fases (Olympus BH2, objetivo A20 PL). Los conteos son estimados de acuerdo al número de hemocitos/ml que existan en la muestra de hemolinfa.

#### 2.3.2. Citocentrifugación.

Los hemocitos son fijados con formaldehído al 3 % inmediatamente después de la obtención de la hemolinfa.

Aproximadamente 500.000 células son centrifugadas por lámina (200 g, 5 min), con la ayuda de un soporte para citocentrifugación (Miles 4336) en una centrifuga refrigerante (Kokusan H-2000A). Las láminas son lavadas en agua destilada y almacenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ , para luego ser teñidas.

### 2.3.3. Tinciones.

Las muestras de hemocitos son teñidas con el Kit Hemacolor (Merck) que es una variante rápida de la tinción May-Grünwald Giemsa. Consiste en 3 baños sucesivos, cada baño con una de las siguientes soluciones: metanol, solución A a base de eosina y una solución B a base de azul de metileno.

## 2.4. Técnicas de evaluación del choque respiratorio en los hemocitos.

### 2.4.1 Cuantificación del anión superóxido

#### 2.4.1.1. Principio.

El nitro blue tetrazolium (NBT), producto químico de color amarillo, es reducido en presencia de anión superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) y se convierte en un compuesto azul oscuro insoluble conocido como formazán (Van Noorden and Butcher, 1989).



El principio del ensayo consiste, en incubar hemocitos en presencia de NBT y de un estimulante del choque respiratorio para inducir la producción de  $O_2^-$  en el choque respiratorio. La actividad de los hemocitos, está determinada por la cantidad de formazán obtenida.

#### 2.4.1.2. Reactivos.

- *NBT.*

NBT (nitro blue tetrazolium, Sigma N-6876), preparado a la concentración de 10 mg/ml en dimetil formamida (DMF) o en agua destilada.. Y utilizado en una concentración final de 0,3 % diluyendo la solución madre en diferentes soluciones según las experimentaciones a realizarse.

- *Estimulantes.*

- - Zymosan A (paredes celulares, compuestas de glucanos, extraído de *Saccharomyces cerevisiae*, (Sigma Z-4250), fue resuspendido en agua de mar estéril ( $1430 \times 10^6$  partículas/ml)
- - Laminarina,  $\beta$  glucano soluble (extraída

de *Laminaria digitata* ,Sigma L-9634) es diluída en agua de mar estéril o en MHBSS (60 mg/ml).

- - PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate, Sigma, P-4385), diluído en DMSO (dimetilsulfóxido, Sigma D-8779) a la concentración de 10 mg/ml.
  
- *Inhibidores.*
  - NEM, N-ethylmaleimide (sigma E-3876) es preparado en agua de mar o en MHBSS a 30 mM, como solución madre.
  - Iodoacetamida (sigma, I-6125) es preparado en MHBSS a 60 mM.

#### 2.4.1.3. Protocolo cualitativo.

Un volumen de 50  $\mu$ l de hemolinfa completa o una suspensión de hemocitos correspondiente a un animal, es depositado en los hoyos de una placa de histología (Dynatech). Se añaden 50  $\mu$ l de solución de trabajo de NBT (0.3 %) y 50  $\mu$ l de la solución de Zymosan A diluído en MHBSS. Después de 2 horas de incubación, el sobrenadante es eliminado y las células son fijadas con metanol al 100% (1 min). El formazán intracelular es observado al microscopio óptico.

#### 2.4.1.4. Protocolo cuantitativo.

En el protocolo cuantitativo el formazán es extraído y diluido con KOH y DMSO, la cantidad de formazán es estimada mediante lecturas en el espectrofotómetro a 620 nm. En este tipo de ensayo, se analiza la diferencia de señal entre hemocitos no estimulados (actividad de base) y hemocitos estimulados. En una serie de hoyos previamente estimulados se adicionan inhibidores específicos del choque respiratorio (Nem, Iodoacetamida), con la finalidad de verificar la especificidad de la señal obtenida.

#### 2.4.1.5. Análisis estadístico.

Todos los ensayos realizados para la implementación del protocolo cuantitativo, fueron analizados mediante la prueba “Duncan New Multiple Range” a un nivel de confianza del 95%, utilizando el programa Super Anova.

### 2.4.2. Cuantificación del peróxido de hidrógeno extracelular.

#### 2.4.2.1. Principio.

El peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) es co-sustrato de las peroxidasas y en consecuencia permite cuantificar el producto de la peroxidación

del rojo de fenol por acción de una peroxidasa (Pick and Keisari,1980).



En la práctica, la peroxidación del rojo de fenol (colorante biológico neutro) en presencia de peróxido de hidrógeno conduce a un producto oxidado con un cambio de color que puede ser medido en un espectrofotómetro. Esta reacción permite cuantificar el peróxido de hidrógeno extracelular producido por los hemocitos debido a que la cantidad de producto oxidado es proporcional a la cantidad de peróxido de hidrógeno presente (Pick and Keisari,1980).

#### 2.4.2.2. Reactivos.

- El rojo de fenol ( Phenolsulfonphthaleine, Sigma P-5530) es preparado en agua destilada ( 20 g/l ).
- Peroxidasa (HRPO, Horseradish peroxidase, type IV, Sigma P-8375) es diluída en un tampón fosfato de potasio ( 50 mM, pH 7,0 ) a una concentración final de 2,93 mg/ml (850 unidades de purpurogallina por ml). La solución es distribuída en microtubos que posteriormente son congelados a -80 ° C.

- *Estimulantes.*
  - Zymosan A (paredes celulares, compuestas de glucanos, extraído de *Saccharomyces cerevisiae*, (Sigma Z-4250), fue resuspendido en agua de mar estéril ( $1430 \times 10^6$  partículas/ml).
  - Laminarina,  $\beta$  glucano soluble (extraída de *Laminaria digitata*, Sigma L-9634) es diluída en agua de mar estéril o en MHBSS (60 mg/ml).
- *Inhibidores.*
  - NEM, N-ethylmaleimide (sigma E-3876) es preparado en agua de mar o en MHBSS a 30 mM, como solución madre.

#### 2.4.2.3. Protocolo.

Las muestras de hemolinfa ( $1 \times 10^6$  hemocitos/100  $\mu$ l) son distribuídas verticalmente en dos series de 8 hoyos de una microplaca. En todos los hoyos de la primera serie serán añadidos 100  $\mu$ l de solución de trabajo de rojo de fenol (PRS, 770 mOsm, pH 7,2), la misma que está compuesta de: 740 mM de ClNa; 10 mM de fosfato de potasio (pH 7,45); 11 mM de dextrosa; 1,12 mM de rojo de

fenol con 17 unidades/ml de HRPO), y 50  $\mu$ l de una solución de estimulante del choque respiratorio (Zymosan, laminarina, PMA); por otra parte en la segunda serie, que servirá de control son añadidos 150  $\mu$ l de solución MHBSS. Esta serie servirá para determinar la influencia celular en las lecturas de D.O. Para elaborar la cinética de producción del peróxido de hidrógeno, las reacciones enzimáticas son detenidas por adición de 40  $\mu$ l de NaOH (1 M) a diferentes intervalos de tiempo ( 0; 5; 10; 20; 30; 40 min). Las densidades ópticas de los hoyos son medidas a 620 nm en el espectrofotómetro (Labsystem, Multiskan).

#### 2.4.3. Cuantificación de la actividad quimioluminiscente de los hemocitos.

##### 2.4.3.1. Principio.

Esta técnica permite medir la producción de radicales libres intermediarios de oxígeno, quienes son responsables de la emisión de luz generada por las células cuando fagocitan. Para amplificar la sensibilidad de esta técnica se usa Luminol. La quimioluminiscencia dependiente del luminol esta ligada principalmente a un sistema  $H_2O_2$ -Mieloperoxidasa-Hipohalógenos, que conduce a la formación del singlet de oxígeno. Este proceso es

acompañado por la emisión de luz, revisar Klein (1982) y puede ser determinado por un luminómetro.(Figura 1.3).

#### 2.4.3.2. Reactivos.

Luminol ( 5 amino 2,3 dihydro 1,4 phthalazinedione, Sigma A-8511) es preparado a la concentración de 0,1 M en DMSO, y es utilizado en una concentración final de 0,1 mM diluyendo la solución madre en MHBSS.

- *Estimulantes.*

- Zymosán, laminarina y PMA son utilizados como estimulantes, como se indicó anteriormente.

- *Protocolo.*

Las muestras de hemolinfa son centrifugadas y los hemocitos son resuspendidos en una cantidad de MHBSS que permita tener una concentración celular de  $3,9 \times 10^6$  hemocitos/ml. De esta muestra se toman 130  $\mu$ l en tubos Pyrex (11,8 x 75 mm, corning Inc.). Después se completa con MHBSS a un volumen de 2 ml. Un volumen de 20  $\mu$ l de luminol (1 mM) es colocado en cada tubo. Finalmente, se añaden en los tubos 50  $\mu$ l de estimulante del choque respiratorio o 50

$\mu$ l de MHBSS, en los tubos de control. A este momento se lo considera el tiempo 0, todas las muestras son medidas cada 10 minutos durante 2 horas. Con un luminómetro portátil ( BCL Book, SEE AUTOMATION) equipado con un tubo fotomultiplicador, el luminómetro estará regulado a un modo de integración de 60 segundos.

## 2.5. Inmunodosificaciones.

### 2.5.1. Inmunofluorescencia ( IF ).

#### 2.5.1.2. Principio.

En la inmunofluorescencia, el antígeno está fijo a un soporte sólido (Lamina portaobjetos), este antígeno puede fijar y retener a su anticuerpo específico. Cuando la fijación del anticuerpo se ha llevado a cabo, es añadido otro anticuerpo capaz de reconocer y fijarse al anticuerpo específico; este segundo anticuerpo está marcado con isocianato de fluoresceína, compuesto que puede ser detectado en un microscopio de epifluorescencia (Olympus).

#### 2.5.1.2. Reactivos.

Anticuerpo monoclonal 41B12, específico contra la proteína  $\alpha$  2 macroglobulina de *P. japonicus* (Rodríguez, *et. al* 1995). El anticuerpo

monoclonal fue preparado por la técnica de hibridación linfocitaria.

Anticuerpo anti ratón IgG marcado con isothiocianato de fluoresceína (Diagnósticos Pasteur, 7461).

#### 2.5.1.3. Protocolo.

Un volumen de 50  $\mu$ l de solución de anticuerpos monoclonales (AcMc) son depositados sobre las muestras previamente fijadas en acetona, consistentes en primocultivos o células citocentrifugadas de hemocitos, luego son incubados en una cámara húmeda, 15 min a temperatura ambiente. Las muestras son lavadas 3 veces con tampón TIF (Diagnósticos Pasteur). Los anticuerpos secundarios Anti IgG de ratón, marcados con isothiocianato de fluoresceína, son diluídos 1/100 en tampón TIF conteniendo 1% de azul de Evans (Sigma E 0133). Estos son depositados sobre las preparaciones celulares (50  $\mu$ l/muestra), e incubados en una cámara húmeda en la oscuridad. Después de los lavados, las placas son montadas en un microscopio de epifluorescencia.

#### 2.5.2. Ensayo inmunosorbente de enzima ligada (ELISA), de tipo indirecto.

### 2.5.2.1. Principio.

En el ELISA indirecto, el antígeno se encuentra fijo a un soporte sólido (Insolubilizado). Este antígeno puede fijar y retener a su anticuerpo específico. Cuando la fijación del anticuerpo se ha llevado a cabo, es añadido otro anticuerpo capaz de reconocer y fijarse al anticuerpo específico, este segundo anticuerpo está marcado con una enzima. Luego se añade un sustrato a la enzima, provocando un cambio colorimétrico debido a la acción de la enzima sobre el sustrato, el mismo que es leído en un espectrofotómetro (Figura 2.1).

### 2.5.2.2. Reactivos.

- Anticuerpo monoclonal 41B12, específico contra la proteína alfa 2 macroglobulina de *P. japonicus* (Rodríguez, *et.al* 1995).
- Anticuerpo anti ratón IgG marcado con la enzima fosfatasa alcalina (Sigma, A-8779).

### 2.5.2.3. Protocolo.

- *Insolubilización del antígeno*

Se colocan 100  $\mu$ l de antígeno en cada hoyo de las microplacas de 96 hoyos, y se incuban a 4°C toda la noche. Se lava tres veces con 200  $\mu$ l de PBS-Twin 0,1% en cada hoyo

durante 3 minutos.

- *Saturación.*

Mediante la saturación se llenan los sitios libres de la placa de ELISA con proteínas, para evitar que los anticuerpos específicos y no específicos se fijen a la placa. En esta forma se añade la solución de saturación PBS-plasmión 20% ó PBS-leche 5% ( 200 µl por hoyo), se incuba a temperatura ambiente por 1 hora, y luego se lava 3 veces colocando 200 µl de PBS-Tween 0,1% en cada hoyo durante 3 minutos.

- *Incubación con el anticuerpo específico alfa 2 macroglobulina y anticuerpo control.*

Se pone 100 µl por hoyo de sobrenadante de cultivo conteniendo anticuerpos específicos 1/20 (puro) y una dilución de 1/1000 de anticuerpo control. Luego se incuba a temperatura ambiente por 1 ó 2 horas, después de la incubación se realizan 3 lavados con PBS-Tween 0,1%.

- *Incubación con el anticuerpo marcado a la fosfatasa alcalina..*

Se colocan 100 µl de una solución del segundo

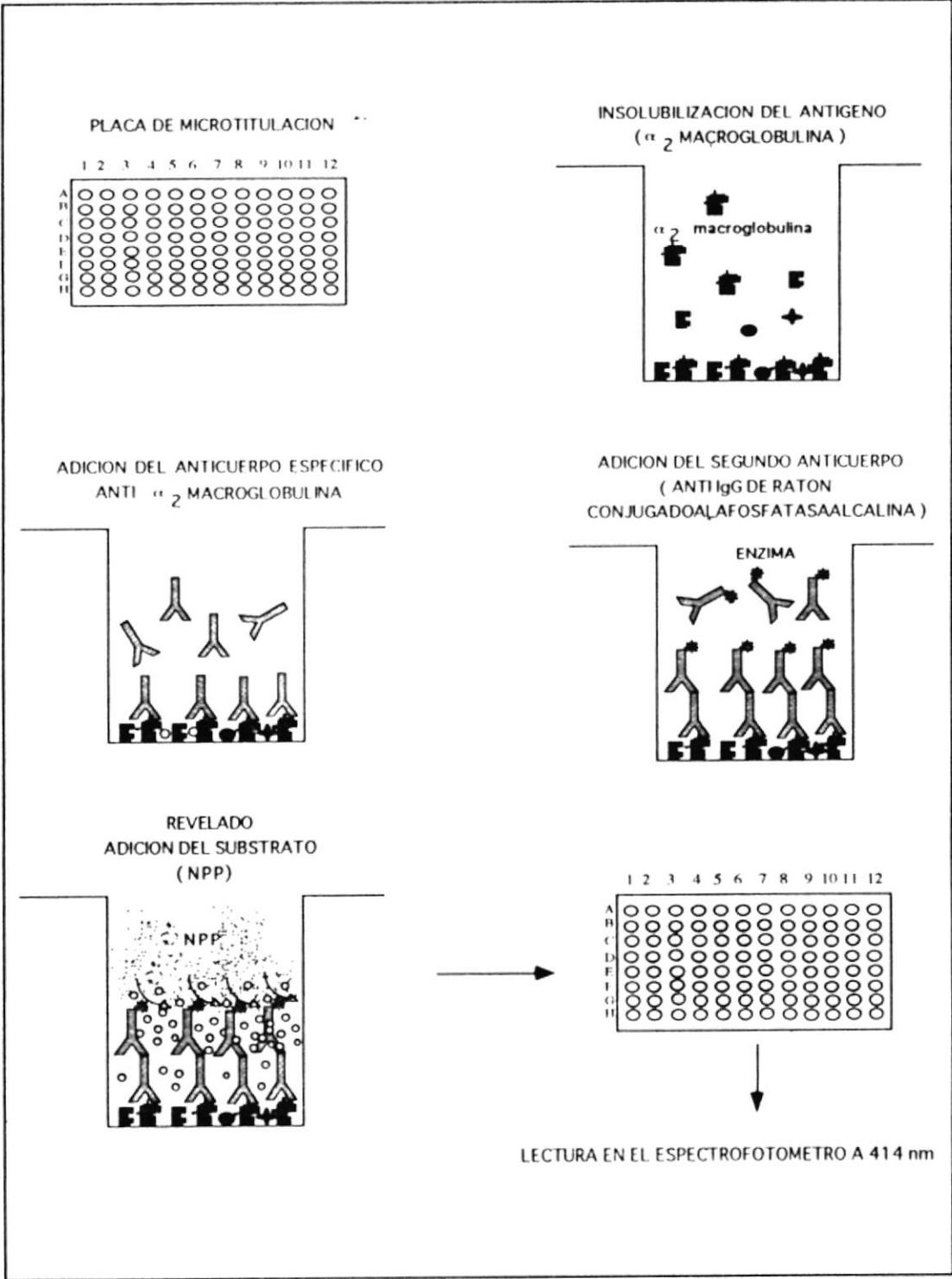


Figura 2.1: Principio del ensayo ELISA indirecto.

anticuerpo anti IgG de ratón conjugado con fosfatasa alcalina diluida 1/10000 respectivamente, las placas son incubadas por 1 hora, los hoyos son lavados 3 veces con PBS-Tween 0,1%. Antes del revelado se debe agregar a los hoyos el tampón de la enzima por 2 minutos.

- *Revelado.*

Se añaden 100 µl de tampón (10 ml de agua destilada, 0,5 ml de dietanolamina sigma D-2286, pH 9.8) junto con 0,1% del sustrato Nitrophenil phosphato (Sigma, N-9389) para la fosfatasa alcalina. Luego de 30 minutos la placa es leída en un espectrofotómetro de microplacas a 405 ó 415 nm cuando se ha usado anticuerpo conjugado con fosfatasa alcalina.

### 2.5.3. ELISA competitivo.

#### 2.5.3.1. Principio.

El principio del método consiste en realizar un ELISA indirecto incubando previamente el anticuerpo específico con antígeno soluble, la cantidad de anticuerpo inhibido durante la

incubación estará en función de la cantidad de antígeno soluble. Diferentes soluciones de antígeno soluble (Hemolinfa) son incubados con una misma dilución de anticuerpos (41B12) en tubos. Después de 2 horas de incubación, esta mezcla será utilizada como anticuerpo específico en un ELISA indirecto, en el cual el antígeno insolubilizado corresponde a una muestra fija de hemolinfa (Figura 2.2).

La señal obtenida será inversamente proporcional a la cantidad de inhibidor utilizado (antígeno soluble), así tendremos un método de cuantificación de la cantidad de antígeno presente en la muestra.

#### 2.5.3.2. Reactivos.

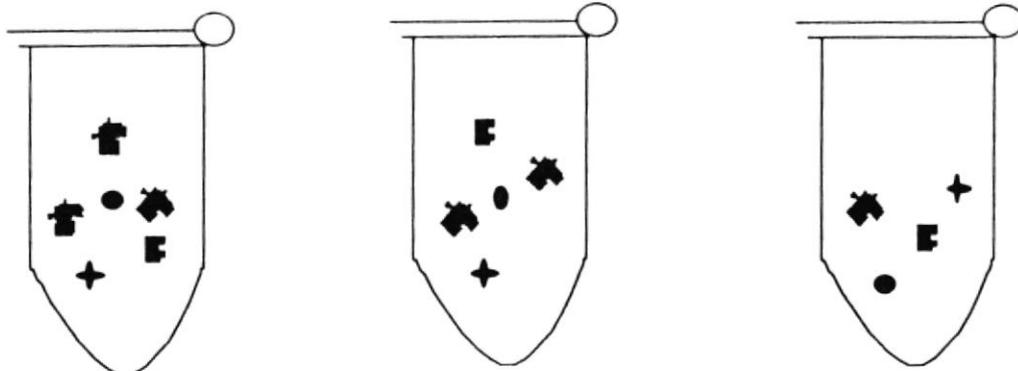
Anticuerpo monoclonal 41B12, específico contra la proteína alfa 2 macroglobulina de *P. japonicus* (Rodríguez, *et.al* 1995) contra la alfa 2 macroglobulina, de *P. vannamei*.

