

## Respuesta inmunomoduladora de la superóxido dismutasa en juveniles de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) expuestos a inmunoestimulantes

### Immunomodulatory response of superoxide dismutase in juvenile American white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) exposed to immunostimulants

A.I. Campa-Córdova<sup>1</sup>  
 N.Y. Hernández-Saavedra<sup>1</sup>  
 G. Aguirre-Guzmán<sup>2</sup>  
 F. Ascencio<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste  
 Unidad de Patología Marina  
 La Paz, Baja California Sur, México  
 \* E-mail: ascencio@cibnor.mx

<sup>2</sup> Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia  
 Universidad Autónoma de Tamaulipas  
 Cd. Victoria, Tamaulipas, México

Recibido en junio de 2004; aceptado en junio de 2005

#### Resumen

Se estudió la actividad inmunomoduladora de la manganeso superóxido dismutasa (MnSOD) en juveniles de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) expuestos a diferentes inmunoestimulantes. Organismos cuyo peso varió entre 0.7 y 1.0 g fueron inmersos durante 6 h en soluciones de  $\beta$ -glucano, lipopolisacárido (LPS), fucoidán, y *Vibrio penaeicida* muerto por calor. Se determinó la actividad enzimática de la MnSOD en los organismos para evaluar si los diferentes inmunoestimulantes utilizados eran capaces de inducir actividad antioxidante. Los inmunoestimulantes probados activaron el sistema inmune de los camarones, mostrando un incremento generalizado en la respuesta antioxidante 48 h después del ensayo. El mayor incremento en la actividad de la enzima (3.2 veces superior al grupo control) se registró cuando se utilizó la bacterina. Se expusieron los camarones a *V. penaeicida* 10 días después de la exposición a los inmunoestimulantes, obteniendo un incremento en la actividad antioxidante de los camarones expuestos previamente a  $\beta$ -glucano, LPS y fucoidán. La respuesta enzimática más alta se obtuvo con los organismos estimulados con  $\beta$ -glucano (2.5 veces superior al control). Este estudio demostró la capacidad de los juveniles de camarón para mejorar la respuesta antioxidante después de ser expuestos a inmunoestimulantes y a una bacteria patógena.

*Palabras clave:* inmunoestimulantes, *Litopenaeus vannamei*, SOD, LPS,  $\beta$ -glucano.

#### Abstract

Immunomodulatory action of manganese superoxide dismutase (Mn-SOD) in juvenile American white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) was studied. Shrimp between 0.7 and 1.0 g were immersed in aerated  $\beta$ -glucan, lipopolysaccharide (LPS), fucoidan, and heat-killed *Vibrio penaeicida* solutions for 6 h. The enzymatic activity of Mn-SOD in entire organisms was investigated to evaluate whether different immunostimulants were able to induce antioxidant activity. The immunostimulants tested activated the immune system in juvenile shrimp and the highest antioxidant response was observed 48 h after the challenge with  $\beta$ -glucan, LPS, fucoidan and heat-killed *V. penaeicida*. The bacterin caused 3.2 times more Mn-SOD activity than the control group. Immunostimulated shrimp were challenged with live *V. penaeicida* on the tenth day and a second antioxidant response was observed 48 h after exposure to live pathogenic bacteria. Immunostimulated shrimp with  $\beta$ -glucan showed the highest Mn-SOD response (2.5 times more than the control group). This study showed the capacity of juvenile shrimp to enhance antioxidant response during a challenge with pathogenic bacteria after exposure to immunostimulants.

*Key words:* immunostimulants, *Litopenaeus vannamei*, SOD, LPS,  $\beta$ -glucan.

#### Introducción

La necesidad de utilizar métodos alternativos para la regulación de bacterias patógenas en los tanques de cultivo ha

#### Introduction

The need for alternative methods to regulate pathogenic bacteria has led researchers to turn to treatment methods using

llevado a los investigadores a utilizar tratamientos con probióticos e inmunoestimulantes (Scholz *et al.*, 1999). Los inmunoestimulantes ayudan al mejoramiento de los mecanismos de defensa no específicos en animales, incluyendo el camarón (Song y Sung, 1990).

Cuando una partícula extraña logra pasar al interior de un organismo y es reconocida por el mismo, esta partícula es fagocitada. Durante el proceso de fagocitosis se producen sustancias oxidantes bactericidas que actúan en contra del intruso, pero estas sustancias denominadas especies reactivas de oxígeno (ROS) pueden dañar también a las células del hospedero. La eliminación rápida y efectiva de las ROS es esencial para mantener el estado de salud y la supervivencia de los organismos. Por tal motivo, los organismos han desarrollado defensas antioxidantes, incluyendo mecanismos enzimáticos y no enzimáticos. Las defensas enzimáticas antioxidantes incluyen ascorbato peroxidasa, glutatión reductasa, catalasa y peroxidasa, las cuales eliminan eficientemente el peróxido de hidrógeno de las células. Por otro lado, la superóxido dismutasa (SOD) posee la capacidad de dismutar el anión superóxido (Homblad y Söderhäll, 1999) generando como resultado agua y peróxido de hidrógeno. Las superóxido dismutasas se han clasificado dentro de tres grupos mayores, dependiendo del ión metálico que contengan. La Mn-SOD se encuentra en las mitocondrias, la Fe-SOD en bacterias, y la Cu/Zn-SOD en eucariotas. La Cu/Zn-SOD se subdivide en SOD extracelular y citosólica. La SOD extracelular (EC-SOD) coopera en la destrucción de parásitos ingeridos o encapsulados durante la explosión respiratoria generada durante la fagocitosis (Homblad y Söderhäll, 1999).