#### 2.5.3.3. Protocolo.

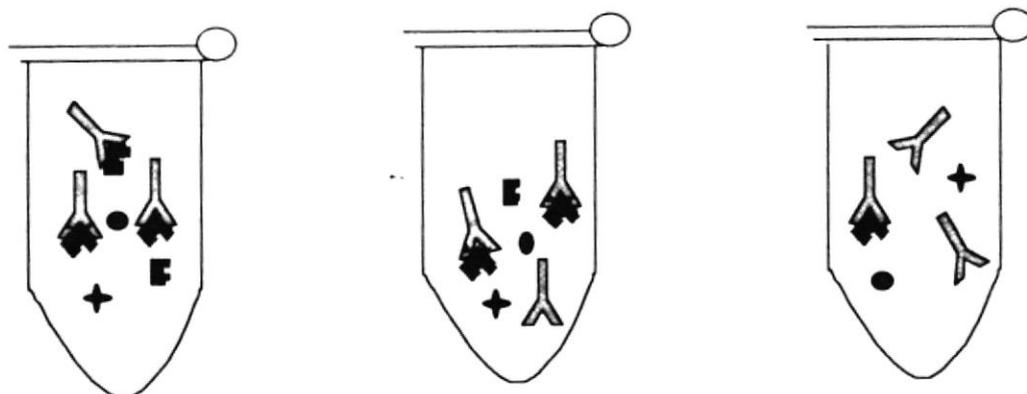
En tubos de hemólisis se colocan 200 µl del antígeno diluído en serie (Desde 1/2 hasta 1/512) en PBS a 300 mOsm., son incubados durante dos horas con 200 µl de una dilución de 1/20 de anticuerpos 41B12 disueltos en PBS-Tween0,1%-leche0,5%. A

continuación, 100  $\mu$ l de cada una de las diluciones fueron utilizadas como anticuerpo específico en un ELISA indirecto, cada muestra se analizó por duplicado. El control positivo se realizó utilizando el anticuerpo 41 B12 diluido 1/20 en PBS-Tween0,1%-leche0,5%, en tanto en el control negativo se utilizó 100  $\mu$ l de mezcla hemolinf-anticoagulante.

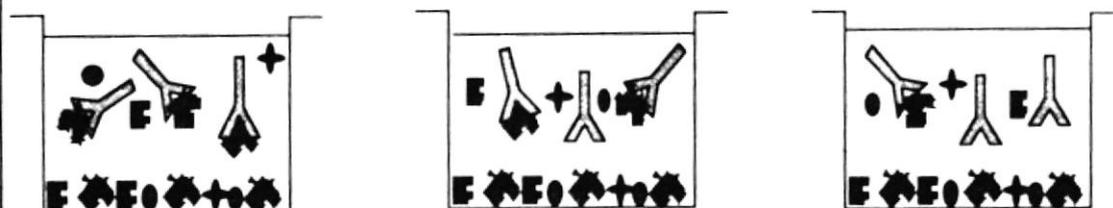
Muestras de hemolinfa con diferentes cantidades de  $\alpha 2$  macroglobulina.



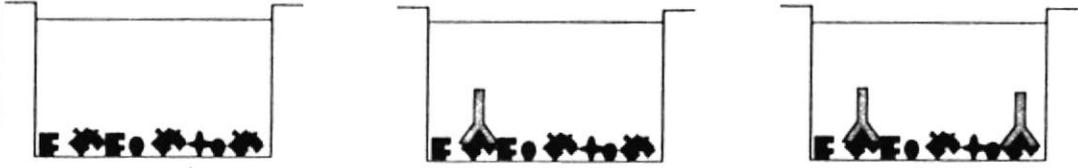
Una cantidad estandar de anticuerpos 41 B12 se adicionan a cada muestra de hemolinfa.



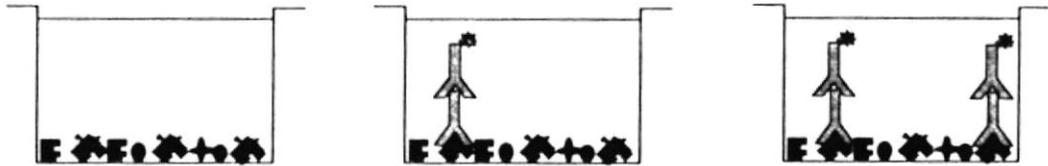
Los anticuerpos 41B12 que permanecen libres reaccionan con la  $\alpha 2$  macroglobulina que se encuentra fija en una placa de microtitulación (insolubilizado).



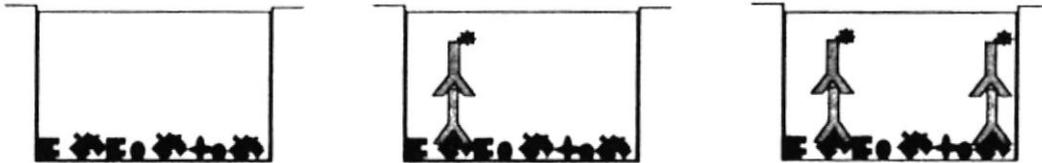
Se adiciona el primer anticuerpo que posee la capacidad de reconocer a una proteína específica.



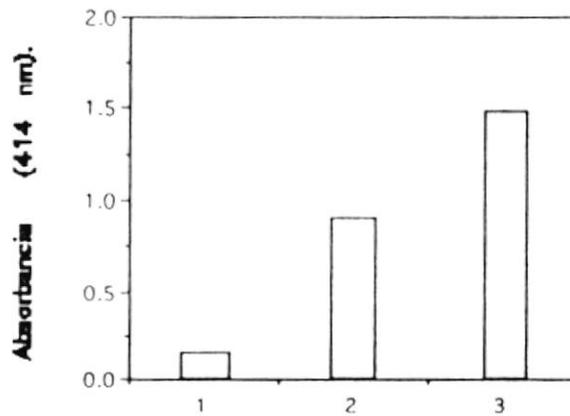
Se adiciona el segundo anticuerpo marcado a la enzima fosfatasa alcalina.



Se adiciona un sustrato que reacciona con la enzima, esta reacción se traduce en un cambio de color que puede ser cuantificado utilizando un espectrofotómetro.



Este cambio colorimétrico que se encuentra en relación inversamente proporcional a la cantidad de alfa 2 macroglobulina.



Muestras de hemolinfa de diferentes camarones

Figura 2.2: Principio del ensayo ELISA competitivo.

# CAPITULO III

## RESULTADOS Y DISCUSION.

### Parte I

#### 3.1. Desarrollo y optimación de primocultivos de hemocitos.

El desarrollo de pruebas para evaluar el estado inmunitario del camarón implica tomar y mantener muestras de hemolinfa en condiciones que eviten a los factores plasmáticos entrar en actividad. Estos factores intervienen en un gran número de procesos inmunitarios como la coagulación, la que se acompaña asimismo de desgranulación y agregación. Esto hace necesario evaluar y seleccionar diferentes anticoagulantes, y medios de cultivo para mantener los hemocitos en buen estado durante los ensayos realizados "*in vitro*".

##### 3.1.1. Evaluación de anticoagulantes.

Existe relativamente poca información relacionada a las soluciones de extracción de hemolinfa de camarón (Rodríguez *et al.*,1995). Los anticoagulantes generalmente están compuestos de queladores de iones o de aminoácidos que inhiben la coagulación, en una solución tampón que permite mantener estable el pH. Además estos anticoagulantes deben permitir la reactivación de los procesos biológicos celulares y humorales de la

respuesta inmunitaria, una vez que el anticoagulante se ha eliminado o diluído. Diferentes soluciones de anticoagulantes fueron ensayadas en este trabajo (Tabla I).

#### 3.1.1.1. Solución modificada de Alsever.

Esta solución isoosmótica descrita por Bachere (1988), posee citrato de sodio 30 mM, el cual además cumple la función de tampón, Glucosa 115 mM, cloruro de sodio 338 mM y EDTA (Acido etilén diamino tetraacético). Ambos compuestos actúan como queladores de los iones necesarios para activar el factor de coagulación. Con este anticoagulante se puede extraer tres volúmenes de hemolinfa contra un volumen de anticoagulante, obteniendo una muestra de hemolinfa fluída. Las células presentan un aspecto morfológico irregular al ser observadas al microscopio (figura 3.1.1 foto 1-a).

#### 3.1.1.2. Solución citrato de sodio al 10%.

Con este anticoagulante se ha logrado extraer sin problemas de coagulación hasta seis volúmenes de hemolinfa, contra un volumen de anticoagulante. Las células, aunque no presentan un buen aspecto morfológico, recobran bien su actividad funcional.

(figura 3.1.1 foto 1-b).

#### 3.1.1.3. Solución de cisteína al 2.5% en MHBSS.

La cisteína actúa como anticoagulante gracias a su capacidad de bloquear los grupos sulfuro que intervienen en la formación de enlaces entre las diferentes moléculas del factor de coagulación (F.C) (Durliat and Vranckx, 1981). Las células al ser observadas al microscopio conservan excelentes características morfológicas. Sin embargo, la proporción entre la cantidad de hemolinfa tomada y la cantidad de anticoagulante no puede ser superior a 1, para evitar los procesos de coagulación.

#### 3.1.1.4. Solución de citrato al 5% en MHBSS.

Su capacidad de inhibir la coagulación es baja y debe evitarse tomar un mayor volumen de hemolinfa que de anticoagulante. Esta solución, permite obtener hemocitos con buen aspecto morfológico y que además recobran bien sus actividades fisiológicas en primocultivos.

#### 3.1.1.5. Solución de citrato de sodio 5% y cisteína 1.25%.

Esta solución antiacoagulante es preparada mezclando volumen a volumen una solución de citrato de sodio al 10% y una solución de cisteína al

2,5 %. Con este anticoagulante se puede extraer un mayor volumen de hemolinfa. Las células tienen una excelente apariencia, guardando su aspecto morfológico original (Figura 3.1.1: foto 1-c). Hay que recordar que no se puede mantener una solución madre de este anticoagulante por más de 24 horas, debido a la fuerte precipitación de la cisteína.

**Tabla I.**

Tabla I: Proporción de hemolinfa que puede ser obtenida con diferentes anticoagulantes y el efecto del anticoagulante sobre el aspecto morfológico de los hemocitos. ( \* \* \* ) muy buena, ( \* \* ) buena, ( \* ) regular.

ANTICOAGULANTE.	Proporción de anticoagulante	Aspecto de las células.
Alsever	1 / 3	* *
Citrato de Na.	1 / 6	* *
Cisteína 2,5% / MHBSS.	1 / 1	* *
Citrato de Na 5% / MHBSS	1 / 1	* * *
Citrato de Na 5%/Cis 1,25%/MHBSS 0,5 X	1 / 3	* * *

La necesidad de estudiar y evaluar varios parámetros inmunológicos con la misma muestra de hemolinfa, obliga a seleccionar anticoagulantes que tengan el más grande espectro de

aplicaciones. El citrato de sodio 5%/Cisteína 1,25% en MHBSS fue utilizado, durante los primeros meses, en el estudio del número de células, hemogramas, dosificación de proteínas inmunitarias y actividad antibacteriana, aunque las muestras de hemolinfa obtenidas con este anticoagulante, presentaron una fuerte precipitación cuando fueron almacenadas a temperaturas inferiores a -4 °C. Por esta razón, este anticoagulante, fue reemplazado por el citrato de sodio al 10 %, anticoagulante que posee un mayor rango de acción, ya que permite cuantificar también el choque respiratorio. En conclusión para todos los ensayos encaminados a cuantificar la respuesta inmune de los camarones posteriores a este trabajo, el anticoagulante seleccionado fue el citrato de sodio al 10% .

### 3.1.2. Implementación de cultivos primarios de hemocitos.

Teniendo en cuenta la posibilidad de obtener muestras de hemolinfa con hemocitos aparentemente en buenas condiciones, fue después explorada la implementación de cultivos primarios de hemocitos como sistema de estudios “*in vitro* “ de las funciones hemocitarias, en particular la fagocitosis.

En el protocolo de implementación de primocultivos en *P.japonicus*, previamente descrito (Rodríguez, 1994), la hemolinfa fue centrifugada para separar los hemocitos del plasma. Este protocolo aplicado a *P. vannamei* muestra que esta centrifugación seguida de la resuspensión de las

células en el medio de cultivo, hace disminuir la capacidad de fijación de los hemocitos. Consecuentemente se ensayó con éxito, primocultivos con hemolinfa total, evitando la centrifugación. Por esta razón en las siguientes pruebas, las muestras de hemolinfa fueron depositadas directamente, diluyéndolas con diferentes medios de cultivo, con la finalidad de reducir la cantidad de anticoagulante, y para reactivar los hemocitos.

Diferentes medios fueron evaluados, de acuerdo al aspecto morfológico en microscopía y el nivel de fijación de los hemocitos en la placa después de 30 min de cultivo. Los resultados serán descritos a continuación y se encuentran resumidos en la tabla III.

#### 3.1.2.1. Tampón fosfato salino (PBS 800 mOsm, pH 7,2, DulbecolX).

En este medio de cultivo los hemocitos se adhieren uniformemente a la fase sólida, sin embargo aunque la presencia de  $\text{Ca}^{++}$  y  $\text{Mg}^{++}$  haya favorecido esta actividad celular, su aspecto morfológico redondo nos permite deducir, que la concentración en estos iones no es la adecuada para

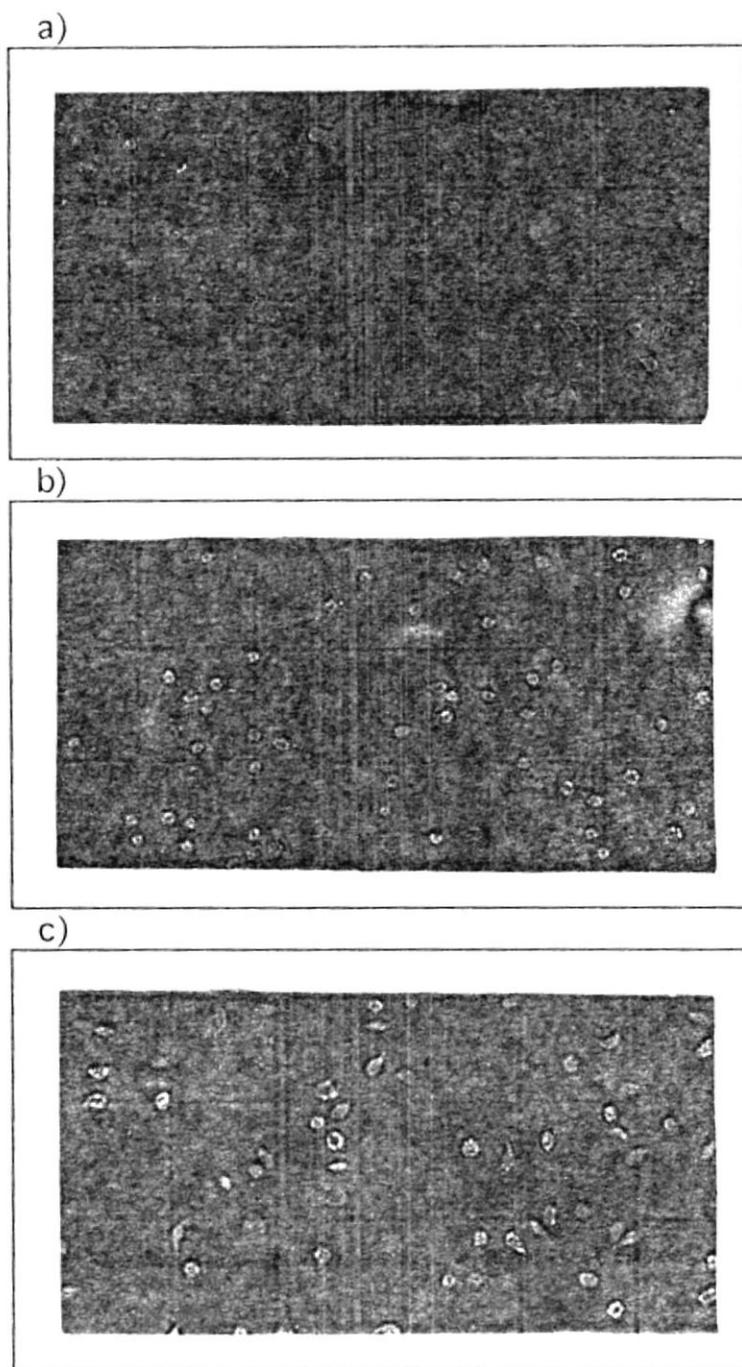


Figura 3.1.1: Hemocitos de *P. vannamei* extraídos con diferentes anticoagulantes: Alsever ( a ), citrato de sodio al 10 % ( b ), citrato de sodio 5 % -cisteína 2,5 % en MHBSS 0.5 X ( c ). 200 X.

los movimientos de membrana (foto 2-a).

**Tabla II.**

Tabla II: Características presentadas por los hemocitos al ser cultivados en diferentes medios. (\*\*\*) muy buena, (\*\*) Buena, (\*) Regular, (-) Carencia total, (!). Presencia de coagulación.

MEDIOS DE CULTIVO	Adhesión	Aplanamiento
Tampón fosfato salino I, 650 mM ClNa	*	*
Tampón fosfato salino II, 100 mM ClNa	*	-
Agua de mar estéril 70%.	***	***
MHBSS.	**	*
MHBSS con 12 mM Ca y 26 mM Mg.	***	**
MHBSS con 24 mM Ca y 52 mM Mg.	!	!
Medio de Leibovitz (L 15)	*	-

### 3.1.2.2. Tampón fosfato salino (PBS 800 mOsm, pH 7.2, Dulbecco 2X).

No hubo diferencia significativa en el aspecto morfológico de los hemocitos, en función a la doble cantidad de calcio (2X) que hubo en el PBS 2X con

respecto al PBS IX. Los hemocitos se fijaron uniformemente, pero guardaron un aspecto redondeado, probablemente también por la deficiente cantidad de  $\text{Ca}^{++}$  y  $\text{Mg}^{++}$ , (foto 2-b).

#### 3.1.2.3. Agua de mar estéril.

En los primocultivos preparados con agua de mar los hemocitos presentan una disposición homogénea. La mejor apariencia fue obtenida a una dilución del agua de mar al 70%, la misma que fue obtenida, cuando se probaron diferentes diluciones buscando un medio isoosmótico con la hemolinfa de los camarones, que se encuentra entre 700 y 800 mOsm. Probablemente la presencia de una gran cantidad de iones, incluyendo  $\text{Ca}^{++}$  y  $\text{Mg}^{++}$ , mejoran la capacidad de las células de retomar su actividad biológica (foto 2-c).

#### 3.1.2.4. Solución modificada de sales de Hank's (MHBSS).

Los hemocitos en este medio de cultivo presentan un buen aspecto morfológico aunque la falta de iones de  $\text{Ca}^{++}$  y  $\text{Mg}^{++}$  disminuye la capacidad de fijación de los hemocitos (foto 3-a).

#### 3.1.2.5. Solución modificada de sales de Hank's (MHBSS). con 6 mM de $\text{Ca}^{++}$ y 13 mM de $\text{Mg}^{++}$ .

A las sales de Hank's se le añadió 6 mM de  $\text{Ca}^{++}$  y 13 mM de  $\text{Mg}^{++}$ , que corresponde a la concentración de estos iones en la hemolinfa del cangrejo azul (La Peyere,1990). Las células en este medio de cultivo tienen un aspecto comparable al primocultivo realizado con agua de mar, debido probablemente a la presencia estabilizadora del tampón Hepes, la cual permite que los iones libres de  $\text{Ca}^{++}$  y  $\text{Mg}^{++}$  actúen y favorezcan las funciones biológicas de las células (foto 3-b).