El sistema antioxidante de los organismos aeróbicos no sólo previene el efecto de las ROS, sino que también es utilizado como un indicador potencial de estrés oxidativo en organismos marinos. Downs *et al.* (2001) reportaron el papel inmunomodulatorio de la enzima mitocondrial superóxido dismutasa en el camarón *Palaemonetes pugio* en respuesta a factores ambientales estresantes. El incremento de la actividad respiratoria (Muñoz *et al.*, 2000) y antioxidante en hemocitos inmunoestimulados se debe a cambios en la composición lipídica de su membrana celular que induce la producción de activadores celulares (citocinas o chaperonas), los cuales mejoran su capacidad fagocítica (Itami *et al.*, 1998).

En hemocitos de penaeidos se ha demostrado la activación de la respuesta celular mediante antígenos microbianos de superficie como  $\beta$ -glucanos, lipopolisacáridos (LPS), zymosan (Leonard *et al.*, 1985; Song y Hsieh 1994), péptidoglicanos (Itami *et al.*, 1998) y de bacterias como *Vibrio vulnificus* y *V. parahaemolyticus* (Sung *et al.*, 1994; Campa-Córdova *et al.*, 2002). La respuesta inmune a los inmunoestimulantes puede variar significativamente, dependiendo de la estructura química del inmunoestimulante o del número de receptores presentes en las membranas celulares del camarón (Bowie y O'Neill, 2000).

Este trabajo reporta el efecto de algunos inmunoestimulantes en la respuesta antioxidante de juveniles de camarón blanco

probiotics and immunostimulation (Scholz *et al.*, 1999). Immunostimulants are aimed at enhancing nonspecific defense mechanisms in animals, including shrimp (Song and Sung, 1990).

Effective and rapid elimination of reactive oxygen species (ROS) is essential to the health and survival of organisms. For this reason, organisms have evolved antioxidant defenses, including nonenzymatic and enzymatic mechanisms. Enzymatic antioxidant defenses include ascorbate peroxidase, glutathione reductase, catalase and peroxidases that efficiently remove hydrogen peroxide from cells, and superoxide dismutase (SOD) that scavenges the superoxide anion (Homblad and Söderhäll, 1999). The SODs have been classified into three major groups, depending on metal ion content: Mn-SOD found in mitochondria, Fe-SOD found in bacteria, and Cu/Zn-SOD found in eukaryotes. The Cu/Zn-SODs can be subdivided into extracellular and cytosolic SODs. Extracellular SOD (EC-SOD) can cooperate to destroy an ingested or encapsulated parasite during a respiratory burst (Homblad and Söderhäll, 1999).

The complex antioxidant system of aerobic organisms not only prevents the effect of ROS, but also plays a vital role in protecting cells from oxidative stress, and is used as a potential indicator of oxidative stress in marine organisms. Downs *et al.* (2001) reported the immunomodulatory role of the mitochondrial SOD enzyme in grass shrimp *Palaemonetes pugio*. Increased respiratory burst (Muñoz *et al.*, 2000) and greater antioxidant levels in stimulated hemocytes are considered responses to changes in lipid composition of cell membranes that enhance production of cell activating factors (cytokines or chaperonins), which can improve their phagocytic capability (Itami *et al.*, 1998).

In shrimp, microbial surface antigens such as  $\beta$ -glucans, lipopolysaccharides (LPS), zymosan (Leonard *et al.*, 1985; Song and Hsieh 1994), peptidoglycan (Itami *et al.*, 1998), and from bacteria like *Vibrio vulnificus* and *V. parahaemolyticus* (Sung *et al.*, 1994; Campa-Córdova *et al.*, 2002) are able to activate cellular functions directly (Leonard *et al.*, 1985). Immune response of shrimp exposed to immunostimulants may be significantly different depending on the chemical structure of the immunostimulant and the number of cellular receptors (Bowie and O'Neill, 2000).

This paper reports the effect of certain immunostimulants on immune response in reared American white shrimp. Attention is paid to recent discoveries concerning cellular SOD (De la Fuente and Victor, 2000; Matsuda *et al.*, 2003), which plays an important role in modulating oxidative responses leading to increased or decreased SOD activity.

## Materials and methods

### Experimental animals

Healthy juvenile American white shrimp (*Litopenaeus vannamei* Boone, 1931) (Pérez-Farfante and Kensley, 1997),

obtenidos de tanques de cultivo. Se pone atención a descubrimientos recientes relacionados con la actividad celular de la SOD (De la Fuente y Victor, 2000; Matsuda *et al.*, 2003), que juega un papel importante como modulador de la respuesta inmune generada por inmunostimulantes al incrementar o disminuir la actividad de la enzima y las proteínas celulares, ofreciendo potencial protección al hospedero contra agentes patógenos.

## Materiales y métodos

### Animales experimentales

Se pesaron camarones juveniles de *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) (Pérez-Farfante y Kensley, 1997) entre 0.7 y 1.0 g obtenidos del laboratorio húmedo de cultivo del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR, La Paz, Baja California Sur, México) y se aclimataron durante 15 días antes de los experimentos en tanques de fibra de vidrio de 1500 L conteniendo agua de mar filtrada (0.2  $\mu\text{m}$ ), 10 mg L<sup>-1</sup> de sal disódica EDTA y aireación constante. El agua de mar filtrada fue mantenida a pH 7.8–8.2, 27°C y 35‰ de salinidad. Los camarones fueron alimentados diariamente con alimento comercial.

### Inmunostimulantes

Se utilizaron como inmunostimulantes  $\beta$ -1,6 glucano extraído de *Saccharomyces cerevisiae* (Biotec Mackzymal, Tromsø, Noruega), lipopolisacárido aislado de *Escherichia coli* (Sigma, Cat. No. L-2880), fucoidán aislado de *Fucus vesiculosus* (Sigma, Cat. No. F-5631) y *V. penaeicida* muerto por calor. Las suspensiones de  $\beta$ -1,6 glucano, lipopolisacárido y fucoidán se mezclaron en 50 L de agua de mar para obtener una concentración final de 0.5 mg mL<sup>-1</sup>, 1  $\mu\text{g}$  mL<sup>-1</sup> y 10  $\mu\text{g}$  mL<sup>-1</sup>, respectivamente.

### Preparación de la bacteria

La bacteria *V. penaeicida* (cepa AM-101) fue donada por el Dr. Saulnier del IFREMER, Francia. La cepa se mantuvo en medio LB (Laboratorios DIFCO, Cat. No. 0446-17-3) conteniendo 15% de glicerol a -80°C. Al momento de ser utilizada, la bacteria fue descongelada e incubada en medio LB con 3.5% de NaCl. Los cultivos fueron incubados por 24 h a 30°C, cosechados, suspendidos en agua de mar estéril y, mediante un espectrofotómetro, se les determinó la densidad óptica (540 nm), la cual se ajustó a 1 para obtener una concentración final de  $1 \times 10^9$  UFC mL<sup>-1</sup> (Harzevili *et al.*, 1998). La cepa de *Vibrio* se sometió a una temperatura de 120°C y 15 lb de presión en autoclave por 20 min.

Para realizar el ensayo con la bacteria, los camarones se mantuvieron 2 h en tanques de cultivo con 50 L de agua de mar filtrada y se agregaron 500 mL de bacteria viva o muerta ( $1 \times$

weighing between 0.7 and 1.0 g, were obtained from the wet laboratory at the Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR, La Paz, Baja California Sur, Mexico). They were acclimated prior to the experiments for 15 days in a constantly aerated 1500-L fiberglass tank containing filtered (0.2  $\mu\text{m}$ ) seawater with 10 mg L<sup>-1</sup> of EDTA disodium salt. Filtered seawater was maintained at pH 7.8–8.2, 27°C, and 35‰. Shrimp were fed daily commercial pellet feed.

### Immunostimulants

The following immunostimulants were used:  $\beta$ -1,6 glucan from *Saccharomyces cerevisiae* (Biotec Mackzymal, Tromsø, Norway); LPS isolated from an *Escherichia coli* strain (Sigma, Cat. No. L-2880); fucoidan isolated from *Fucus vesiculosus* (Sigma, Cat. No. F-5631); and heat-killed *V. penaeicida*. The  $\beta$ -1,6 glucan, LPS and fucoidan suspensions were mixed with 50 L seawater to obtain final concentrations of 0.5 mg mL<sup>-1</sup> and 1 and 10  $\mu\text{g}$  mL<sup>-1</sup>, respectively.

### Strain preparation

*Vibrio penaeicida* (strain AM-101) was kindly donated by Dr. Saulnier from IFREMER, France. The strain was maintained in LB broth (DIFCO Laboratories, Cat. No. 0446-17-3) containing 15% glycerol at -80°C. When required, the strain was thawed and incubated on LB agar medium containing 3.5% NaCl. Cultures were incubated at 30°C for 24 h, harvested with a sterile plate scraper and suspended in sterile seawater. The concentration of bacteria was determined using a spectrophotometer at 540 nm, and the optical density was adjusted at 1 to obtain a final concentration of  $1 \times 10^9$  CFU mL<sup>-1</sup> (Harzevili *et al.*, 1998). The *Vibrio* strain was autoclaved at 120°C and 15 psi pressure for 20 min. Shrimp and live *Vibrio* strain were maintained in aerated tanks for 2 h, and we added 500 mL live or heat-killed bacteria ( $1 \times 10^9$  CFU mL<sup>-1</sup>) to 50 L aerated seawater to obtain a final concentration of  $1 \times 10^7$  CFU mL<sup>-1</sup>.

### Experimental protocol

Treatment groups of 60 shrimp were kept in 200-L fiberglass containers. Separate groups were immersed for 6 h in  $\beta$ -glucan (BG-1), fucoidan (FC-1), LPS (LPS-1) or dead *V. penaeicida* (VP-1). A control group (C-1) was immersed in seawater free of immunostimulants, under otherwise the same conditions as the experimental groups. Following immunostimulant exposure, shrimp were kept in aerated seawater and fed three times daily. Three randomly chosen shrimp per treatment were sampled at 6, 24, 48, 72, and 96 h after exposure to immunostimulants and stored at -80°C.