#### 3.1.2.6. Solución modificada de sales de Hank's (MHBSS).con 12 mM de $\text{Ca}^{++}$ y 26 mM de $\text{Mg}^{++}$ .

Las células en este medio de cultivo no pudieron ser observadas al microscopio debido a que las muestras se coagularon en todos los hoyos, preparados con este medio de cultivo. Es probable que el exceso de iones libres de  $\text{Ca}^{++}$  y  $\text{Mg}^{++}$  permitiera una fuerte reactivación del proceso de coagulación.

#### 3.2.1.7. Medio de cultivo de Leibovitz (L 15).

Este medio de cultivo se utilizó a una concentración de 2X para elevar la osmolaridad del mismo a 750 mOsm. El medio L 15 no proporcionó las condiciones químicas adecuadas para que las células retomen y mantengan sus

actividades biológicas, incluso añadiendo  $\text{Cl}_2\text{Ca}$ .

De las observaciones al microscopio, se puede deducir que los mejores medios de cultivo son el agua de mar estéril al 70 % y el MHBSS conteniendo 6 mM de  $\text{Ca}^{++}$  y 13 mM de  $\text{Mg}^{++}$ , lo que constituye un indicio sobre la importancia de estas iones(especialmente del calcio) en muchas funciones celulares, entre las que se puede incluir, la fagocitosis. Los hemocitos expuestos a los medios de cultivo L15, PBS 1X y 2X no presentaron un buen aspecto en observaciones al microscopio.

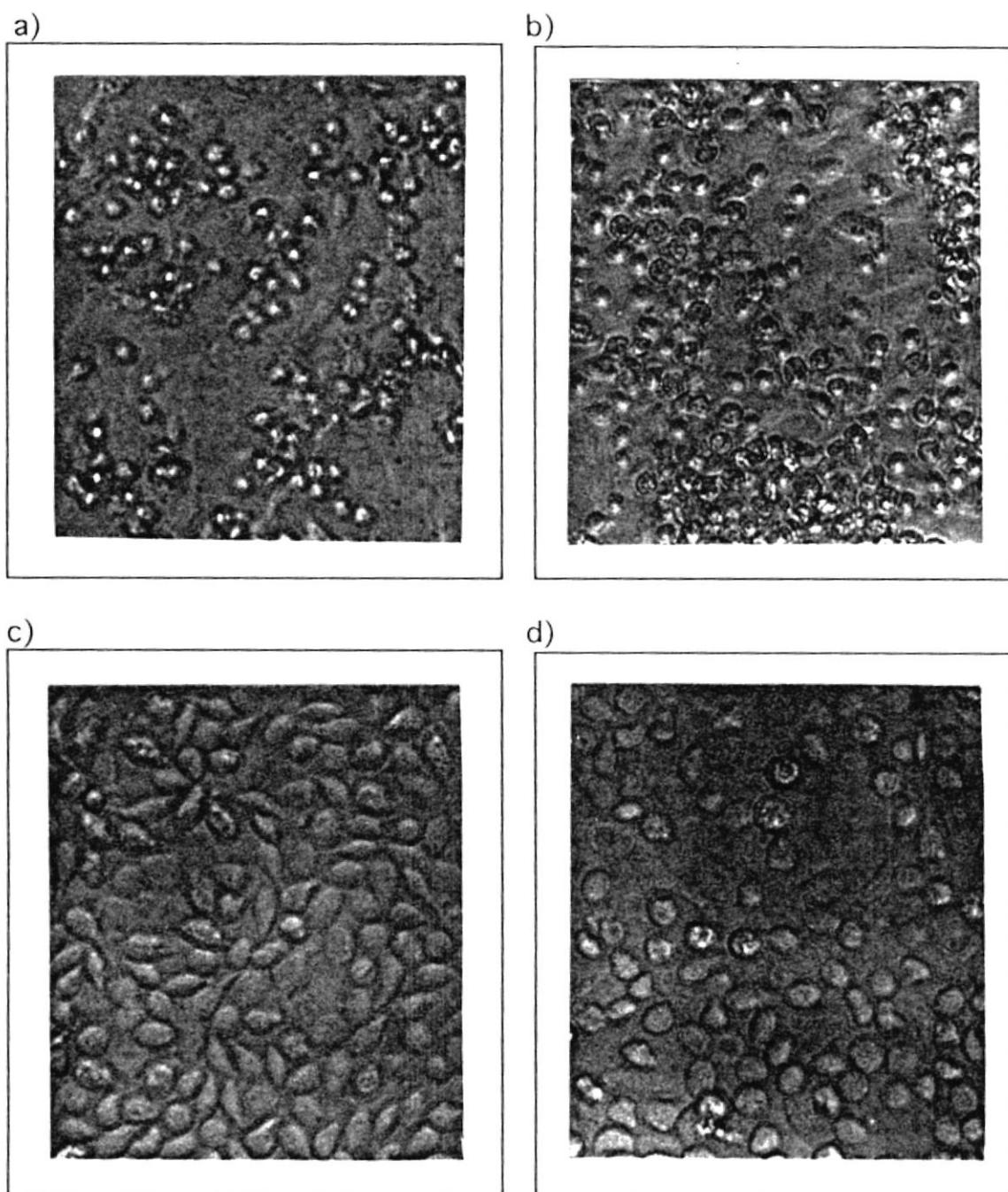


Figura 3.1.2: Primocultivos de hemocitos preparados en diferentes medios de cultivo: PBS Dulbecco 1X (a) 200 X, MHBSS 0X 200 X, ( b ) MHBSS 1X 300 X (c) y Agua de mar (d) 300 X.

## PARTE II.

### 3.2 Hemogramas.

El hemograma corresponde al número y la proporción de diferentes tipos de hemocitos presentes en una muestra de hemolinfa provenientes de un individuo. En los crustáceos, tres grupos morfológicos de hemocitos son clásicamente reconocidos (Hose and Martin, 1989). El hemograma varía de acuerdo a procesos naturales como cambios fisiológicos, el ciclo de muda, el sexo (Tsing, 1987; Hose *et al*, 1992); consecuentemente los hemogramas podrían constituir un marcador del estado fisiológico e inmunitario de los camarones (Tsing, 1987).

#### 3.2.1. Selección del mejor anticoagulante para la determinación del hemograma.

Es primordial evitar los fenómenos de agregación, lo que hace imposible enumerar los hemocitos. Consecuentemente, las soluciones anticoagulantes deben ser más eficaces que las utilizadas para los primocultivos. En la práctica, para prevenir eficazmente la agregación fue necesario extraer la hemolinfa con una solución anticoagulante y las muestras sobre hielo.

Entre los anticoagulantes evaluados, los mejores resultados, en términos de prevención de la agregación, fueron obtenidos con la solución modificada de Alsever y la

solución de citrato (5%) cisteína (25 mg/ml), además se debe recomendar el uso de formol 3%, en rutina para diferir la determinación de los hemogramas.

### 3.2.2. Comparación de técnicas para la determinación de los tipos hemocitarios.

La mayor dificultad en la determinación de los hemogramas por microscopía óptica corresponde al reconocimiento de los hemocitos basados en criterios morfológicos, lo que permitió clasificarlos; para realizar ésto nos basamos en trabajos de Tsing (1987); Hose *et al* (1987, 1989) y Rodriguez *et al.* (1995). Se abordaron 2 formas sencillas basadas en tinciones y en microscopía de contraste de fases.

#### 3.2.2.1. Tinciones.

La tinción con el Kit Hemacolor fue realizada sobre primocultivos de hemolinfa y suspensiones de células citocentrifugadas (ver materiales y métodos). Los hemocitos granulados pueden ser determinados con precisión debido a la presencia de los gránulos, pero no fue fácil diferenciar los hemocitos hialinos y semigranulosos (Figura 3.2.1, foto-a). Los hemocitos semigranulosos parecen más rosados que los hialinos. Sin embargo, este criterio de tinción no es confiable, lo que dificulta



establecimiento de los hemogramas utilizando las tinciones.

#### 3.2.2.2. Microscopía de contraste de fases

Otra técnica para clasificar a los hemocitos se basa en la observación al microscopio de contraste de fases (Figura 3.2.1, foto-b). Los hemocitos granulados son fácilmente reconocidos por la presencia de gránulos. Sin embargo, los otros hemocitos no son fáciles de identificar y se presentan como una serie continua con 2 tipos extremos: los hialinocitos, con muy poca refringencia y una coloración azul marino y, los semigranulocitos, más refringentes y de un color celeste y entre estos 2 tipos existe un gran número de hemocitos intermedios que presentan características de refringencia y color, entre los hialinocitos y semigranulocitos, lo que no permite clasificarlos .

#### 3.2.3. Determinación de hemogramas.

Una evaluación de la técnica de microscopía de contraste de fases previamente descrita, fue realizada con muestras para determinar hemogramas individuales. Esta técnica fue seleccionada porque entrega igual información

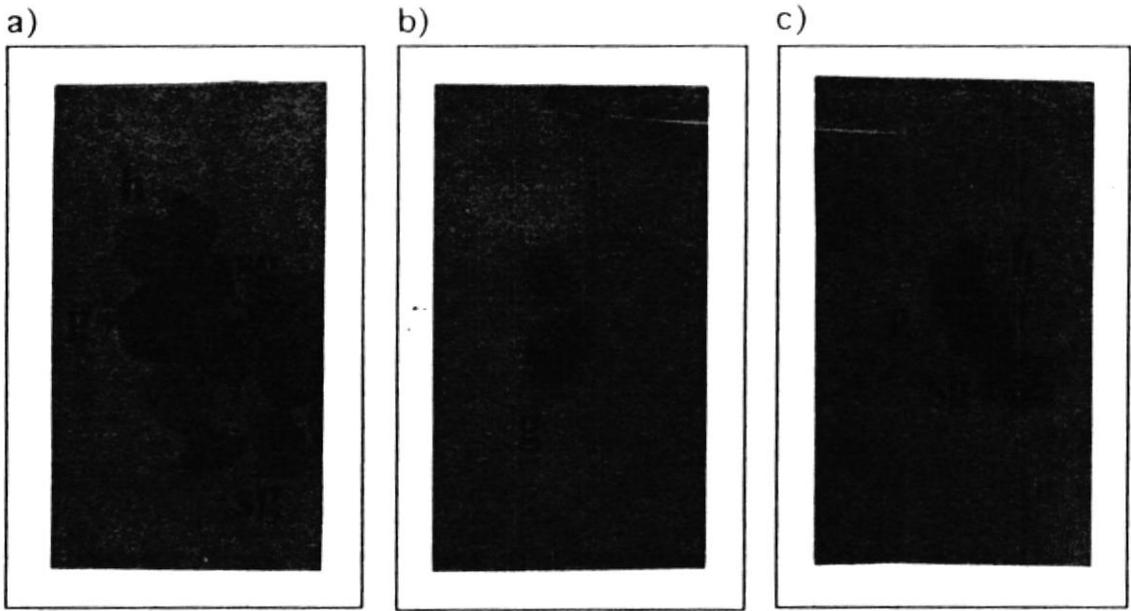


Figura 3.2.1: Tinciones de hemocitos citocentrifugados, realizadas con el Kit hemacolor para determinar los diferentes tipos hemocitarios en *P. vannamei*. Hemocitos Hialinos (h), semigranulosos (sg) y granulosos (g). (a), Hemocito granuloso (b), Hemocito hialino, semigranuloso y ganuloso (c), 1000 X.

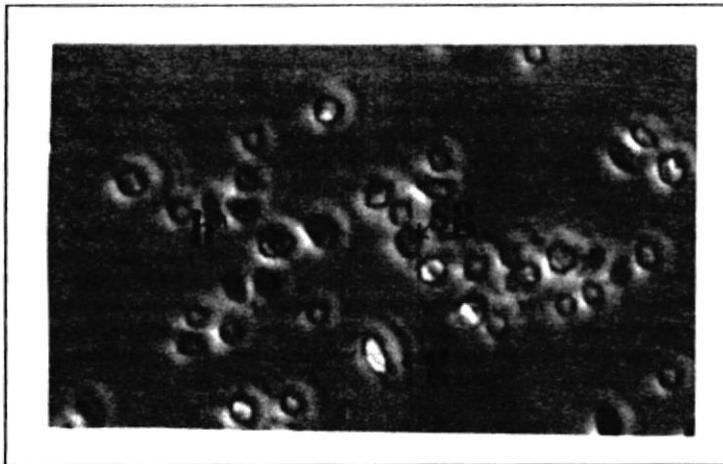


Figura 3.2.2: Observación de hemocitos en fresco, realizada con el microscopio de contraste de fases: Hemocitos hialinos (h), semigranulosos (sg) y granulosos(g). 300 X.

que las tinciones en términos de reconocimiento de los hemocitos y presenta numerosas ventajas debido a que la enumeración y la determinación de los hemocitos se pueden realizar simultáneamente, mientras que en la observación de preparaciones teñidas se necesita previamente la numeración celular y la citocentrifugación de los hemocitos, que constituye una operación engorrosa en particular si se necesita analizar muchas muestras. Al contrario las muestras al observarse en contraste de fases no requieren una preparación elaborada.

Los resultados de los hemogramas de una serie de 12 animales se muestran en la figura 3.2.3. El número de hemocitos de los camarones de una misma población, fue muy variable, ya que algunos animales (5, 6, 7, 12) presentaron menos de 5 millones de hemocitos/ml, en tanto que otros (1, 2, 4) tenían más de 5 millones de hemocitos/ml. Estos datos concuerdan con las variaciones individuales previamente observadas en *P. japonicus* (Tsing, 1987) y en *Sycionia ingentis* (Hose et al, 1992); estos trabajos relacionan las variaciones del número de hemocitos con el ciclo de muda.

La proporción de los diferentes tipos hemocitarios es confiable en lo que concierne a la separación de los hemocitos granulados, pero es más propensa a dudas para la evaluación del

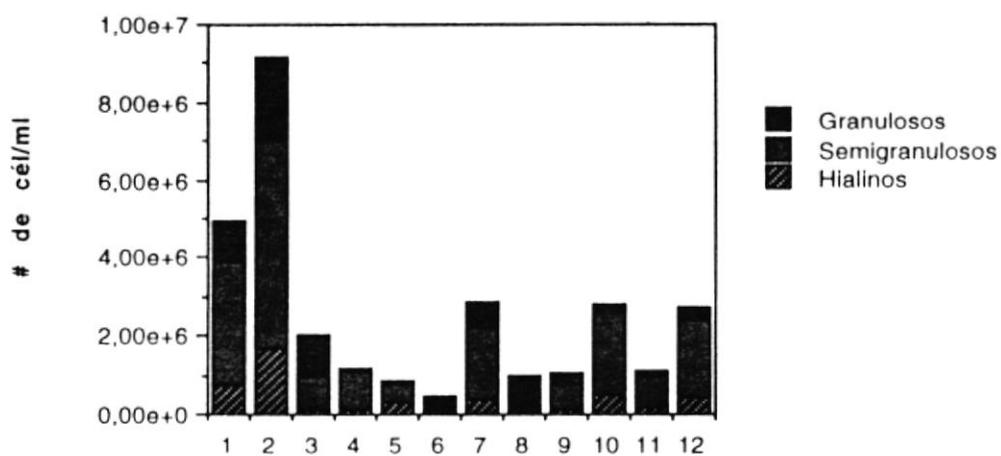


Figura 3.2.3: Determinación de los hemogramas de un grupo de 12 camarones.

porcentaje de hialinos y semigranulosos en relación con su identificación. Los hemocitos hialinos y semigranulosos constituyen aproximadamente el 70 % de la población total de los hemocitos figura (3.2.3.)

## PARTE III

### 3.3. Exploración y optimación de ensayos para evaluar la actividad fagocítica de los hemocitos en *P. vannamei*.

#### 3.3.1. Implementación de un protocolo para la cuantificación del anión superóxido en *P. vannamei*.

La reducción del Nitro blue tetrazolium ( NBT ) es un ensayo utilizado rutinariamente para determinar la actividad oxidativa de los macrófagos y de células fagocíticas de diferentes animales durante el proceso de fagocitosis (Müller, Rollag and Froland, 1989). La reducción del NBT sirve para cuantificar el anión superóxido, primer radical tóxico producido durante el choque respiratorio por los macrófagos (para más detalles revisar Klein, 1982). Este tipo de ensayos ha encontrado su aplicación en el estudio del choque respiratorio de moluscos ( Pipe, 1992,1995) y camarones ( Song and Hiegh, 1994). La implementación de este ensayo en *P. vannamei* puede proporcionar una herramienta interesante para evaluar el estado inmunitario del camarón y entregar información aplicable a la acuicultura de peneidos.

La implementación de esta prueba en *P. vannamei* ha requerido tomar en consideración protocolos utilizados en otros animales, en particular moluscos y peneidos, y adaptarlos a las condiciones fisiológicas de la hemolinfa de

*P. vannamei*.

### 3.3.1.1. Determinación de la solución de trabajo de NBT.

La solución madre de NBT generalmente es preparada utilizando dimetil-formamida (DMF) como solvente (Sigma D-8654), pero, a fin de evitar el riesgo de toxicidad del DMF sobre los hemocitos, el NBT fue diluido en agua destilada, a una concentración de 10 mg/ml (1%).

La solución de trabajo de NBT se prepara realizando diluciones de la solución madre en un tampón o medio de cultivo apropiado que permita una buena reactivación celular y, a la vez, no interferirá con la solubilidad del NBT. Así por referencia a diferentes trabajos (Song and Hiegh, 1994; Pipe *et al*, 1995) se probó diluciones de la solución madre en varios medios de cultivo, siendo estos MHBSS, una dilución de agua de mar (70%) y PBS (800 mOsm). El agua de mar y el PBS fueron descartados inmediatamente debido a que provocaron una fuerte precipitación del NBT. Luego de varios ensayos, probando la disolución del reactivo contra la sensibilidad de la prueba, se concluyó que la mejor solución de trabajo de NBT corresponde a una concentración de 0,24 % en MHBSS preparada al momento de uso. Con esta

solución de trabajo se puede obtener en la reacción una concentración final de NBT del 0,08%, la cual está en el rango de concentraciones utilizadas en este tipo de ensayos (Kabbur,1991; Pipe *et al*, 1995.). Adicionalmente esta solución tiene la ventaja de permitir una buena disolución del NBT a altas osmolaridades (800 mOsm, la osmolaridad de la hemolinfa del camarón).

### 3.3.1.2. Implementación de primocultivos de hemocitos para ensayos de cuantificación del anión superóxido.

En base a los resultados anteriormente descritos, se había concluido que los primocultivos de buena calidad pueden ser obtenidos mediante la siembra de hemocitos en agua de mar o MHBSS conteniendo  $\text{Ca}^{++}$  y  $\text{Mg}^{++}$ . Sin embargo, con el fin de implementar un protocolo para la cuantificación del anión superóxido en *P. vannamei*, se retomaron los estudios sobre el comportamiento celular y los medios de cultivo, con la finalidad de evaluar además de la morfología de las células, la actividad oxidativa de las mismas. Así se realizaron ensayos de reducción del NBT probando primocultivos de hemocitos de camarón preparados en diferentes medios de cultivo. Todos los valores numéricos de estos ensayos serán presentados en el anexo 4.

- 1) PBS 1X.
- 2) PBS 2X.
- 3) Agua de mar estéril.
- 4) MHBSS.

Teniendo los primocultivos listos, los ensayos de estimulación de la fagocitosis en presencia de NBT fueron realizados, a diferentes condiciones de incubación, ya sea guardando el sobrenadante de cultivo (la mezcla de plasma / anticoagulante / medio de cultivo), durante la reacción o eliminándolo.