On the tenth day of the experiment, shrimp were challenged with live *V. penaeicida* for 2 h and kept in aerated seawater free of *V. penaeicida* following exposure. A non-previously stimulated group of shrimp (C-2) was also exposed to the bacteria

$10^9$  UFC mL<sup>-1</sup>) para obtener una concentración final de  $1 \times 10^7$  UFC mL<sup>-1</sup>.

#### Protocolo experimental

Se utilizaron grupos de 60 organismos mantenidos en contenedores de fibra de vidrio de 200 L. Se sumergieron grupos de camarones durante 6 h en  $\beta$ -glucano (BG-1), fucoidán (FC-1), LPS (LPS-1), o *V. penaeicida* muerto por calor (VP-1). Se sumergió un grupo control (C-1) en agua de mar libre de inmunostimulantes, bajo las mismas condiciones de cultivo que los grupos de camarones tratados. Después de la exposición a los inmunostimulantes, los organismos se colocaron en agua de mar con aireación constante y se alimentaron tres veces al día. Se tomaron tres camarones al azar, por tratamiento, a las 6, 24, 48, 72 y 96 h posteriores al ensayo con los inmunostimulantes y se almacenaron a  $-80^\circ\text{C}$ .

Al décimo día del experimento los camarones previamente inmunostimulados se expusieron a *V. penaeicida* vivo durante 2 h y posteriormente los organismos se colocaron en tanques con agua de mar filtrada libre de *V. penaeicida*. Como control positivo (C-2), un grupo de camarones sin previa inmunostimulación fue expuesto a la bacteria. A las 2, 24 y 48 h posteriores a la exposición a la bacteria patógena, se tomaron tres camarones al azar por tratamiento y se almacenaron a  $-80^\circ\text{C}$ .

#### Extracción de la SOD

Para el rompimiento celular se colocaron 100 mg de músculo de camarón congelado en un homogenizador mecánico conteniendo 0.5 mL de una solución amortiguadora de fosfatos (50 mM, pH 7.8). El homogenizado obtenido se centrifugó a 5724g por 5 min a  $4^\circ\text{C}$  y el sobrenadante recuperado se calentó en baño María durante 5 min a  $65^\circ\text{C}$ . Se obtuvo un nuevo sobrenadante centrifugando por segunda ocasión el extracto crudo y se almacenó a  $-20^\circ\text{C}$ . Las muestras se mantuvieron en hielo durante todo el proceso de extracción.

#### Actividad de la SOD

La actividad de la SOD se determinó de acuerdo con el método propuesto por Beauchamp y Fridovich (1971), utilizando nitro azul de tetrazolio (NBT) en presencia de riboflavina. Brevemente, se mezclaron 2 mL de la mezcla de reacción (EDTA 0.1 mM, metionina 13  $\mu\text{M}$ , NBT 0.75 mM y riboflavina 20  $\mu\text{M}$ , en solución amortiguadora de fosfatos 50 mM, pH 7.8) y se colocaron de 0 a 100  $\mu\text{L}$  de extracto crudo bajo luz fluorescente por 2 min o hasta que los tubos control alcanzaron una densidad óptica de 0.2 a 0.25 a 560 nm. La actividad específica se calculó en unidades por miligramo de proteína utilizando un programa de computadora (Vázquez-Juárez *et al.*, 1993). Los resultados se expresaron como actividad enzimática relativa (SODA) utilizando el cociente entre la actividad específica de los camarones tratados y la actividad específica de los camarones control.

(positive control). Three randomly chosen shrimp per treatment were sampled and stored at  $-80^\circ\text{C}$  after exposure to the live pathogenic bacteria at 2, 24, and 48 h.

#### Extraction of SOD

For cell disruption, 100 mg frozen shrimp muscle or 100  $\mu\text{L}$  hemocyte suspension were added to a mechanical homogenizer containing 0.5 mL phosphate buffer (50 mM, pH 7.8). The homogenate was centrifuged (5724g for 5 min at  $4^\circ\text{C}$ ), and the supernatant was recovered and heated for 5 min at  $65^\circ\text{C}$ . A new supernatant was obtained after a second centrifugation (crude extract) and stored at  $-20^\circ\text{C}$ . Samples were maintained on ice at all times.

#### Activity assay of SOD

The SOD activity was determined according to Beauchamp and Fridovich (1971) using nitro blue tetrazolium (NBT) in the presence of riboflavin. For this, 2 mL of reaction mixture (0.1 mM EDTA, 13  $\mu\text{M}$  methionine, 0.75 mM NBT, and 20  $\mu\text{M}$  riboflavin in 50 mM phosphate buffer at pH 7.8) and from 0 to 100  $\mu\text{L}$  of crude extract were placed under fluorescent light for 2 min or until  $A_{560}$  in control tubes reached 0.2 to 0.25 OD. The specific activity (units per milligram of protein) was calculated using a computer program (Vázquez-Juárez *et al.*, 1993). Relative enzyme activity (SODA) was expressed as the ratio of the specific activity of treated shrimp to that of controls and was used as an index of Mn-SOD activity.