Manteniendo el sobrenadante de cultivo, la actividad oxidativa de los hemocitos ( $9 \times 10^5$  cel por hoyo) estimulados es significativamente diferente de los no estimulados, si las células son cultivadas en los medios 2, 3, y 4 . Las lecturas de D.O. correspondientes al formazán solubilizado fueron relacionadas con la observación directa del formazán intracelular al microscopio óptico, las D.O. obtenidas con los medios 1 y 2 no concordaron con el escaso formazán observado en microscopía, sugiriendo que las D.O. elevadas corresponden a un artefacto relacionado a la presencia del plasma durante la reacción (Fig. 3.3.1).

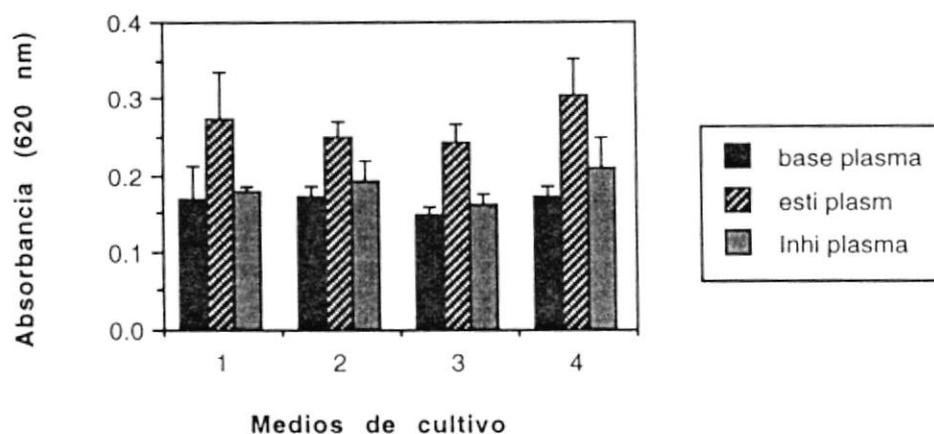


Figura 3.3.1: Efecto de diferentes medios de cultivo sobre la producción de anión superóxido conservando el plasma durante la reacción.

- 1) PBS 1X.
- 2) PBS 2X.
- 3) Agua de mar estéril.
- 4) MHBSS

Eliminando el sobrenadante de cultivo, la actividad oxidativa de los hemocitos ( $9 \times 10^5$  cel por hoyo) estimulados es significativamente diferente a la de los hemocitos de actividad básica, con los primocultivos preparados con los medios 1, 3 y 4 como se puede observar en la figura 3.3.2. Cabe recalcar que las señales obtenidas en D.O. se encuentran estrechamente relacionadas con las cantidades de formazán intracelular observadas al microscopio óptico.

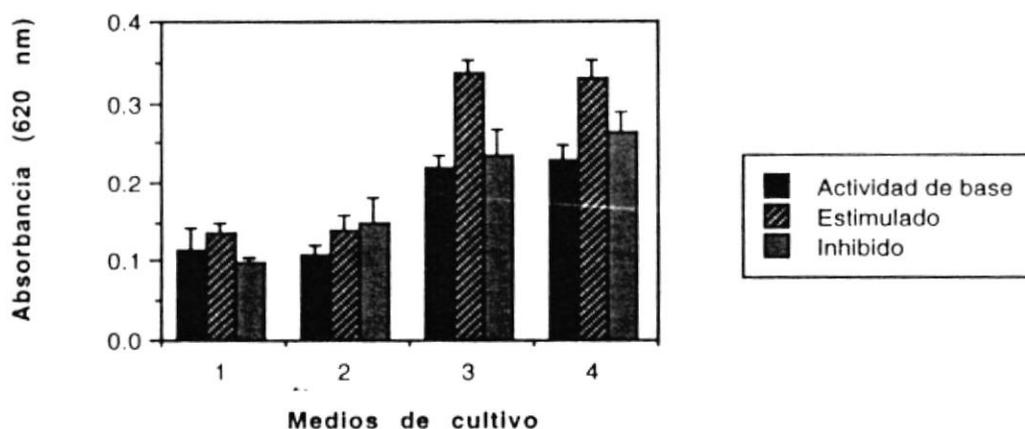


Figura 3.3.2: Efecto de diferentes medios de cultivo sobre la producción de anión superóxido, sin conservar el plasma durante la reacción.

- 1) PBS 1X.
- 2) PBS 2X.
- 3) Agua de mar estéril.
- 4) MHBSS.

Por estas razones, se puede considerar que los medios 1 y 2, en ausencia o presencia de plasma, no están bien adaptados para realizar la reducción del NBT.

El medio 3 fue definitivamente el más adaptado en presencia y ausencia de plasma, pero la variabilidad iónica propia del agua de mar, comprometería la precisión de los resultados obtenidos con esta técnica.

Con el medio 4, en ausencia de plasma, los valores D.O obtenidos con los hemocitos

estimulados fueron equivalentes a los del medio 3, sin embargo, los hemocitos sometidos al medio 4 no presentaron una buena morfología, siendo poco adherentes y extendidos, lo que pudo ser provocado por la carencia de iones  $\text{Ca}^{++}$  y  $\text{Mg}^{++}$ .

Los valores numéricos encontrados entre los medios 3 y 4 no presentaron mayores diferencias entre ellos, y la facilidad de trabajo de un medio de cultivo estándar con el 4 en relación con el medio 3, fueron las razones por las cuales se decidió utilizar el medio de cultivo 4, sin embargo se consideró necesario optimizar las concentraciones de  $\text{Ca}^{++}$  y  $\text{Mg}^{++}$  del MHBSS con el fin de incrementar la sensibilidad del ensayo y mejorar sus características morfológicas.

#### 3.3.1.3. Efecto del $\text{Ca}^{++}$ y $\text{Mg}^{++}$ sobre la producción de anión superóxido.

Una vez seleccionado el medio 4, el siguiente paso fue analizarlo en términos de concentraciones de  $\text{Ca}^{++}$  y  $\text{Mg}^{++}$ , iones esenciales para el proceso de fagocitosis y por consiguiente de la producción de anión superóxido por los hemocitos. A continuación se detalla la serie de concentraciones de  $\text{Ca}^{++}$  y  $\text{Mg}^{++}$  utilizadas.

- 1) MHBSS,  $\text{Ca}^{++}$  3 mM;  $\text{Mg}^{++}$  6,5 mM
- 2) MHBSS,  $\text{Ca}^{++}$  4,8 mM;  $\text{Mg}^{++}$  10 mM
- 3) MHBSS,  $\text{Ca}^{++}$  6 mM;  $\text{Mg}^{++}$  13 mM
- 4) MHBSS,  $\text{Ca}^{++}$  7,8 mM,  $\text{Mg}^{++}$  14,5 mM
- 5) MHBSS,  $\text{Ca}^{++}$  9 mM,  $\text{Mg}^{++}$  16,9 mM
- 6) MHBSS,  $\text{Ca}^{++}$  10,8 mM;  $\text{Mg}^{++}$  23,4 mM

En todas las concentraciones utilizadas se observó una diferencia significativa en la producción de anión superóxido al microscopio óptico (Fig. 3.3.3 foto a, b, c d.) y comparando la respuesta a la estimulación contra la actividad básica o la inhibición de los hemocitos ( $4 \times 10^5$  cel por hoyo) (Fig 3.3.4), salvo en la concentración 5.

Por otra parte, comparando los resultados de estimulación específica entre las diferentes concentraciones se encontró las concentraciones 4 y 5 demuestran poca sensibilidad, mientras que para las concentraciones 1, 2 y 3 los valores son más sensibles y específicos sin presentar diferencias significativas entre ellos (Figura 3.3.4).

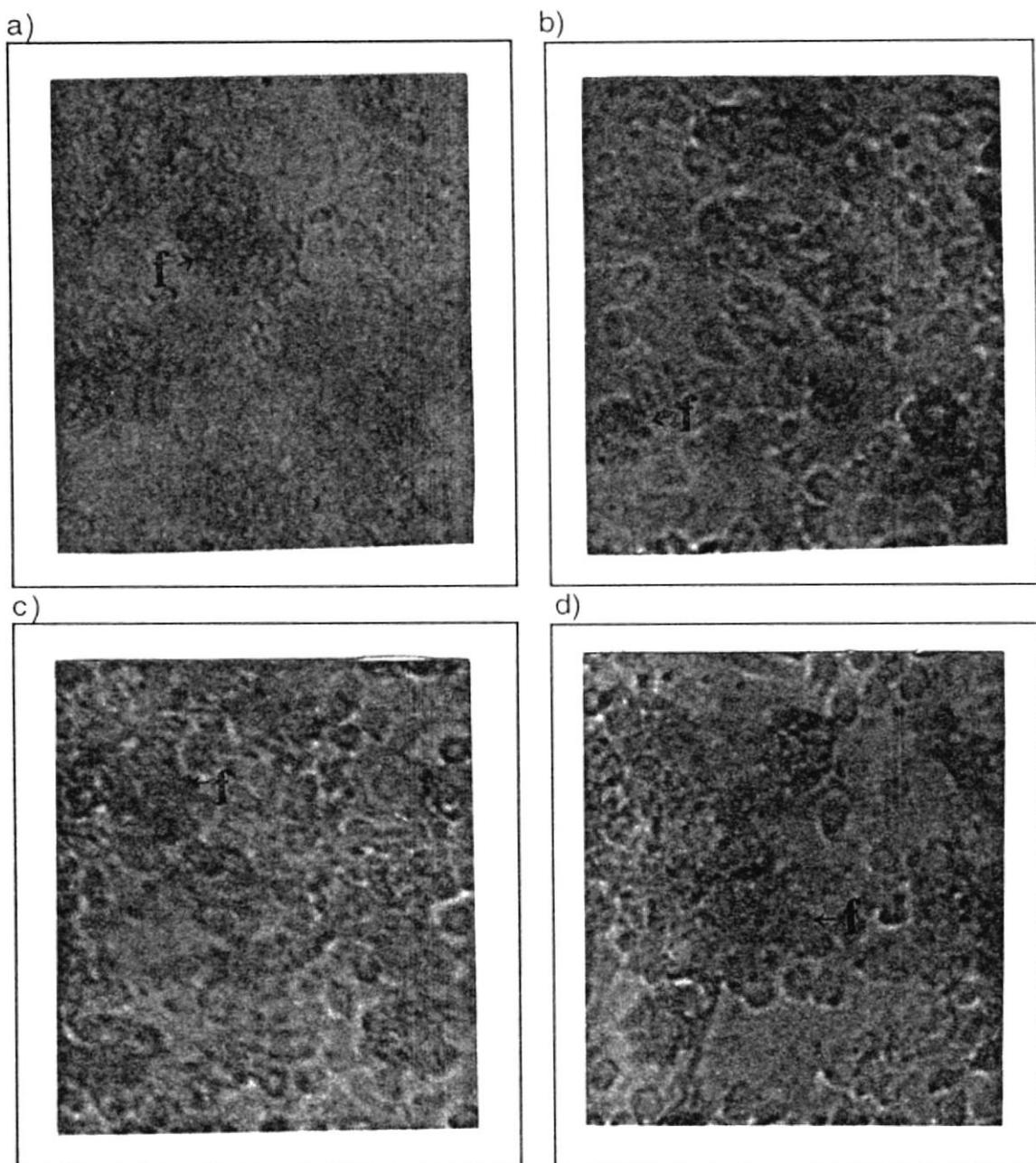


Figura 3.3.3: Efecto de diferentes concentraciones de los iones  $\text{Ca}^{++}$  y  $\text{Mg}^{++}$ , sobre la cantidad de formazán (**f**) obtenida debido a la reacción del  $\text{O}_2^-$  con NBT por hemocitos expuestos a MHBSS con 3 mM de  $\text{Ca}^{++}$  y 6.5 mM  $\text{Mg}^{++}$  (**a**), MHBSS con 4.8 mM de  $\text{Ca}^{++}$  y 10 mM  $\text{Mg}^{++}$  (**b**), MHBSS con 1 mM de  $\text{Ca}^{++}$  y 6.5 mM  $\text{Mg}^{++}$  (**c**) y MHBSS con 7.8 mM  $\text{Ca}^{++}$  y 14.5 mM  $\text{Mg}^{++}$  (**d**). 300 X.

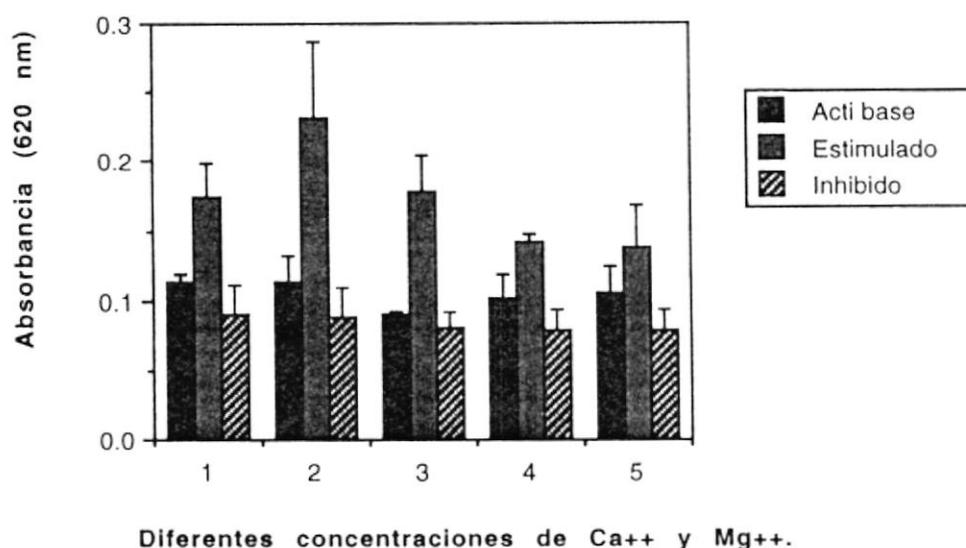


Figura 3.3.4 : Datos cuantitativos de reducción de NBT utilizando diferentes concentraciones de  $\text{Ca}^{++}$  y  $\text{Mg}^{++}$ .

- 1) MHBSS, 3mM  $\text{Ca}^{++}$ , 6.5 mM  $\text{Mg}^{++}$ .
- 2) MHBSS, 4.8 mM  $\text{Ca}^{++}$ , 10 mM  $\text{Mg}^{++}$ .
- 3) MHBSS, 6 mM  $\text{Ca}^{++}$ , 13 mM  $\text{Mg}^{++}$ .
- 4) MHBSS, 7.8 mM  $\text{Ca}^{++}$ , 14.5 mM  $\text{Mg}^{++}$ .
- 5) MHBSS, 9 mM  $\text{Ca}^{++}$ , 16.9 mM  $\text{Mg}^{++}$ .

La concentración 6 provocó una coagulación rápida y total de las muestras, que hizo imposible la experimentación.

#### 3.3.1.4. Efecto del número de hemocitos y del estimulante sobre la producción de anión superóxido.

La relación entre el número de hemocitos y la producción de anión superóxido fue analizada con tres concentraciones celulares,  $10^5$ ,  $5 \times 10^5$ ,  $10^6$ ; usando 3 tipos de estimulantes: PMA a 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , Laminarina 10  $\text{mg}/\text{ml}$  y 20 partículas de

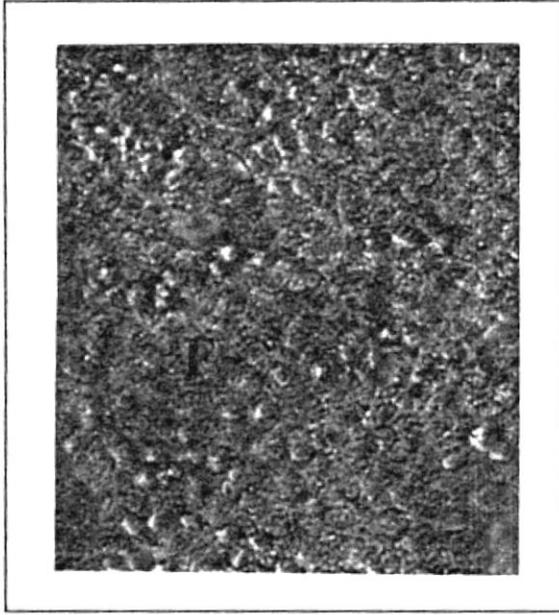
zimosán/hemocito. Los resultados mostraron claramente una relación directa entre la producción de anión superóxido y el número de hemocitos, con los tres estimulantes antes mencionados (Figuras fotos 3.3.5 y 3.3.6).

La especificidad de la producción de anión superóxido fue verificada para cada estimulante estimando la D.O. en presencia y ausencia de estimulante (actividad de base) y con un inhibidor específico, utilizando  $1 \times 10^6$  hemocitos por hoyo. Los resultados y los análisis estadísticos indicaron que las actividades son específicas en los tres tratamientos (Fig 3.3.7). Estos datos fueron corroborados con observaciones al microscopio óptico.

#### 3.3.1.5. Protocolo optimizado para cuantificar la producción de anión superóxido..

Las experimentaciones anteriormente descritas, han conducido al desarrollo e implementación de un protocolo optimizado para la cuantificación del anión superóxido en *P. vannamei*; este protocolo será detallado a continuación y se encuentra resumido en la figura 3.3.8.

a)



b)

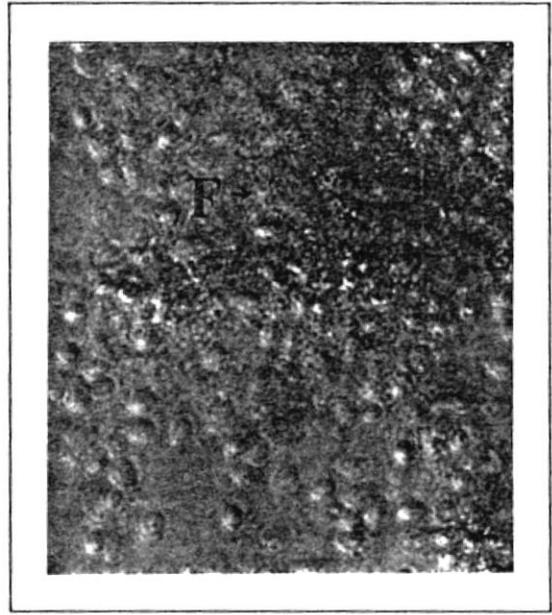
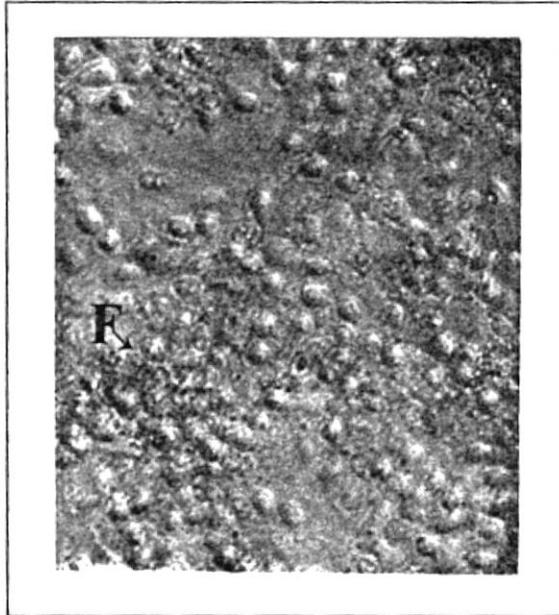


Figura 3.3.5 : Formazán (F) obtenido por reducción del  $O_2^-$  en hemocitos estimulados con diferentes concentraciones de PMA. PMA 5  $\mu\text{g/ml}$  (a), PMA 10  $\mu\text{g/ml}$  (b). 200 X.

a)



b)

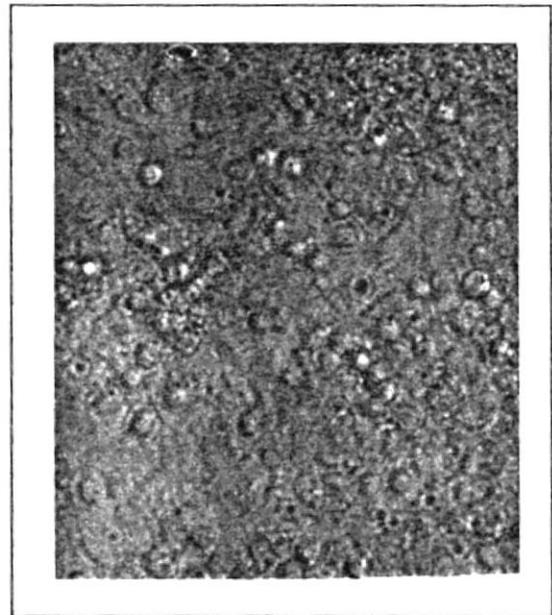


Figura 3.3.6: Efecto de diferentes estimulantes sobre la cantidad de formazán (F) obtenida por reducción  $O_2^-$ . PMA 5  $\mu\text{g/ml}$  (a), laminarina 10  $\text{mg/ml}$  (b). 200 X.