#### Protein

Total soluble protein concentration in crude extracts was measured according to Bradford (1976) using bovine serum albumin (BSA) as a standard. Relative protein content (RPC) was expressed as the ratio of  $OD_{595}$  of treated sample hemocytes or muscle to that of controls and was used as an index of protein content.

#### Statistical analysis

All measurements were made in triplicate. The results were studied by analysis of variance (ANOVA) and the Tukey test to analyze differences (Statistica software). Values at  $P < 0.05$  were considered significantly different.

## Results

#### Activity of SOD

Exposure of shrimp to LPS for 6 h showed a significant ( $P < 0.05$ ) increase in SODA at 24 h, while shrimp exposed to  $\beta$ -glucan or *V. penaeicida* induced a significant increase in SODA at 48 h after challenge (fig. 1). The values dropped below the control values from 72 to 96 h. Juvenile shrimp

### Proteína

El contenido total de proteína soluble en los extractos crudos se determinó de acuerdo al método descrito por Bradford (1976), utilizando albúmina sérica de bovino (BSA) como estándar. Los resultados se expresaron como contenido relativo de proteína (RPC), dividiendo los valores de proteína ( $\text{mg mL}^{-1}$ ) obtenidos en los tratamientos entre los valores de proteína obtenidos en los grupos control.

### Análisis estadísticos

Todas las determinaciones se realizaron por triplicado. Los resultados se estudiaron utilizando un análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de Tukey para estudiar las diferencias (Statistica). Los valores obtenidos a  $P < 0.05$  se consideraron significativamente diferentes.

## Resultados

### Actividad de SOD

La exposición de juveniles de camarón blanco a inmunoes-timulantes generó un incremento significativo ( $P < 0.05$ ) en la actividad SODA en los grupos tratados con LPS a las 24 h y en los grupos tratados con  $\beta$ -glucano, LPS o *V. penaeicida* muerto por calor a las 48 h después de la exposición (fig. 1). Se obtuvo una disminución en la actividad de la enzima entre las 72 y 96 h. La respuesta antioxidante más alta (3.28 veces respecto al grupo control) se obtuvo en los grupos tratados con *V. penaeicida* muerto por calor a las 48 h después del ensayo (fig. 1).

Al décimo día de iniciado el experimento de inmunoes-timulación, los camarones fueron expuestos o no (control negativo) a *V. penaeicida* vivo y se determinó la actividad antioxidante de la SOD como se muestra en la figura 2. Se obtuvo un incremento de SODA más temprano en los grupos tratados con LPS y en el control positivo (2 h) que en los grupos tratados con  $\beta$ -glucano o fucoidán (48 h). Además, los valores de SODA obtenidos en el control positivo fueron similares a los obtenidos con los grupos tratados con  $\beta$ -glucano (fig. 2).

Los camarones tratados con  $\beta$ -glucano mostraron una respuesta antioxidante más intensa después de la exposición a la bacteria (2.5 veces superior al grupo control, fig. 2) que después de la exposición al inmunoes-timulante (dos veces más respecto al grupo control, fig. 1). La actividad SOD de los juveniles tratados con fucoidán no se incrementó significativamente ( $P > 0.05$ ) durante el primer experimento (fig. 1), pero si se incrementó significativamente ( $P < 0.05$ ) después de la exposición a la bacteria viva en el segundo experimento (fig. 2).

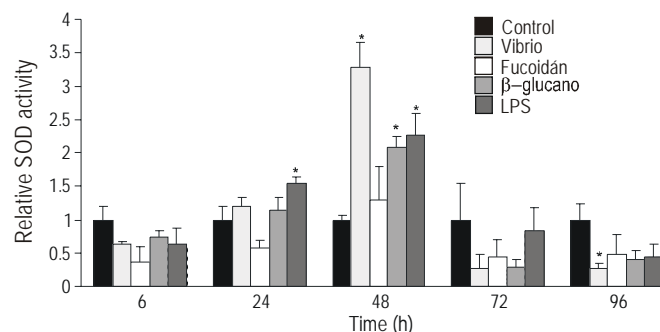
### Proteína soluble

La exposición de los juveniles a los inmunoes-timulantes durante 6 h generó un incremento significativo ( $P < 0.05$ ) en el

treated with dead *V. penaeicida* showed higher antioxidant response (fig. 1).

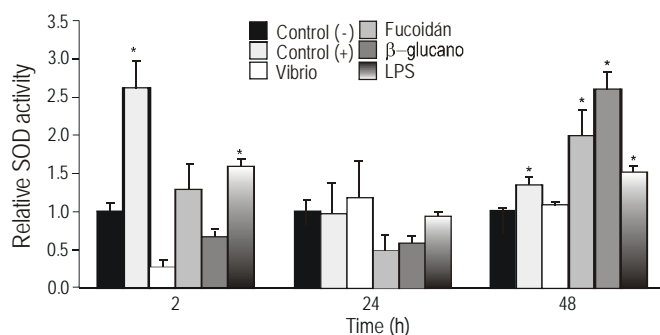
Figure 2 shows SODA of shrimp exposed or not (negative control) to live *V. penaeicida* after 10 days of experiment; SODA appeared earlier in groups treated with LPS and positive control (2 h) than in those treated with  $\beta$ -glucan or fucoidan (48 h), and the SODA values of positive controls were similar to those of the  $\beta$ -glucan group (fig. 2).