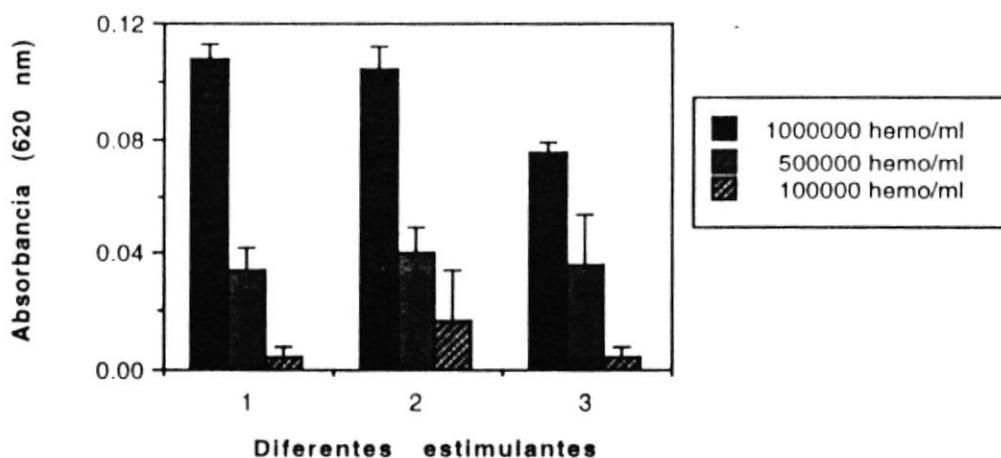


Figura 3.3.7 : Respuesta celular de hemocitos expuestos a tres estimulantes diferentes.

- 1) PMA 10 ug/ml.
- 2) Laminarina 10 ug/ml.
- 3) Zimosán 20 parti/hemo.

Las muestras de hemolinfa son distribuídas (50  $\mu$ l/hoyo) en una placa de microtitulación en tres series de tres hoyos. En cada hoyo se adicionará un volumen igual de MHBSS 2X ( $\text{Ca}^{++}$ 12 mM,  $\text{Mg}^{++}$  26 mM). Se incuba por 30 minutos para permitir la fijación de las células en la microplaca.

Después que las células se han fijado a la placa se elimina el sobrenadante y se adiciona, delicadamente, 50  $\mu$ l de MHBSS (2 X), en todos los hoyos. En la primera serie de 3 hoyos que servirá de control para evaluar la actividad básica de los hemocitos, se añaden 25  $\mu$ l de MHBSS 2 X.

La segunda serie de hoyos servirá para evaluar la respuesta de las células a un estimulante y la tercera serie servirá para determinar el efecto de un inhibidor del choque respiratorio sobre la actividad de las células estimuladas con 25  $\mu$ l de un estimulante (PMA, Laminarina o Zimosán) en MHBSS 2X. En las 2 primeras series (respuesta básica, y respuesta estimulada) se añaden 25  $\mu$ l de MHBSS sin  $\text{Ca}^{++}$  y  $\text{Mg}^{++}$  (MHBSS 0X), mientras que en la tercera serie (respuesta inhibida) se colocan 25  $\mu$ l del inhibidor (Iodoacetamina, NEM) en MHBSS 0 X. En todos los hoyos se colocan 50  $\mu$ l de NBT al 0,24 % en MHBSS 0 X. La concentración final en  $\text{Ca}^{++}$  y  $\text{Mg}^{++}$ , en todos los hoyos será de 6 mM y 13 mM, respectivamente.

Las placas son incubadas a temperatura ambiente, durante 1 - 2 horas (tiempo requerido para la reducción del NBT) en un lugar protegido de la luz debido a que el NBT es fotosensible.

Después de eliminar el sobrenadante de la microplaca, se adiciona 300  $\mu$ l de metanol a cada hoyo para detener la reacción y realizar un primer lavado. Otros dos lavados son realizados con 300  $\mu$ l de metanol al 70 %. Finalmente, la placa es secada

## PROTOCOLO OPTIMIZADO PARA LA CUANTIFICACION DE ANION SUPEROXIDO

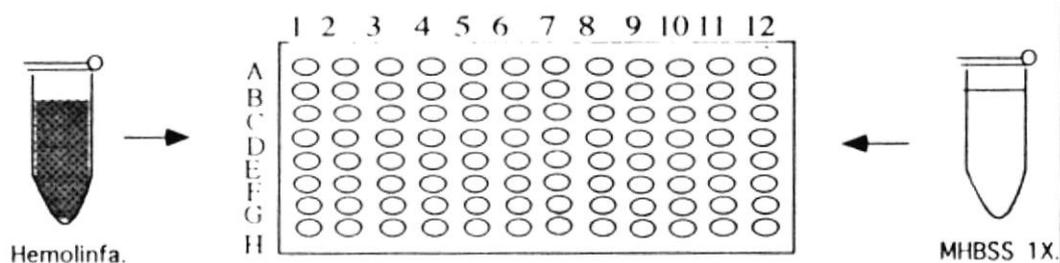
- Extraer de hemolinfa.



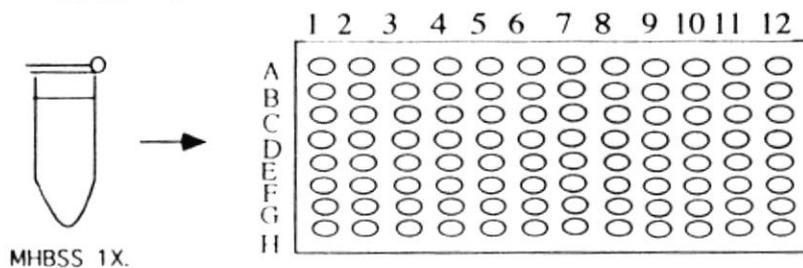
- Determinar la cantidad de hemolinfa obtenida.



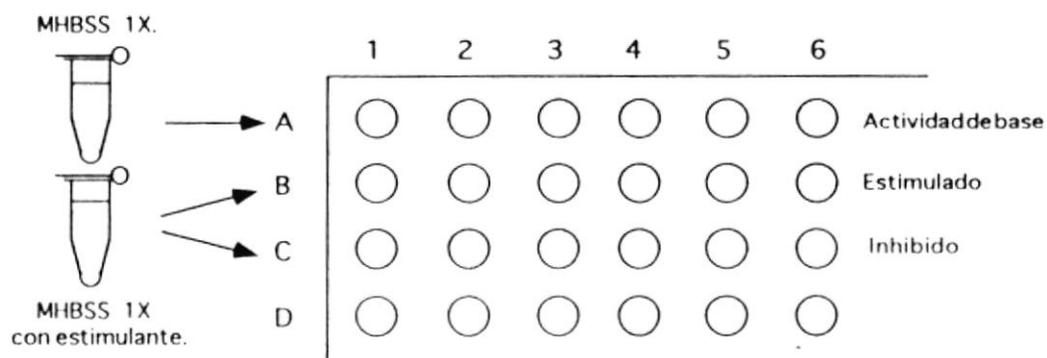
- Distribuir 50 ul de hemolinfa en los hoyos de la microplaca y la adición de 50 ul de MHBSS1X.



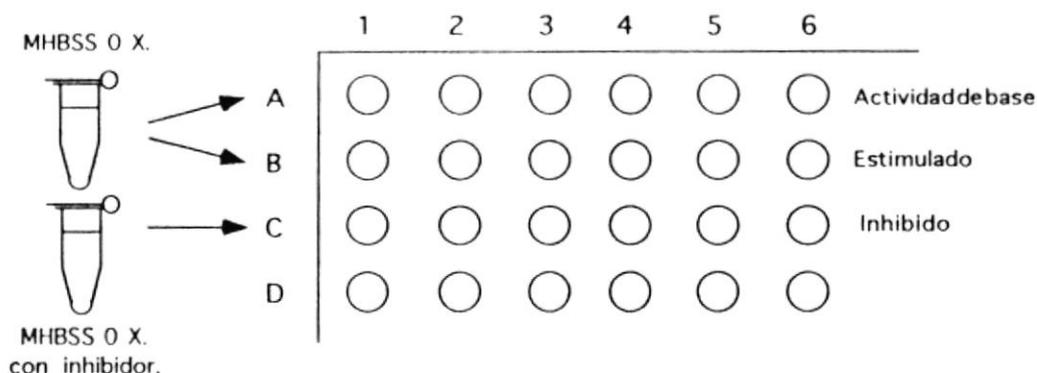
- Eliminar el sobrenadante de todos los hoyos y luego colocar 50 ul de MHBSS 1X.



- Para obtener la estimulación deseada se adicionan 25 ul de las siguientes soluciones en sus respectivos hoyos.



- Para obtener la inhibición deseada se adicionan 25 ul de las siguientes soluciones en sus respectivos hoyos.



- Adición de NBT al 0,24% para revelar la producción de anión superóxido.

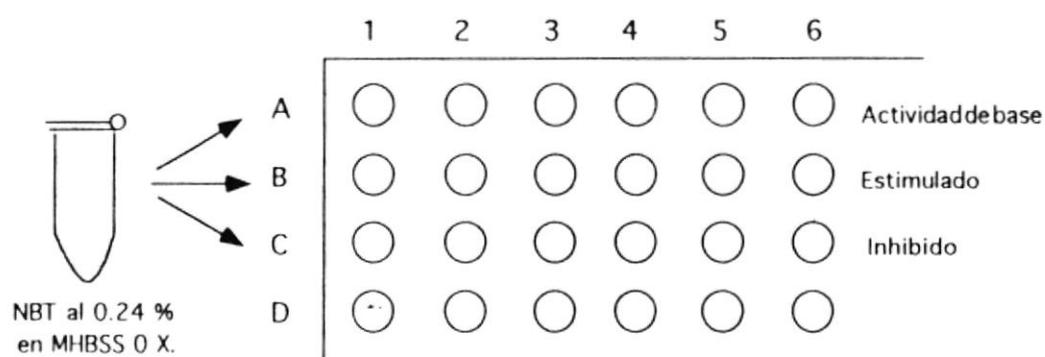


Figura 3.3.8 : Protocolo optimizado para la cuantificación de anión superóxido.

completamente a temperatura ambiente.

La solubilización del formazán intracelular es realizada con 120  $\mu$ l de KOH a 2M y 140  $\mu$ l de DMSO. Se usa una micropipeta a fin de disolver completamente el formazán. La densidad óptica de la placa es medida en un espectrofotómetro de microplacas a 620 nm, que permite cuantificar la cantidad de formazán intracelular obtenido por acción del anión superóxido.

### 3.3.2. Exploración sobre la detección del peróxido de hidrógeno.

Las células fagocitarias en el evento de fagocitosis y del choque respiratorio, producen peróxido de hidrógeno gracias al muy activo sistema enzimático  $O_2^-$ -SOD- $H_2O_2$  (Klein, 1982). Adicionalmente, el peróxido de hidrógeno interviene con otros sistemas enzimáticos dentro del fagosoma, donde funciona como sustrato para la formación de otros radicales tóxicos, como por ejemplo el radical hidroxilo ( $OH^\cdot$ ) y el hipohalógeno ClOH (Babior, 1988).

#### 3.3.2.1. Ensayo de peroxidación del Rojo de fenol.

Una primera serie de ensayos basados en el uso del rojo de fenol fueron realizados para detectar y cuantificar el  $H_2O_2$  resultante de la estimulación de hemocitos en primocultivos.

La estimulación de los hemocitos y la producción de  $H_2O_2$  fue determinada por la oxidación del rojo de fenol (ver materiales y métodos), lo que resulta en un incremento de la absorbancia a 620 nm. Algunas experimentaciones indicaron que minutos después de la estimulación existe diferencia entre las D.O de muestras estimuladas y no estimuladas. Estos resultados sugieren la producción efectiva de  $H_2O_2$ . Sin embargo, este proceso parece disminuir rápidamente, en tanto que la producción de  $H_2O_2$  parece aumentar progresivamente en las muestras de hemocitos no estimulados e inhibidos (Fig. 3.3.9). Estos resultados parecen indicar que la

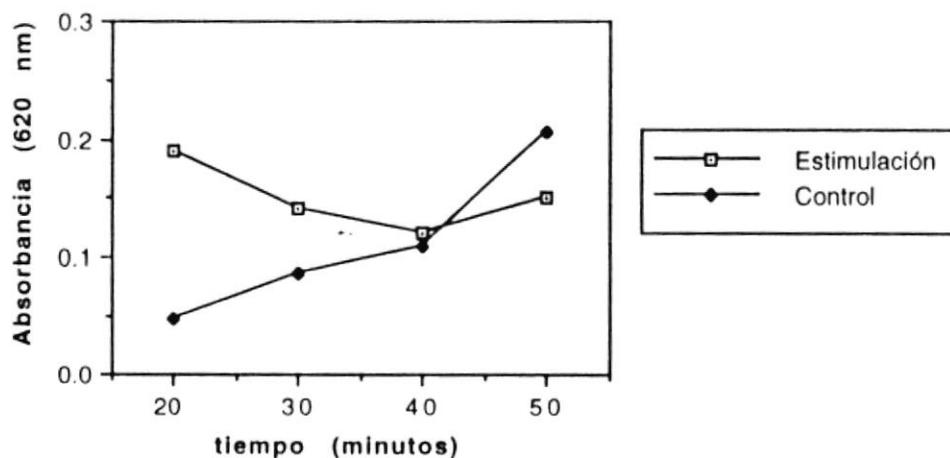


Figura 3.3.9 : Cinética de producción de  $H_2O_2$  a partir de hemocitos estimulados.

producción de  $H_2O_2$ , es un fenómeno transitorio

que se produce minutos después de la estimulación de los hemocitos, con una subsecuente disminución de  $H_2O_2$ . Al contrario, en las muestras utilizadas en el control el proceso de producción de  $H_2O_2$  parece autoinducirse lentamente.

### 3.3.3. Ensayo de quimioluminiscencia.

La quimioluminiscencia dependiente del luminol, permite evaluar la capacidad del sistema MPO/ $H_2O_2$ / $^1O_2$ /haluros de las células fagocitarias (figura 1.3, antecedentes). Por su gran sensibilidad esta técnica es considerada una herramienta muy útil para estimar las respuestas celulares del sistema inmunitario (Francart, 1986).

En *P. vannamei*, se han realizado varios ensayos de quimioluminiscencia basados en el protocolo descrito en materiales y métodos, el mismo que es un derivado del protocolo establecido para los hemocitos de los moluscos (Bachere, 1991).

Se utilizaron diferentes concentraciones de hemocitos, comprendidas entre  $1 \times 10^6$  hasta y  $2 \times 10^5$ . Ninguna de las pruebas realizadas (con diferentes medios de cultivo, diferentes tipos de estimulantes y diferentes concentraciones de células) permitió obtener alguna actividad de quimioluminiscencia.

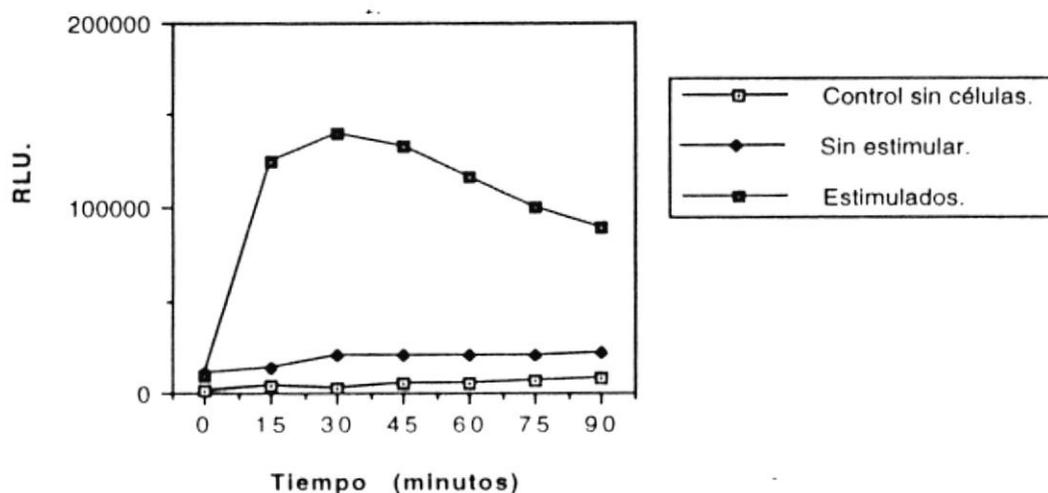


Figura 3.3.10: Ensayo de quimioluminiscencia dependiente del luminol realizado en ostras, utilizando 20 partículas de zimosán por hemocito y 0,1 mM de Luminol.

Se utilizaron diferentes concentraciones de hemocitos, comprendidas entre  $1 \times 10^6$  hasta y  $2 \times 10^5$ . Ninguna de las pruebas realizadas (con diferentes medios de cultivo, diferentes tipos de estimulantes y diferentes concentraciones de células) permitió obtener alguna actividad de quimioluminiscencia.

Para determinar si esta ausencia de señales se debía a fallas en el protocolo se realizó un ensayo comparable con hemocitos de la ostra *Crassostrea gigas*. La estimulación se realizó con 20 partículas de zimosán por hemocito, usando agua de mar (70%) como medio de cultivo. Un patrón

clásico de actividad de quimioluminiscencia puede ser observado en la figura 3.3.10.

Simultáneamente en el laboratorio DRIM, IFREMER, (Francia) , se realizaron las mismas experimentaciones con hemocitos de *P. vannamei*, utilizando un contador de centelleo en lugar de un luminómetro (Bachere y Thibaut, 1995; comunicación personal). Se obtuvo un patrón típico de respuesta de quimioluminiscencia. Se dedujo así que el luminómetro del cual dispone el CENAIM, no es suficientemente sensible para detectar la actividad generada por los hemocitos de *P. vannamei*. Por otra parte, el uso de este luminómetro no es práctico para el diagnóstico, porque no permite una lectura automatizada y repetitiva de las muestras.

## IV PARTE

### 3.4 Implementación de un ensayo para la cuantificación de $\alpha 2$ macroglobulina.

La  $\alpha 2$  macroglobulina es una proteína de la hemolinfa involucrada en la captura y la neutralización de proteasas (ver antecedentes).

Entre los diferentes anticuerpos monoclonales (AcMc) existentes contra la hemolinfa de *P. japonicus*, el AcMc 41B12 es específico de la  $\alpha 2$  macroglobulina, la cual es capaz de reconocer esta proteína en los hemocitos de *P. vannamei* (Rodríguez *et al*, 1995).