Shrimp treated with  $\beta$ -glucan showed higher antioxidant response after the second challenge (2.5 times that of the control group, fig. 2) than after the first challenge (two times that of the control group, fig. 1). In shrimp treated with fucoidan SODA did not increase significantly ( $P > 0.05$ ) after the first challenge with live bacteria (fig. 1), but increased significantly ( $P < 0.05$ ) after the second challenge (fig. 2).



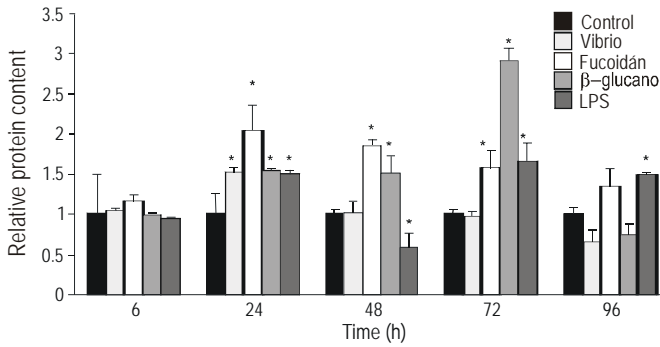
**Figura 1.** Actividad relativa de la SOD (SODA) en juveniles de camarón blanco expuestos por inmersión durante 6 h a  $\beta$ -glucano, LPS o *V. penaeicida* muerto por calor. Barras verticales = error estándar; \* diferencia significativa ( $P < 0.05$ ).

**Figure 1.** Relative superoxide dismutase activity (SODA) in juvenile American white shrimp exposed by immersion to  $\beta$ -glucan, fucoidan, LPS, and heat-killed *V. penaeicida* for 6 h. Vertical error bars = standard error; \* significantly different ( $P < 0.05$ ).



**Figura 2.** Actividad relativa de la SOD (SODA) en juveniles de camarón blanco expuestos previamente a los inmunoes-timulantes y retados por inmersión durante 2 h con *V. penaeicida* vivo. Barras verticales = Error estándar; \* diferencia significativa ( $P < 0.05$ ).

**Figure 2.** Relative superoxide dismutase activity (SODA) in juvenile American white shrimp exposed by immersion to immunostimulants and challenged with live *V. penaeicida* for 2 h. Vertical error bars = standard error; \* significantly different ( $P < 0.05$ ).



**Figura 3.** Contenido relativo de proteína (RPC) en juveniles de camarón blanco expuestos por inmersión durante 6 h a β-glucano, fucoidán, LPS, o *V. penaeicida* muerto por calor. Barras verticales = Error estándar; \* diferencia significativa ( $P < 0.05$ ).

**Figure 3.** Relative protein content (RPC) in juvenile American white shrimp exposed by immersion to β-glucan, fucoidan, lipopolysaccharide (LPS), and heat-killed *V. penaeicida* for 6 h. Vertical error bars = standard error; \* significantly different ( $P < 0.05$ ).

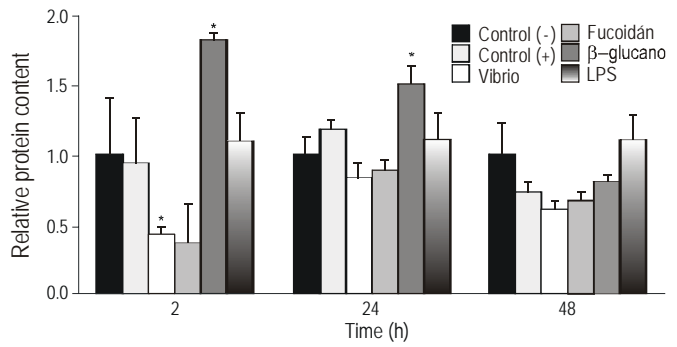
contenido de RPC a las 24 h después del ensayo (fig. 3). La exposición a β-glucano o fucoidán indujo un incremento significativo ( $P < 0.05$ ) en RPC de las 24 a las 72 h (fig. 3). Los camarones tratados con β-glucano tuvieron el contenido más alto de RPC a las 72 h (tres veces superior al control) y alcanzaron valores similares al control a las 96 h. Los valores más bajos de RPC se registraron con LPS a las 48 h, y con β-glucano y con la bacterina a las 96 h. Los valores del contenido de proteína más altos registrados con LPS fueron a las 24, 72 y 96 h (fig. 3).

El contenido de proteína en los grupos tratados con β-glucano se incrementaron significativamente ( $P < 0.05$ ) de 2 a 24 h después de la exposición a la bacteria patógena viva (fig. 4). Se registró una disminución en el contenido de RPC en los grupos tratados con bacterina o fucoidán 2 h después de la exposición a la bacteria patógena (fig. 4). El contenido de RPC en los organismos inmunestimulados no registró un incremento al menos durante las primeras 48 h después de su exposición al *V. penaeicida* vivo (fig. 4).

## Discusión

Algunos autores han reportado que la administración de inmunostimulantes vía inmersión mejora la respuesta inmune del camarón (Itami *et al.*, 1998; Alabi *et al.*, 1999). Asimismo, otros trabajos han reportado que los inmunostimulantes mejoran la supervivencia del camarón (Itami *et al.*, 1989; Sung *et al.*, 1994), pero aún no se ha determinado cuáles componentes del sistema inmune se incrementan.

El incremento de las superóxido dismutasas en respuesta a estrés oxidativo es uno de los principales mecanismos de defensa antioxidante en los organismos aeróbicos. El incremento de los niveles de la Mn-SOD han sido relacionados con la longevidad y la tolerancia a eventos de isquemia o reperfusión, así como a factores inductores de estrés oxidativo (Fridovich, 1995).



**Figura 4.** Contenido relativo de proteína (RPC) en juveniles de camarón blanco expuestos previamente a los inmunostimulantes y retados por inmersión durante 2 h con *V. penaeicida* vivo. Barras verticales = Error estándar; \* diferencia significativa ( $P < 0.05$ ).

**Figure 4.** Relative protein content (RPC) in juvenile American white shrimp exposed by immersion to immunostimulants and challenged with live *V. penaeicida* for 2 h. Vertical error bars = standard error; \* significantly different ( $P < 0.05$ ).

## Soluble protein

Exposure to immunostimulants for 6 h induced a significant increase ( $P < 0.05$ ) in shrimp RPC at 24 h (fig. 3). Exposure to β-glucan or fucoidan induced a significant increase in RPC of juvenile shrimp from 24 to 72 h (fig. 3). Shrimp treated with β-glucan had higher RPC than other treatments at 72 h (three times those of controls), and returned to base values at 96 h. Immunostimulated shrimp showed base values of RPC at 6 h after challenge, and the lowest RPC values were registered for LPS groups at 48 h, and for β-glucan and heat-killed *V. penaeicida* at 96 h. Shrimp exposed to LPS induced the highest RPC at 24, 72, and 96 h (fig. 3).

In positive controls, RPC increased significantly ( $P < 0.05$ ) from 2 to 24 h after challenge with live pathogenic bacteria (fig. 4). Shrimp treated with heat-killed *Vibrio* or fucoidan had the lowest RPC 2 h after challenge. The RPC of immunostimulated shrimp did not increase significantly after challenge with live *V. penaeicida*, at least within the first 48 h after challenge (fig. 4).

## Discussion

Some authors have reported that the administration of immunostimulants by immersion enhanced the immune response in shrimp (Itami *et al.*, 1998; Alabi *et al.*, 1999). Also, some researchers have reported enhancement of shrimp survival after exposure to immunostimulants (Itami *et al.*, 1989; Sung *et al.*, 1994), but it is not well known which components of the immune response were enhanced.

Accumulation of SODs in response to oxidative stress is one of the main antioxidant defense pathways. Increased levels of Mn-SOD have been linked to increased longevity, and increased tolerance to ischemic or reperfusion events or to factors that induce oxidative stress (Fridovich, 1995).

The antioxidant response recorded in juvenile shrimp exposed to β-glucan (two times that of controls, fig. 1) was

La respuesta antioxidante obtenida en los juveniles expuestos a  $\beta$ -glucano (dos veces superior al control, fig. 1), fue similar a la reportada en camarones adultos de *L. vannamei* (Campa-Córdova *et al.*, 2002) y a la respuesta oxidativa generada en el camarón tigre *Penaeus monodon* (Song y Hsieh, 1994). En este estudio se obtuvieron incrementos significativos ( $P < 0.05$ ) en la respuesta antioxidante de juveniles de camarón blanco 48 h después de la exposición a  $\beta$ -glucano, LPS o *V. penaeicida* muerto por calor (fig. 1), pero los valores de la Mn-SOD fueron diferentes entre tales tratamientos. Los camarones expuestos a *V. penaeicida* registraron una respuesta antioxidante mayor (3.2 veces superior al grupo control) que los camarones expuestos a  $\beta$ -glucano, LPS o fucoidán. Los receptores transmembranales de invertebrados no sólo detectan la presencia de microorganismos infecciosos, sino que también pueden diferenciar entre distintas clases de patógenos (Bowie y O'Neill, 2000) y presentar una respuesta inmune ante ciertos antígenos, o no presentarla ante otros (Arala-Chaves y Sequeira, 2000). Por lo tanto, la magnitud de la respuesta inmune puede variar con los diferentes antígenos de prueba (Song y Hsieh 1994). Song y Hsieh (1994) compararon el efecto de diferentes inmunoestimulantes en la generación de anión superóxido en hemocitos del camarón tigre *P. monodon*, encontrando que  $\beta$ -glucano indujo una mayor respuesta oxidativa, seguido por PMA (acetato de forbol miristato) y zymosan (2.5, 2.0 y 1.3 veces superior al grupo control, respectivamente). Henning *et al.* (1998) reportaron un incremento en el contenido de hemocitos circulantes (THC) 1.53 veces respecto al control en *Penaeus japonicus* estimulado con peptidoglicano. Muñoz *et al.* (2000) encontraron diferencias en la actividad fagocítica en hemocitos de *L. vannamei* después del ensayo con bacterias gram positivas y gram negativas. Namikoshi *et al.* (2004) reportaron la eficiencia del  $\beta$ -glucano y *V. penaeicida* muerto por calor contra infecciones experimentales inducidas con el virus de la mancha blanca (WSSV) en *P. japonicus*. Hou y Chen (2005) inyectaron juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) con extracto del alga roja *Gracilaria tenuistipitata*, conocida por su contenido de polisacáridos antitumorales, encontrando un incremento en la respuesta inmune y resistencia a infecciones experimentales con *V. alginolyticus*.