La especificidad de dicho anticuerpo fue confirmada realizando una prueba de inmunofluorescencia contra hemocitos de *P. vannamei* (datos no presentados). Los resultados mostraron el marcado a nivel de todos los hemocitos, lo que corrobora, la funcionalidad de los anticuerpos producidos a partir de cultivos del hibridoma 41B12.

Con el fin de establecer un ensayo rápido y cuantitativo de  $\alpha 2$  macroglobulina en la hemolinfa de *P. vannamei*, se inició experimentaciones para desarrollar una prueba inmunoenzimática de tipo ELISA indirecto competitivo (ver materiales y métodos).

El principio de este inmunoensayo reposa sobre un análisis comparativo de las muestras a estudiar, con una prueba estándar.

### 3.4.1. Implementación de una prueba ELISA estándar.

A fin de implementar un ensayo ELISA competitivo indirecto para la  $\alpha 2$  macroglobulina, se desarrolló inicialmente una prueba estándar. La primera etapa de esta prueba consistió en determinar la cantidad óptima de hemolinfa a fijarse en los hoyos para obtener la señal de D.O más alta posible resultante de la reacción con los anticuerpos específicos 41B12. Los resultados mostrados en la figura 3.4.1, indican que la señal más específica corresponde a una dilución 1/8 de la muestra, que en el caso del estándar, corresponde a un pool de varias muestras de hemolinfa. Este pool constituirá la referencia  $\alpha 2$  macroglobulina para todas las experimentaciones.

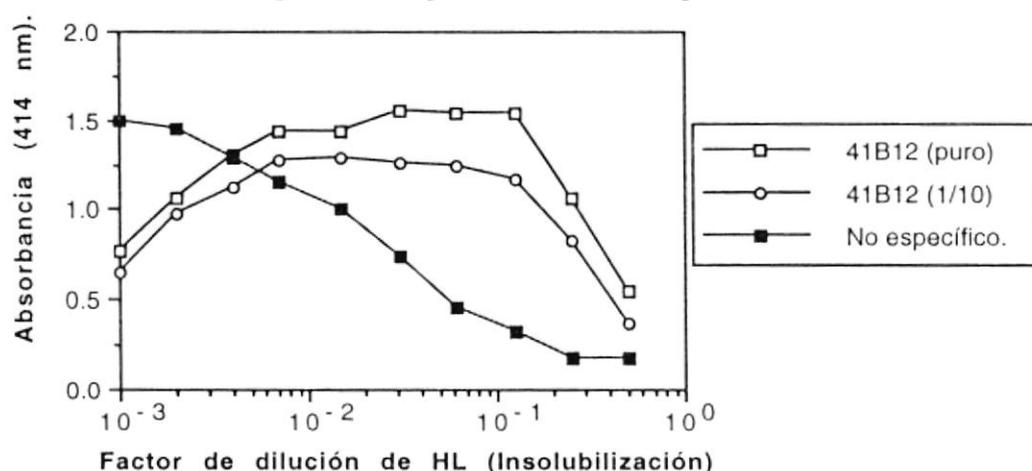


Figura 3.4.1: Estimación de la cantidad de alfa 2 macroglobulina en función de las D.O. obtenidas de una muestra de hemolinfa, mediante un ensayo ELISA indirecto, llevando un control negativo. Lectura a 414 nm, 45 min.

Diferentes soluciones de saturación y de dilución del anticuerpo específico fueron analizadas, considerando la

fijación no específica de un anticuerpo control. Diferentes proteínas y detergentes son clásicamente usadas en solución para cubrir el plástico y evitar que los anticuerpos se fijen de modo no específico a la placa. Como sustancias saturadoras se utilizó plasmion (gelatina hidrolizada) al 20% en PBS (300 mOsm) y leche descremada a diferentes concentraciones (1%, 3%, 5%) en PBS (300 mOsm). En lo que respecta a los anticuerpos, dos soluciones de dilución fueron comparadas: PBS-Tween 20 (0,1%) y PBS-Tween 20 (0,1%)-Leche (0.1%). Los resultados de las figuras 3.4.2 y 3.4.3 indican que todas estas condiciones fueron casi idénticas y muy convenientes, conduciendo a seleccionar arbitrariamente el medio 5 para la saturación y el PBS Tween Leche para la dilución de los anticuerpos.

El ensayo estándar de referencia necesita conocer la cantidad de anticuerpos óptima que permita detectar y cuantificar la presencia de  $\alpha 2$  macroglobulina de una muestra. Así, la cantidad de anticuerpo en el estándar debe corresponder a una D.O. alta pero inferior a la máxima señal obtenida, permitiendo en inmunoensayos ulteriores detectar confiablemente con un cierto margen de error la cantidad de  $\alpha 2$  macroglobulina traducida en una disminución de la señal de D.O.

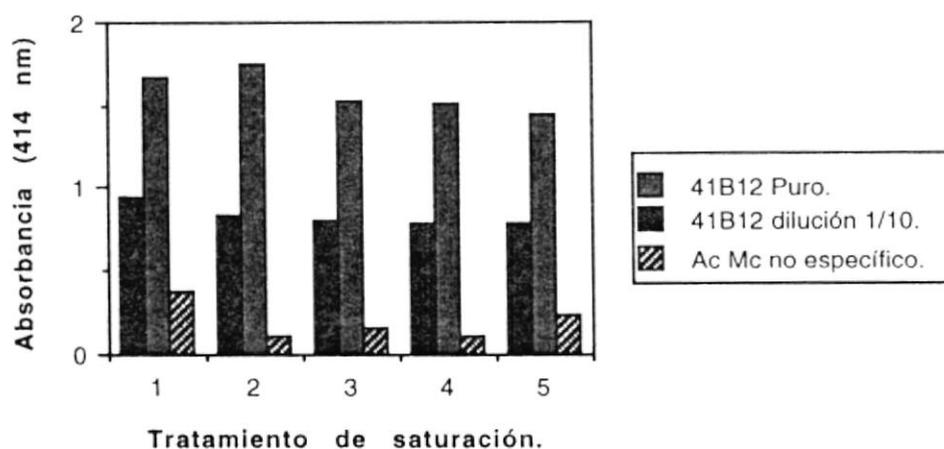


Figura 3.4.2: Señales obtenidas con diferentes sustancias de saturación, mediante un ELISA Indirecto utilizando una solución de anticuerpos 41B12 diluïdos en PBS - Tween 0.1%. Lectura a 414 nm, 45 min.

- 1) Leche 0.5 % en PBS.
- 2) Leche 1.0 % en PBS.
- 3) Leche 3.0 % en PBS.
- 4) Leche 5.0 % en PBS.
- 5) Plasmion 20.0% en PBS.

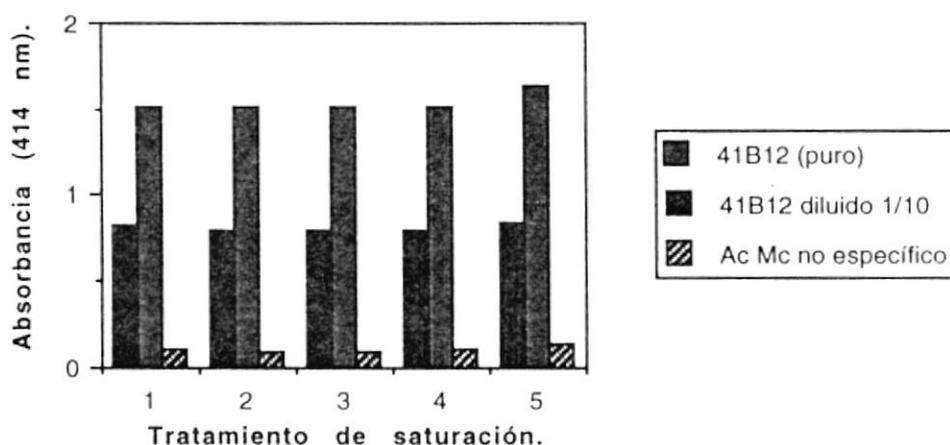


Figura 3.4.3: D.O. obtenidas con diferentes sustancias de saturación, mediante un ELISA Indirecto utilizando una solución de anticuerpos 41B12 diluïdos en PBS - Tween 0,1% - Leche 0.1%. Lectura a 414 nm, 45 min.

- 1) Leche 0.5 % en PBS.
- 2) Leche 1.0 % en PBS.
- 3) Leche 3.0 % en PBS.
- 4) Leche 5.0 % en PBS.
- 5) Plasmion 20% en PBS.

Esta cantidad óptima de anticuerpo fue determinada experimentalmente frente a una cantidad estándar de hemolinfa / $\alpha$  2 macroglobulina fijada sobre la placa (Pool de hemolinfa-anticoagulante diluido 1/8). La figura 3.4.4 indica que, a la dilución 1/20 del sobrenadante de cultivo del hibridoma 41B12, la señal es adecuada para el estándar utilizado. En las siguientes experimentaciones esta concentración de anticuerpos será utilizada como estándar a un volumen de 100  $\mu$ l por hoyo.

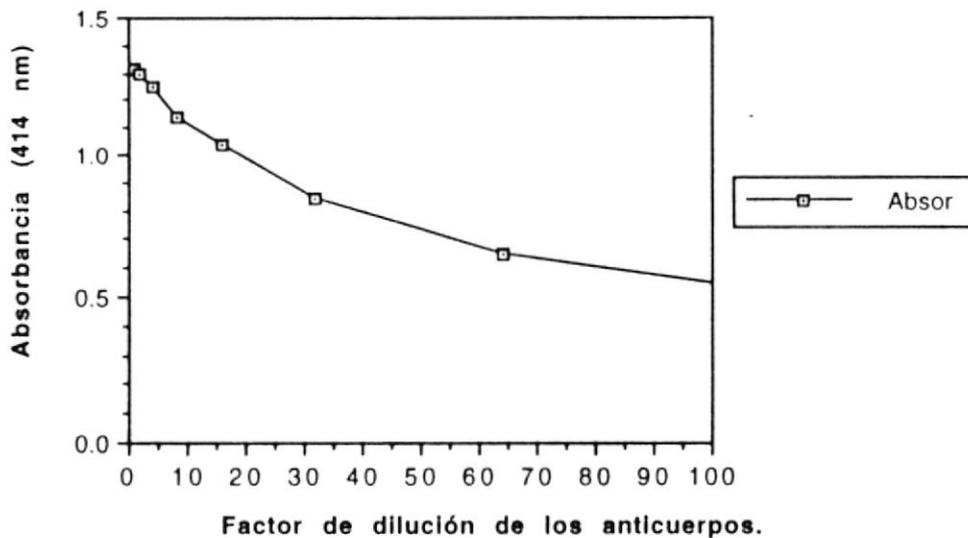


Figura 3.4.4: Estimación de la D.O. en función de la cantidad de anticuerpos, mediante un ensayo Elisa indirecto. Lectura a 414 nm, 45 min.

Una última optimación del ELISA estándar se refiere a la determinación de una curva de referencia que exprese la disminución de intensidad de la señal en relación con la cantidad de  $\alpha 2$  macroglobulina presente en una muestra. Para este fin se realizó un ELISA competitivo con el pool de hemolinfa, mezclando una cantidad estándar de AcMc (diluido 1/20), con diferentes diluciones del pool (1/2, 1/4, ..., 1/512), lo que resulta en la formación de complejos antígeno-anticuerpo en solución y por consiguiente, la disminución de la cantidad de AcMc específicos libres. Esta disminución va a ser traducida por una disminución de la formación de complejos entre los AcMc libres y la  $\alpha 2$  macroglobulina estándar, fijada sobre el plástico de los hoyos de microtitulación. Así se determinó la disminución de la señal en relación con la presencia de  $\alpha 2$  macroglobulina en las diluciones del pool. La disminución del 50% correspondió a una muestra de hemolinfa diluída a 1/30 (Figura 3.4.5 y 3.4.6). Esta muestra diluida a 1/30 (volumen 100  $\mu$ l por hoyo) será utilizada como referencia, ya que produce un 50% de inhibición en los ensayos ELISA indirecto competitivo.

#### 3.4.2 Ensayo ELISA competitivo indirecto.

La inmunodosificación de la  $\alpha 2$  macroglobulina presente en una muestra de hemolinfa se realiza mediante un

ELISA competitivo, mezclando una parte de la muestra de hemolinfa a una dilución de 1/30, con una parte de anticuerpo 41B12 a la dilución estándar. El ELISA se realiza siguiendo las condiciones estándar previamente mencionadas. La disminución de D.O. fue proporcional a la cantidad de  $\alpha 2$  macroglobulina presente en la muestra.

Este tipo de inmunodosaje es llamado ELISA indirecto competitivo debido a que los complejos antígeno-anticuerpo son detectados por un segundo anticuerpo (indirecto) que está marcado con una enzima que transforma un substrato cromogénico (ELISA = Enzyme Linked immuno Sorbent Assay). El término competitivo se refiere a la competencia entre el antígeno de la muestra y el antígeno

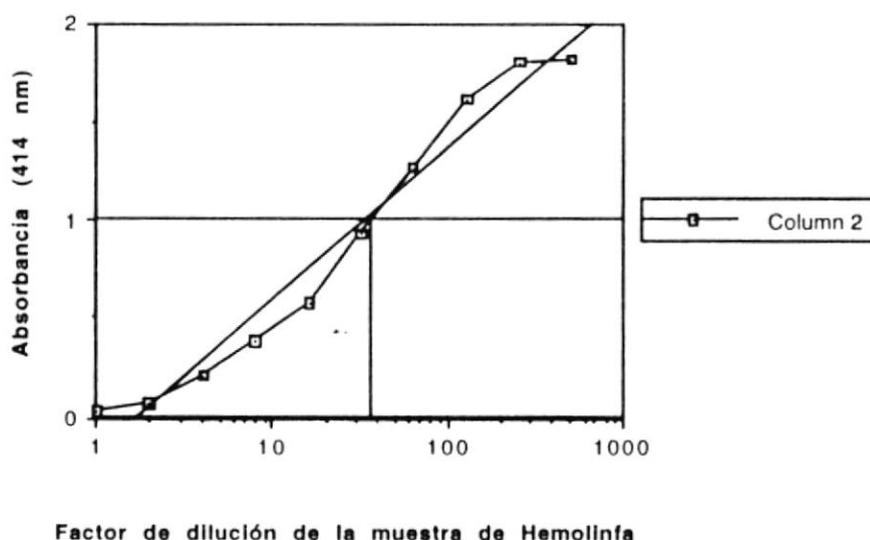


Figura 3.4.5: Curva que relaciona la D.O. contra su correspondiente factor de dilución (escala logarítmica), a partir la cual se obtiene la recta:

$$y = -0,16593 + 0,76473 \cdot \text{LOG}(x) \quad R^2 = 0,967$$

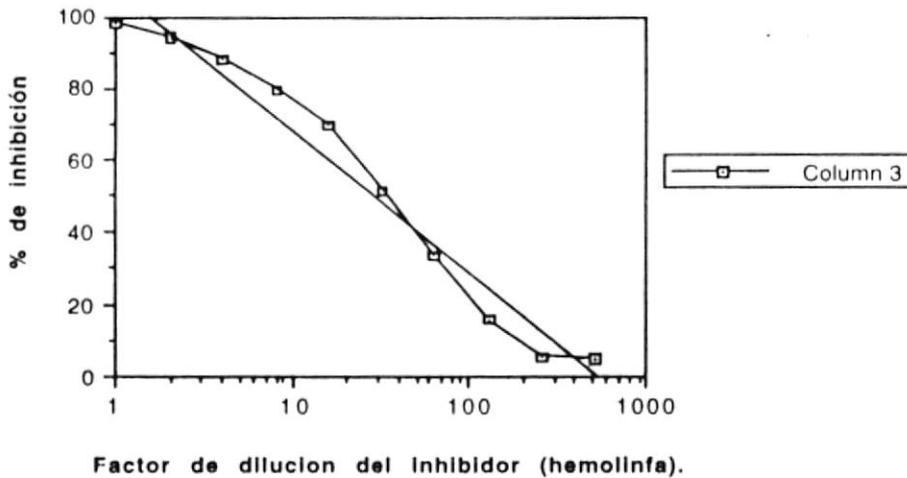


Figura 3.4.6: Curva obtenida a partir de los porcentajes de inhibición contra el factor de dilución de la hemolinfa, a partir de la cual se puede diseñar la recta gobernada por la ecuación:

$$y = 108,15 - 39,915 \cdot \text{LOG}(x) \quad R^2 = 0,966$$

fijado sobre la placa para reaccionar con el anticuerpo.

La evaluación del ensayo ELISA indirecto competitivo fue realizada con un grupo de 10 camarones reproductores. Los resultados de la determinación de la titulación de la  $\alpha 2$  macroglobulina en la muestra de hemolinfa son presentados en la figura 3.4.7. Las densidades ópticas obtenidas para cada muestra mediante el ensayo ELISA indirecto competitivo fueron comparadas con las densidades ópticas obtenidas con la prueba estándar y con la referencia 50% de inhibición (100  $\mu\text{l}$  de anticuerpos diluidos a 1/20 y preincubados con 100  $\mu\text{l}$  de hemolinfa estándar diluidos a 1/30), respectivamente. Un ejemplo demostrativo de la cuantificación de la  $\alpha 2$  macroglobulina mediante el ensayo

ELISA competitivo indirecto se muestra en la figura 3.4.7.

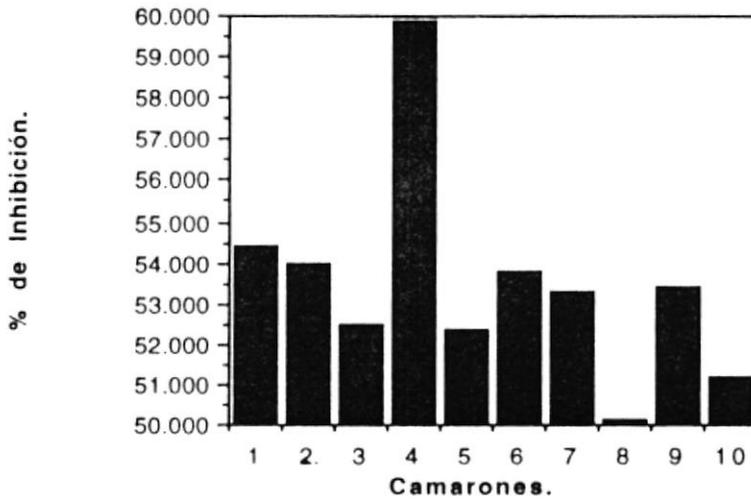


Figura 3.4.7: Porcentajes de inhibición de la alfa 2 macroglobulina, con muestras de hemolinfa de 10 camarones de una población homogénea.

Los valores correspondientes a ensayos para determinar algunos parámetros del ELISA competitivo son presentados en el anexo 4.

## V PARTE.

### 3.5. Evaluación de los ensayos inmunitarios en un análisis de toxicidad con Tilt.

El Tilt es un compuesto utilizado como fungicida por los productores de banano para combatir la "sigatoka", un hongo parásito. Este compuesto sería responsable, solo o conjuntamente con un virus, del "Síndrome de Taura" el mismo que ha causado importantes bajas en producción de camarones en la región del golfo de Guayaquil. Tomando en cuenta estos antecedentes se efectuó una aplicación de dos de los inmunoensayos previamente desarrollados para la evaluación del estado inmunitario del camarón *P. vannamei*, sobre camarones expuestos al pesticida Tilt, a fin de saber si éste estaría involucrado en procesos de inmunodepresión.

Camarones de 12 - 15 gr. fueron obtenidos en la camaronera de Dolores Cobos, ubicada a 1 Km. de Palmar y fueron aclimatados durante 2 semanas en el CENAIM en tanques de 500 litros.

Pasado el tiempo de aclimatación, 3 lotes de 16 camarones fueron inyectados con 1 ppb, 10 ppb, 100 ppb de Tilt, respectivamente, diluidos en 50 µl de agua de mar estéril. Se seleccionó estas cantidades de Tilt en base a reportes sobre los valores de propiconazol encontrados en el hepatopáncreas de camarones en la zona del golfo de Guayaquil durante 1992,

período de grandes mortalidades ocasionadas por el síndrome de Taura (Barniol, *et al* 1994). Se utilizaron dos grupos de 16 animales como control, uno sin el estrés de la inyección y el otro inyectado con agua de mar estéril (50  $\mu$ l). La hemolinfa de los animales fue recuperada 48 horas después de la inyección. Con las muestras extraídas se realizaron hemogramas e inmunodosificaciones de  $\alpha$  2 macroglobulina.

#### 3.5.1. Efecto del fungicida Tilt sobre el número total de hemocitos y subpoblaciones.

En este primer ensayo de evaluación del efecto de los pesticidas sobre el número de hemocitos y la proporción hemocitaria no se encontró diferencia entre los grupos de control y los tratamientos con 1, 10 y 100 ppb de Tilt (figura 3.5.1). Los valores numéricos son presentados en el anexo 4

#### 3.4.2. Efecto del Tilt sobre la presencia de $\alpha$ 2 macroglobulina.

La cantidad de  $\alpha$  2 macroglobulina detectada en las muestras, no fue afectada por la presencia de 1, 10 y 100 ppb de Tilt en relación con el control de animales inyectados con agua mar estéril, pero los animales que no fueron inyectados presentaron mayor cantidad de  $\alpha$  2 macroglobulina (Figura 3.5.2). Los valores numéricos son presentados en el anexo 4.

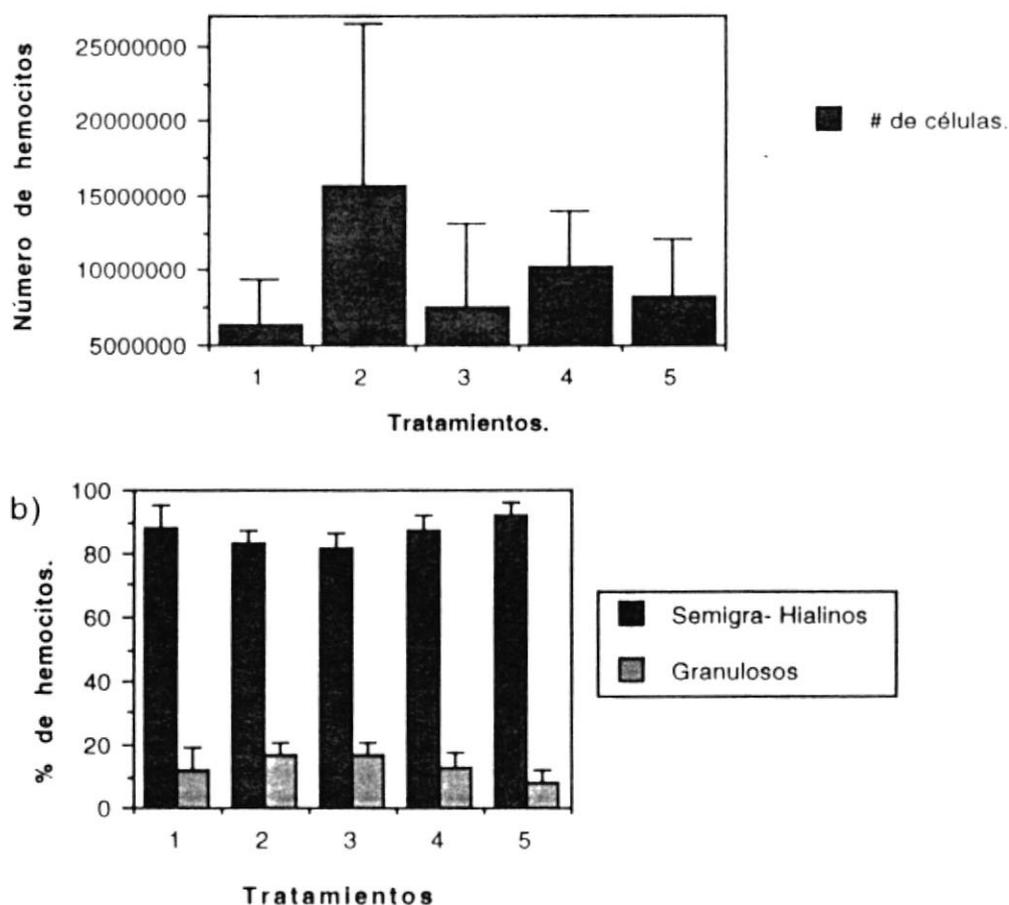


Figura 3.5.1: Efecto de diferentes concentraciones de Tilt, después de 48 horas de ser inyectados, sobre: El número de hemocitos a); La proporción de los diferentes grupos hemocitarios b).

Se llevaron paralelamente un grupo de animales sin inyección y otro grupo inyectados con agua de mar estéril como controles.

- 1) Sin inyectar.
- 2) Inyectados con 1 ppb de Propiconazol.
- 3) Inyectados con 10 ppb de Propiconazol.
- 4) Inyectados con 100 ppb de Propiconazol.
- 5) Inyectados con Agua de mar estéril.

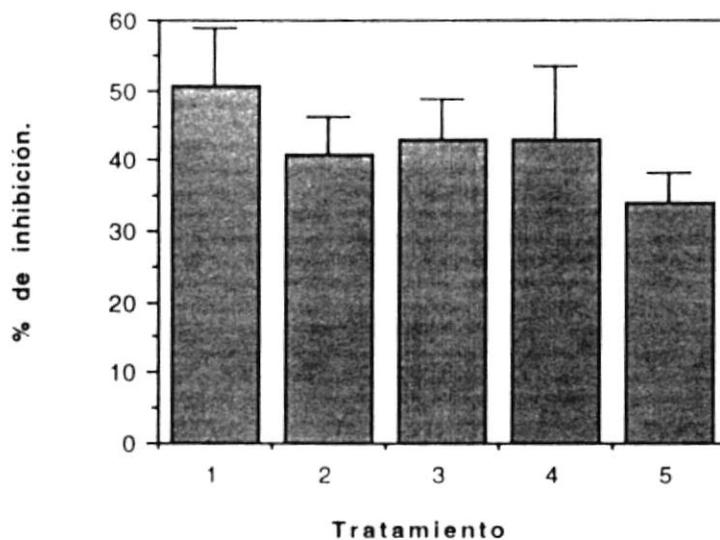


Fig 3.5.2: Efecto de la inyección de diferentes concentraciones de Tilt sobre la cantidad de alfa 2 macroglobulina en animales, 48 horas después de ser inyectados, llevando controles sin inyección e inyectados con agua de mar.

- 1) Sin inyectar.
- 2) 1 ppb de propiconazol.
- 3) 10 ppb de propiconazol.
- 4) 100 ppb de propiconazol.
- 5) Inyectados con agua de mar estéril.

## CONCLUSIONES

La importancia de las enfermedades infecciosas y no infecciosas que afectan los cultivos de camarones constituyen el mayor problema para mantener la productividad de esta actividad acuícola a nivel mundial. A largo plazo el control de enfermedades de camarón debe reposar sobre el cultivo de cepas “domesticadas” y seleccionadas en base a criterios de resistencia a las infecciones. A corto plazo, reactivos y ensayos son necesarios para identificar precozmente patógenos y deficiencias inmunitarias. Tales herramientas de control del estado inmunitario, permitirán prevenir enfermedades.

Las conclusiones del presente trabajo son:

- 1.- El anticoagulante adecuado fue el citrato de sodio al 10 %.
- 2.- Los hemogramas realizados mediante tinciones y microscopía de contraste de fases permiten distinguir los hemocitos granulosos de los hemocitos hialinos y semigranulosos. La microscopía de contraste de fases es el método más práctico e informativo.
- 3.- El medio de cultivo más práctico para la realización de los ensayos de cuantificación del anión superóxido fue el MHBSS.
- 4.- Para la estandarización del ensayo de cuantificación del anión superóxido se decidió trabajar con hemocitos obtenidos a partir de hemolinfa total.
- 5.- Las concentraciones optimas de  $\text{Ca}^{++}$  y  $\text{Mg}^{++}$  que se deben añadir

al MHBSS para la cuantificación del anión superóxido fueron 6 mM de  $\text{Ca}^{++}$  y 13 mM de  $\text{Mg}^{++}$ .

- 6.- El PMA a 5 mg/ml, la laminarina a 10 mg/ml y el zimosán a 20 partículas por hemocito, fueron eficaces estimulantes del choque respiratorio.
- 7.- La técnica de cuantificación óptima de la  $\alpha 2$  macroglobulina requiere de la purificación de los anticuerpos y marcaje con enzimas. En CENAIM no contamos con estas herramientas, por lo que, desarrollamos un protocolo para elaborar el ensayo ELISA competitivo.
- 8.- En el desarrollo del ELISA estándar competitivo fue necesario considerar los siguientes parámetros:
  - Utilizar plasmión al 20% como sustancia para realizar la saturación.
  - Utilizar una dilución 1/8 de hemolinfa para realizar el ELISA indirecto estándar.
  - Utilizar una dilución del sobrenadante del hibridoma 41B12 (1/30) para obtener un 50 % de inhibición de la  $\alpha 2$  macroglobulina en las muestras de hemolinfa a utilizar.
- 9.- La utilización de los hemogramas y la cuantificación de la  $\alpha 2$  macroglobulina no demostró cambios en los criterios inmunológicos cuando camarones ( 15 - 17) fueron inyectados con el fungicida Tilt.

## RECOMENDACIONES

- 1) Realizar la evaluación clínica de los ensayos desarrollados en este trabajo, a fin de determinar sus rangos de variación en diferentes situaciones normales (edad, muda, etc,...) y en situaciones anormales (patologías infecciosas o no infecciosas). Estas evaluaciones clínicas permitirán establecer si cada criterio seleccionado puede constituirse en un indicador del estado inmunitario.
- 2) Optimizar los ensayos en curso de desarrollo (quimioluminiscencia, ELISA directo sandwich, etc,...) y emprender el desarrollo de otros ensayos, con el objetivo de obtener otros indicadores del estado inmunitario (dosificación de la melanización , inmuno-dosificación de otras proteínas de la hemolinfa para las cuales existen anticuerpos monoclonales).
- 3) Los ensayos que tengan valor como indicadores de la condición inmunitaria, deberán ser puestos al servicio del sector camaronero, a través de entrenamientos, centro de diagnóstico, etc.
- 4) Usando los ensayos como herramientas de análisis, experimentar con diversas moléculas y situaciones susceptibles de inducir efectos positivos o negativos, como por ejemplo inmunoestimulantes o contaminantes, respectivamente. Algunas experimentaciones podrían ser realizadas "*in vitro* " en cuanto se obtengan progresos en el cultivo de células de camarón, en particular los hemocitos.

- 5) Utilizar los ensayos en estudios fundamentales de los mecanismos inmunitarios del camarón, como por ejemplo la estimulación de los hemocitos. Estos ensayos podrían ser muy útiles para identificar diversas moléculas involucradas en la respuesta inmunitaria, siendo posible más tarde clonar los genes que codifican para estas proteínas o caracterizar la regulación de su expresión. Bajo este punto de vista será importante considerar la relación entre el sistema inmunitario y el sistema endócrino mediante el estudio de moléculas como los opioides.

# ANEXOS

## ANEXO I

### CARACTERÍSTICAS PRINCIPALES DE PEPTIDOS INDUCIBLES ANTIBACTERIANOS DE INSECTOS Y DE ALGUNOS PEPTIDOS ANTIBACTERIALES DE VERTEBRADOS

NOMBRE	Tamaño (Kda)	Eucariotas, Procariontas y virus	Modo de acción	Estructura tridimensional	Organismos donde se encuentran
Cecropinas					
Cecropinas de insectos	4	Gram - y Gram -	Bactericida, formación de poros iónicos en la membrana	Dos hélices $\alpha$ separados C-terminal aminado	Lepidoptera Dipteros
Cecropinas en mamíferos	4	Gram + y Gram -			
Defensinas					
Defensinas de insectos	4-5	Gram +	Bactericida, posee gran afinidad con fosfolípidos membranares	Bucle terminal Hélice $\alpha$ central Hoja $\beta$ , 3 puentes intramoleculares disulfuro.	Dipteros Hymenopteros Coleopteros Odonata
Peptidos ricos en Prolina					
Diptera					Hymenoptera Diptera Hemiptera

CARACTERISTICAS PRINCIPALES DE PEPTIDOS INDUCIBLES ANTIBACTERIANOS DE INSECTOS Y DE ALGUNOS PEPTIDOS ANTIBACTERIALES DE VERTEBRADOS

NOMBRE	Tamaño (Kda)	Eucariotas, Procariontas y virus	Modo de acción	Estructura tridimensional	Organismos donde se encuentran
Apidaecinas	2	Gram -	Bacteriostatico		
Abaecinas	4	Gram - y Gram -	Bactericida		
Drosocinas	2,5	Gram -	Bactericida	Sustitución O-glycosilada	
Bactenecina	1,5	Gram - y Gram -	Bactericida, activa en la membrana citoplasmatica	Un puente disulfuro, estructura antiparalela	
Bac5 y Bac7	5-7	Gram - y virus	Bactericida o bacteriostatica permeabiliza la membrana interna y externa e inhibe el cambio respiratorio.		
PR 39	4,7	Gram - y Gram -			

PEPTIDOS ANTIBACTERIANOS RICOS EN GLICINA

Atacinas	20	Gram -	Bacteriostatico, activo en la membrana externa		Dipteros Coleopteros
Diptericinas	9	Gram -	Bactericida. A nivel de la membrana	C-terminal aminado	



CARACTERISTICAS PRINCIPALES DE PEPTIDOS INDUCIBLES ANTIBACTERIANOS DE INSECTOS Y DE ALGUNOS PEPTIDOS ANTIBACTERIALES DE VERTEBRADOS

NOMBRE	Tamaño (Kda)	Eucariotas, Procariontas y virus	Modo de acción	Estructura tridimensional	Organismos donde se encuentran
			citoplasmatica	dominante rico en glicina N-terminal dominante rico en prolina O-glycolisado	
Coleoptericinas	8	Gram -	Bactericida	Dominio N-terminal	
Sarcotoxinas II	24	Gram -	Bactericida	C-terminal aminado rico en glicina N-terminal pyroglutamato	
Hymenoptaecinas	10	Gram + y Gram -	Bactericida		
Tachypleginas		Gram - y Gram +		Hoja $\beta$ antiparalela Dos puentes disulfuros	Limulus
Polyphemusin					

## ANEXO 2

### Soluciones de anticoagulantes para la obtención de la hemolinfa.

- Solución modificada de Alsever.

Citrato de sodio	30 mM.
Glucosa	115 mM.
Cloruro de sodio	338 mM.
EDTA	10 mM.
pH 7,2	..

- Solución de citrato de sodio 10%.

Citrato de sodio	340 mM.
pH 7,2	

- Solución salina modificada de Hank's (MHBSS)/Cisteína.

Sales de Hank's 10 X	100 ml.
Agua destilada	900 ml.
Hepes	2,6 gr.
Cloruro de sodio	190 mM.
Cisteína	25 mg/ml.
780 mOsm.	
ajustado a pH 7,2	

- Solución salina modificada de Hank's (MHBSS)/Citrato de sodio 5%.

Sales de Hank's 10 X	50 ml.
Agua destilada	950 ml.

Hepes	2,6 gr.
Cloruro de sodio	85 mM.
Citrato de sodio	170 mM.
Ajustado a pH 7,2	

-Solución salina modificada de Hank's (MHBSS)/Citrato de sodio 5%/  
Cisteína.

Sales de Hank's 10 X	50 ml.
Agua destilada	950 ml.
Hepes	2,6 gr.
Cloruro de sodio	85 mM.
Citrato de sodio	170 mM.
Cisteína	25 mg/ml.
ajustado a pH 7.2	

### ANEXO 3

#### Medios de cultivo para la preparación de primocultivos.

##### -Tampón Fosfato Salino 10 X (PBS, Dulbeco 10X)

CaCl <sub>2</sub>	9 mM.
ClK	26,7 mM.
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	11,5 mM.
MgCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	4,9 mM.
NaCl	1379,0 mM.
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	80,6 mM.

##### - Tampón fosfato salino ( PBS 651 mOsm).

PBS 10X Dulbeco	100,0 ml.
Cloruro de sodio	250,0 mM.
Agua destilada	900,0 ml.

##### - Tampón fosfato salino ( PBS 502 mOsm).

PBS 10X Dulbeco	200,0 ml.
Cloruro de sodio	100,0 mM.
Agua destilada	800,0 ml.

##### -Solución de sales balanceada de Hanks` 10 X.

ClK	50,0 mM.
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3,0 mM.
NaCl	1379,0 mM.

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	80,6 mM.
D-Glucosa	56,0 mM.

- Solución salina modificada de Hank's

Sales de Hank's 10 X	100 ml.
Agua destilada	900 ml.
Hepes	2,6 gr.
Cloruro de sodio	190 mM.

ajustado a pH 7,2

- Solución salina modificada de sales de Hank's 1 X (MHBSS 1X).

Sales de Hank's 10 X	100 ml.
Agua destilada	900 ml.
Hepes	2,6 gr.
Cloruro de sodio	190 mM.
Cloruro de Calcio	12 mM
Cloruro de Magnesio	26 mM

ajustada a pH 7,2

- Solución salina modificada de sales de Hank's 2 X (MHBSS 1X).

Sales de Hank's 10 X	100 ml.
Agua destilada	900 ml.
Hepes	2,6 gr.
Cloruro de sodio	190 mM.
Cloruro de Calcio	24 mM

Cloruro de Magnesio	52 mM
ajustada a pH 7,2	.

- Medio L 15 de Leibovitz.

L 15 (2X)	29,38 gr/l
Hepes	1,3 gr/l
Suero fetal bovino	20 %
720-740 mOsm, ajustado a pH 7,2-7,4	

## Anexo 4.

### TABLAS DE RESULTADOS DE LA CUANTIFICACION DEL ANION SUPEROXIDO.

Cuantificación de la producción de anión superóxido utilizando diferentes medios de cultivo conservando el plasma durante la reacción.

Diferentes medios de cultivo.	PBS 1X	PBS 2X	Agua de mar estéril	MHBSS sin Ca y Mg	MHBSS con Ca y Mg
Act. Básica.	0,114 ± 0,005	0,113 ± 0,018	0,089 ± 0,003	0,102 ± 0,016	0,105±0,019
Estimulados.	0,174 ± 0,024	0,231 ± 0,056	0,178 ± 0,026	0,142 ± 0,006	0,138 ± 0,031
Inhibidos.	0,090 ± 0,020	0,088 ± 0,021	0,080 ± 0,012	0,079 ± 0,015	0,079 ± 0,014

Cuantificación de la producción de anión superóxido utilizando diferentes medios de cultivo sin conservar el plasma durante la reacción.

Diferentes medios de cultivo.	PBS 1X	PBS 2X	Agua de mar estéril	MHBSS sin Ca y Mg	MHBSS con Ca y Mg
Act. Básica.	0,114 ± 0,005	0,113 ± 0,018	0,089 ± 0,003	0,102 ± 0,016	0,105±0,019
Estimulados.	0,174 ± 0,024	0,231 ± 0,056	0,178 ± 0,026	0,142 ± 0,006	0,138 ± 0,031
Inhibidos.	0,090 ± 0,020	0,088 ± 0,021	0,080 ± 0,012	0,079 ± 0,015	0,079 ± 0,014

**Efecto de diferentes concentraciones de Ca<sup>++</sup> y Mg<sup>++</sup> sobre la producción de anión superóxido en hemocitos de *P. vannamei*.**

Milimoles de Calcio y Magnesio.	3 Ca y 6,5 Mg	4,8 Ca y 10,4 Mg	6 Ca y 13 Mg	7,8 Ca y 16,9 Mg	9 Ca y 19,5 Mg	10,8 y 23,4 Mg
Act. Básica.	0,114 ± 0,005	0,113 ± 0,018	0,089 ± 0,003	0,102 ± 0,016	0,105±0,019	Coagula.
Estimulados.	0,174 ± 0,024	0,231 ± 0,056	0,178 ± 0,026	0,142 ± 0,006	0,138 ± 0,031	Coagula.
Inhibidos.	0,090 ± 0,020	0,088 ± 0,021	0,080 ± 0,012	0,079 ± 0,015	0,079 ± 0,014	Coagula.

**Efecto del número de hemocitos sobre la producción de anión superóxido, utilizando tres estimulantes del choque respiratorio.**

	PMA : 10 µg/ml.	Laminarina : 10 mg/ml	Zimosán: 20 par/hem.
1 x 10 <sup>6</sup> .	0,143±0,005	0.139±0,013	0,110±0,004
5 x 10 <sup>5</sup> .	0,069±0,008	0,075±0.009	0,072±0,002
1 x 10 <sup>5</sup>	0,041±0,004	0,057±0,017	0,043±0,004
Actividad básica (1 x 10 <sup>6</sup> )	0,097±0,012	0,097±0,012	0,097±0,012
Inhibido (1 x 10 <sup>6</sup> )	0,048±0,012	0,056±0,002	0,048±0,002

**Porcentaje de inhibición de la a 2 macroglobulina de las muestras de hemolinfa de 10 camarones.**

Camaron	Porcentaje de inhibición
1	54,400
2	54,000
3	52,500
4	60,000
5	52,500
6	54,000
7	53,500
8	50,100
9	53,400
10	51,200

**Estimación de la  $\alpha$  2 macroglobulina en función de las D.O., obtenidas de una muestra de hemolinfa**

Dilución de la hemolinfa	D.O con Ac Mc 41B12 Puro	D.O. con AcMc 41B12 diluido 1/10	D.O con AC Mc no específico
2	0,543	0,363	0,171
4	1,074	0,832	0,177
8	1,547	1,177	0,328
16	1,534	1,249	0,457
32	1,553	1,264	0,748
64	1,433	1,282	1,002
128	1,438	1,272	1,159
256	1,297	1,13	1,296
512	1,074	0,971	1,45
1024	0,775	0,657	1,491

**Hemograma realizado con las muestras de hemolinfa de los bioensayos de toxicidad utilizando Tilt.**

Tratamiento	Número de hemocitos
Sin inyectar	6412914±2943476
1ppb	15607525±10864571
10ppb	7493736±5587745
100ppb	10309368±3610891
Inyectados	8161491±3954897

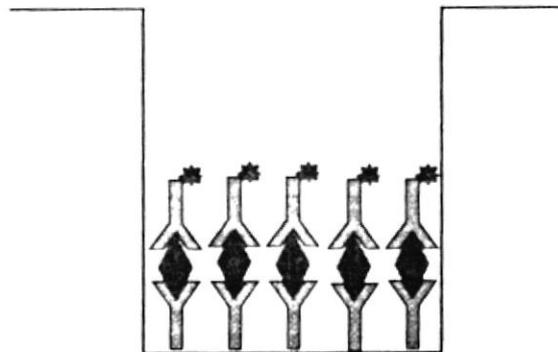
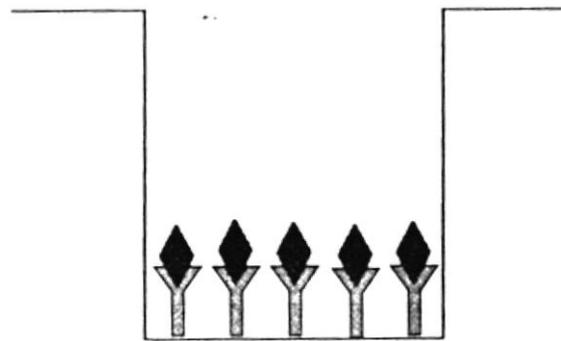
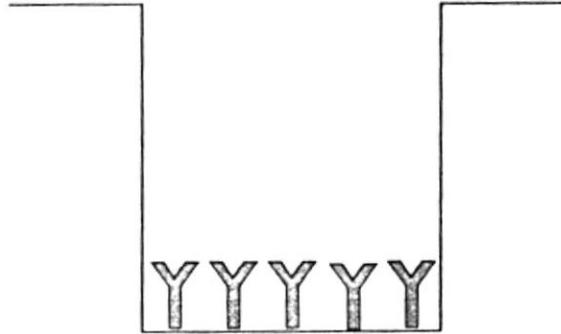
Tratamientos	Hialinos-Semigranulosos	Granulosos
Sin inyectar	88±7	12±7
1ppb	83±4	17±4
10 ppb	82±4	18±4
100 ppb	87±5	13±5
Inyectados	92±4	8±4

**Porcentaje de inhibición de la  $\alpha$  2 macroglobulina de las muestras de hemolinfa del bioensayo de toxicidad utilizando Tilt**

Tratamiento	Porcentaje de inhibición
Sin inyectar	50,582 $\pm$ 8.14
1ppb	40,700 $\pm$ 5.43
10ppb	43,075 $\pm$ 5,74
100ppb	43,002 $\pm$ 10,63
Inyectados	34,35 $\pm$ 4,43

## Anexo 5

Principio del ensayo elisa sandwich.



## BIBLIOGRAFIA

1. Amirante G.A., 1986. Cellular immunoresponses in crustaceans. In: Gupta, A.P. (Editor) Hemocytic and Humoral Immunity in Artropods. Jhon Wiley and Sons, Inc., Chichester: 61-77.
2. Amstrong P. B. and Quigley J. P., 1991.  $\alpha$  2 macroglobulin: a recently discovered defense system in Arthropods In "Immunology of insectes and other Arthropods", Gupta A. P. (ed). CRC Press, Boca Raton Ann Arbor London.
3. Anderson R.S., 1994. Hemocyte derived reactive oxigen intermediate production in four bivalve mollusks. *Developmental and Comparative Immunology*, 18 (2): 89-96.
4. Babior B.M., 1984. Oxidants from phagocytes: agents of defence and destruction. *Blood*, 64, 959 - 966.
5. Bachère E., Chagot D. and Grizel H., 1988. Separation of *Cassostrea gigas* hemocytes by density gradient centrifugation and counterflow elutriation. *Dev. and Com. In.*, 12: 549-559.
6. Bachere E., Noel D. and Mialhe E., 1991. Effects of environmental pollutants and chemotherapeutic agents on the chemiluminescence of hemocytes from the oyster *Cassostrea gigas*. E.A.S. Dublin, Irland, 10 - 12 June 1995.
7. Bachere E., Mialhe E., Noël D., Boulo V., Morvan A. and

- Rodriguez J., 1995. Knowledge and research prospects in marine mollusc and crustacean immunology. *Aquaculture*, 132: 17-32.
8. Baggiolini M. and Dewald B., 1988. Cellular models for the detection and evaluation of drugs that modulate human phagocyte activity. *Experientia*, 44: 841-848.
  9. Barniol R., Castaño A., Delfini A., Escobar G., Olsen A., Sterm S., Tabrah J., Villalón J., 1994. Documentation of investigate process relative to the Taura Syndrome. Informe del comité técnico de la Camara Nacional de Acuicultura. Capítulo 3, pp. 5-7.
  10. Barret A. J. and Starkey, P.M., 1973. The interaction of a 2 macroglobulin with proteinases. Characteristics and specificity of the reaction, and a hypothesis concerning its molecular mechanism. *Biochem. J.* 133, 709-724.
  11. Boulo V., Cadoret J.P., Le Marrec F., Dorange G., Mialhe E., 1995. Transient expression of luciferase reporter gene after lipofection in oyster (*Cassostrea gigas*) primary cell culture. En preparación.
  12. Bruner-Lorand J., Urayama T and Lorand L., 1966. Transglutaminase as blood clotting enzyme. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 23 : 828-834.
  13. Chadwick J. S. and Dunphy G.B., 1986. Antibacterial and

- antiviral factors in arthropod hemolymph. In: Gupta, A.P. (Editor) Hemocytic and Humoral Immunity in Artropods. Jhon Wiley and Sons, Inc., Chichester: 61-77.
14. Chisholm J.R. and Smith V.J., 1994. Variation of antibacterial activity in the haemocytes of the sore crab, *Carcinus maenas*, with temperature. *Journal of Marine Biological Assays UK*, 74: 979-982.
  15. Chisholm J.R. and Smith V.J., 1995. Comparison of antibacterial activity in the hemocytes of different crustacean species. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 110A (1): 39-45.
  16. Durliat M. and Vranckx R., 1976. Coagulation in the crayfish, *Astacus leptodactylus*: attempts to identify a fibrinogen-like factor in the hemolymph. *Biol Bull.*, 151 : 467-477.
  17. Durliat M. and Vranckx R., 1981 Action of various anticoagulants on hemolyphs of lobsters and spiny lobsters. *Biol Bull.*, 160 : 55-68.
  18. Francart M., 1986. La luminescence: un novel élan grâce à une meilleure purification des réactifs. *Spectra Biologie*. N° 116. Vol 14, pp. 59-65.
  19. Hall. M., 1992. Properties of an invertebrate  $\alpha$  2 macroglobuline-like proteinase inhibitor. *Acta Universitatis Upsaliensis Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations*

from the faculty of Science, pp 387.

20. Harpel. P. C. , Hayes M. B., Hugli T. E., 1977. Heat induced fragmentation of human  $\alpha$  2 macroglobulin.
21. Hengenhahn H. G., Hall M. and Söderhäll K., 1988. Purification and characterization of an  $\alpha$  2 macroglobulin-like proteinase inhibitor from plasma of the crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *Biochem. J.*, 255 : 801-806.
22. Hoffman J.A., Dimarcq J.M. and Bulet P., 1992. Les peptides antibactériens inductibles des insectes. *Médecine/Sciences*, 8 : 432-439.
23. Hose J.E. and Martin G.G., 1989, Defense functions of granulocytes in the ridgeback prawn *Sicyonia ingentis*. *J . Inverteb. Pathol.*, 53 :335-346.
24. Hose J.E., Martin G.G., Nguyen V.A., Lucas J. & Rosestein T., 1987. Cytochemical features of shrimp hemocytes. *Biology Bulletin*, 173: 178-187.
25. Johansson M.W. and Söderhäll K., 1989. Cellular immunity in crustaceans and the proPO system. *Parasitology Today*, 5: 171-176.
26. Johnson P.T., 1987. A review of fixed phagocytic and Pinocytotic cells of decapod crustaceans, with remarks on hemocytes. *Developmental and comparative immunology*, Vol. 11. pp. 679-704.

27. Jomori T., Kubo T., and Natori S., 1990. Purification and characterization of lipopolisaccharide-binding protein from hemolymph of American cockroach *Periplaneta americana*. *Europ. J Biochem.*, 190: 201-206.
28. Kabbur M.B., Jain N.C., Zinkl J. G., Farver T. B., 1991. Heterogeneity in phagocytic and nitroblue tetrazolium reductive properties of neutrophils from cows. *American Journal of Veterinary Research*, Vol 52, No 12, pp. 2023-2928.
29. Klebanoff S.J., 1982. Oxygen-dependent cytotoxic mechanisms of phagocytes. In: J.I. Gallin and A. S. Fauci (editors), *Advances in host defence mechanisms*. 1. Raven Press, New York.
30. Klein J, 1982. *Immunology : The science of self-nonsel self discrimination*, A Wiley-Interscience Publication John Wiley & Sons, pp. 424-428.
31. Kobayashi M., Johansson M. W. and Söderhäll K., 1990. The 76 kD cell-adhesion factor from crayfish haemocytes promotes encapsulation in vitro. *Cell Tissue Res* (1990) 260: 13-18.
32. Kopacek P., Hall M., and Söderhäll K., 1993. Characterization of a clotting protein, isolated from plasma of the freshwater crayfish *Pacifistacus leniusculus*. *Eur, J., Biochem.*, 213 : 591-597.
33. Kuo. M.J. and Alexander M., 1967. Inhibition of the lysis of

- fungi by melanins. *J. Bacteriol.*, 94 : 624-629.
34. La Peyere J.F. and Chu F.L., 1990. Blue crab hemocytes: a preliminary study. In: "Pathology in marine science, F. Perkins and T.C. Cheng (eds). Proceedings of the 3rd Int. Coll. on Pathology in marine aquaculture, Gloucester Point, Virginia (USA), 2-6 October 1988. Academic Press, San Diego, 533-538.
  35. Liszewski M. K. and Atkinson., 1990. The complement system. *Fundamental immunology*. Third edition, edited by William E. Paul. Raven Press, Ltd., New York 1993. Chapter 26, pp. 917-939.
  36. Martin G.G. and Gaves B.L., 1985. Fine structure and classification of shrimp hemocytes. *Journal of Morphology*, 185: 339-348.
  37. Mitaya T., Tokunaga F., Yoneya T., Yoshikawa. K., Iwanaga S., Niwa M., Takao T. and Shimonishi Y., 1989. Antimicrobial peptides isolated from horseshoe crab hemocytes, tachyplestin II, and polyphemusins I and II: chemical structures and biological activity. *J. Biochem.*, 106: 663-668.
  38. Müller F., Rollag H. and Frøland S., 1989. Nitroblue tetrazolium reduction in monocytes and monocyte-derived macrophages. *Apmis* 97 : 490-496.
  39. Nakamura T., Furunaka H., Mitaya T., Tokunaga F., Muta T., Iwanaga S., Niwa M., Takao T., and Shimonishi Y., 1988.

Tachyplesin, a class of antimicrobial peptide from the hemocytes of horseshoe crab (*Tachypleus tridentatus*). J. Biol. Chem., 263 : 16709-16713.

40. Nappi A. J., 1977. Comparative ultrastructural studies of cellular immune reactions and tumorigenesis in *Drosophila*, pp. 155-188. In L. A. Bulla, Jr., and T. C. Cheng (eds). Comparative Pathology, vol, 3. Plenum Press, New York.
41. Omori S.A., Martin G.G. and Hose J.E., 1989. Morphology, hemocyte lysis and clotting in the ridgeback prawn, *Squilla ingentis*. Cell Tissue Research, 255: 117-123.
42. Panyutich A. and Ganz T., 1991. Activated  $\alpha 2$  - macroglobulin is a principal defensin-binding protein. American Journal of Respiratory Cellular and Molecular Biology, 5: 101-106.
43. Pick E. and Keisari Y., 1980. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. Journal of Immunological Methods. 38: 161-170.
44. Pipe R.K., 1992. Generation of reactive oxygen metabolites by the hemocytes of the mussel *Mytilus edulis*. Developmental and Comparative Immunology, 16: 111-122.
45. Pipe R.K., Coles J.A. and Farley S.R., 1995. Assays for measuring immune response in the mussel *Mytilus edulis*. Techniques in Fish Immunology 4.

46. Poinar G. O., Hess R. T. and Petersen J.J., 1979. Immune responses of mosquitoes against *R. culiensifax* (Nematoda). *J. Nematol.* 11 :110-116.
47. Prescott L., Harley J. and Klein D. Microbiology, Second Edition. WCB Publisher, 1993. pp. 259 - 284.
48. Ratanapo S. and Chulavatnatol., 1990. Monodin, a neu sialic acid-specific lectin from black tiger prawn (*Pennaeus monodon*). *Comp. Biochem Physiol.*, 97 B : 515-520.
49. Rodríguez J., 1994. Contribution a l'etude du systeme immunitaire de la crevette peneide *Penaeus japonicus* (Crustacea-Decapoda). These Doctorale. Université Blaise Pascal, Avril, 1994.
50. Rodríguez J., Voulo V., Mialhe E. and Bachere E., 1995. Characterization of shrimp hemocytes and plasma components by monoclonal antibodies. *Journal of Cellular Science*, 108: 1043-1050.
51. Rodwley. A. F., Brookman J.L. and Ratcliffe N. A., 1990. Possible involvement of the prophenoloxidase system of the locust, *Locusta migratoria*, in antimicrobial activity. *J. Inverteb. Pathol.*, 52 : 459-470.
52. Salt G., 1963. The defense reactions of insects of metazoan parasites. *Parasitology* 53 : 527-642.
53. Saint Leger R. J., Cooper R. M. and Charnely A. K., 1988.

- The effect of melanization of *Manduca sexta* cuticle on growth and infection by *Metarhizium anisopliae*. J. Inverteb. Pathol., 52 : 459-470.
54. Smith V. J. and Söderhäll K., 1983 a. Separation of the hemocyte populations of *Carcinus maenas* and other marine decapods and prophenoloxidase distribution. Developmental and Comparative Immunology, 7: 229-239.
  55. Smith V. J. and Söderhäll K., 1983 b.  $\beta$  1-3 glucan activation of crustacean hemocytes in vitro and in vivo. Biol. Ass. 104: 209-214.
  56. Smith V. J. and Chisholm J. R., 1992. Non-cellular immunity in crustaceans. Fish and Shellfish Immunology, 2: 1-31.
  57. Söderhäll K. and Ajaxon R., 1982. Effect of quinones and melanin on mycelial growth of *Aphanomyces* spp. and extracellular protease of *Aphanomyces astaci*, a parasite on crayfish. J. Inverteb. Pathol., 39 : 105-109.
  58. Söderhäll K, 1982. Prophenoloxidase activating system and melanization. A recognition mechanism of arthropods. A review. Dev. Comp. Immunol., 6 : 601-611.
  59. Söderhäll K. and Smith J. V., 1983. Separation of the Haemocyte populations of *Carcinus maenas* and other marine decapods, and prophenoloxidase distribution. Developmental and comparative immunology, Vol. 7, pp. 229-239.

60. Söderhäll K. and Hall L., 1984. Lippolysaccharide induce activation of prophenoloxidase activating system in crayfish haemocite lysate. *Biochimica et Biophysica Acta*, 797 pp. 99-104.
61. Söderhäll K. and Smith J. V., 1986. The prophenoloxidase activating system the biochemistry of its activation and role in arthropod cellular immunity, with special reference to crustaceans. In: "Immunity in invertebrates", M. Bréhelin (ed), Springer, Berlin. 208-223
62. Söderhäll K. and Cerenius L., 1992. Crustacean immunity. *Annual Review of Fish Diseases*: 3-23.
63. 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 (3): 201-209.
64. Sottrup-Jensen L., Borth. W., Hall. M., Quigley J. P. and Amstrong. P.B., 1990. Sequence similarity between  $\alpha$  2 macroglobulin from the horseshore crab, *Limulus polyphemus*, and proteins of the  $\alpha$  2 macroglobulin family from mammals. *Comp. Biochem. Physiol.*, 96B : 621-625.
65. Tröwquist P. O., Johansson M. W. and Söderhäll K., 1994. Opsonic activity of cell adhesion proteins and  $\beta$ -1,3-Glucan binding proteins from two crustaceans. *Developmental and Comparative immunology*, Vol. 18, N° 1, pp. 3-12.

66. Tsing A., 1987. Reserches sur les hèmocytes el l'immunité chez le crustacé *Penaeus japonicus* (Bate 1991). Thèse de Doctorat de l'Université des Sciences et techniques du Languedoc, option Sciences biologiques "Immunologie et Hématologie", Montpellier, pp. 350.
67. Tsing A., Arcier J. M. and Brehelin M., 1989. Hemocytes of penaeid and palaemonid shrimps morphology, cytochemistry and hemograms. *Journal of Invertebrate Pathology*, 53 : 64-77.
68. Van Noorden, C.J.F. and Butcher R.G. (1989). Hemocytes of penaeid and palaemonid shrimps morphology , cytochemistry and hemograms. *Journal of Invertebrate Pathology*, 53: 64-77.
69. Vargas Albores F., Guzmán M.A. and Ochoa J.L., 1993. An anticoagulant solution for haemolymph collection and prophenoloxidase sutides of penaeid shrimp (*Penaeus californiensis* ) *Comp. Biochem. Physiol.*, 106A : 299-303.