Después de un incremento en la actividad de la Mn-SOD, se registró una disminución de la actividad antioxidante entre las 72 y 96 h (fig. 1). Campa-Córdova *et al.* (2002) relacionaron la disminución de la actividad enzimática de la SOD en adultos de *L. vannamei* con el estrés oxidativo ocasionado por activadores del sistema inmune. La exposición de adultos de *L. vannamei* a algunos inmunoestimulantes como  $\beta$ -glucano o LPS ocasiona una disminución en el contenido de hemocitos circulantes relacionada con la susceptibilidad a patógenos y un incremento posterior con el efecto protector en contra de patógenos potenciales (Lorenzon *et al.*, 1999; Campa-Córdova *et al.*, 2002; Lorenzon *et al.*, 2002).

La SODA más alta se obtuvo al exponer a los juveniles a la bacterina (fig. 1) y la respuesta antioxidante más temprana (2 h) fue obtenida en los controles positivos 2 h después de

similar to the response reported for adult shrimp *L. vannamei* (Campa-Córdova *et al.*, 2002) and to the oxidant response found in tiger shrimp *Penaeus monodon* exposed to the same elicitor (Song and Hsieh, 1994).

In this study, significant increases in the antioxidant capacities of juvenile American white shrimp were observed at 48 h in response to  $\beta$ -glucan, LPS or heat-killed *V. penaeicida* (fig. 1), but the Mn-SOD activities among treatments were different. Shrimp exposed to live *V. penaeicida* registered a higher response (3.2 times that of controls) than shrimp exposed to  $\beta$ -glucan, LPS or fucoidan. Invertebrate transmembrane receptors not only detect the presence of an infecting microorganism, but also discriminate between different classes of pathogen (Bowie and O'Neill, 2000), and an immune response can be detected after challenge with certain antigens, but not with others (Arala-Chaves and Sequeira, 2000). Thus, shrimp immune response among immunostimulants tested may be different (Song and Hsieh, 1994). Song and Hsieh (1994) compared the effects of different immunostimulants on the generation of superoxide anion in *P. monodon* and they reported a higher oxidant response with  $\beta$ -glucan, followed by phorbol myristate acetate (PMA) and zymosan (2.5, 2.0 and 1.3 higher than the control group, respectively). Henning *et al.* (1998) reported an index of circulating hemocytes (THC) 1.53 times higher than the control group in *Penaeus japonicus* immunostimulated with peptidoglycan. Muñoz *et al.* (2000) found different phagocytic responses in shrimp hemocytes after challenge with several Gram-positive and Gram-negative bacteria. Namikoshi *et al.* (2004) reported the efficacy of heat-killed *V. penaeicida* and  $\beta$ -glucan against white spot syndrome virus (WSSV) infections in *P. japonicus*. Hou and Chen (2005) injected white shrimp (*L. vannamei*) juveniles with an extract of the red alga *Gracilaria tenuistipitata*, known for its content of antitumoral polysaccharides, and found an increase in the immune response and resistance to infections with *V. alginolyticus*.

After the increase in Mn-SOD activity in juvenile shrimp at 48 h, a decrease in antioxidant activity was observed from 72 to 96 h (fig. 1). Campa-Córdova *et al.* (2002) reported the same pattern in a study with adult *L. vannamei* shrimp, relating the results with oxidative stress. In adult *L. vannamei* shrimp exposed to  $\beta$ -glucan and LPS, a decrease in circulating hemocytes was related to shrimp susceptibility to pathogens, and the later increase might be related to shrimp immune system action to protect against potential pathogens (Lorenzon *et al.*, 1999; Campa-Córdova *et al.*, 2002; Lorenzon *et al.*, 2002).

The highest Mn-SOD activity in juvenile shrimp exposed to immunostimulants was recorded at 48 h (fig. 1), and the earliest antioxidant response was obtained in positive controls after exposing the specimens to live pathogenic bacteria (fig. 2). The earlier response of positive controls challenged with live bacteria was similar to findings in other studies (De la Peña *et al.*, 1995). Campa-Córdova *et al.* (2002) found a rapid but transient increase in superoxide production in *L. vannamei*

exponer a los juveniles a la bacteria patógena viva (fig. 2). Esta respuesta enzimática fue similar a la respuesta inmune encontrada en crustáceos y camarones penaeidos (De la Peña *et al.*, 1995). Campa-Córdova *et al.* (2002) encontraron un incremento rápido y transitorio en la producción de anión superóxido en *L. vannamei* expuesto durante 1 h a *V. parahaemolyticus* vivo. Martin *et al.* (1993) sugirieron que la bacteria viva puede invadir los tejidos del camarón en un periodo corto de exposición.

Los grupos tratados con  $\beta$ -glucano registraron un incremento significativo en el contenido de RPC (fig. 4) durante las primeras 24 h posteriores a la exposición a la bacteria viva, pero el incremento de la actividad de la enzima SOD se registró hasta las 48 h (fig. 2). Aunque la SODA de los grupos tratados con  $\beta$ -glucano no se incrementó durante las primeras 24 h posteriores a la exposición a la bacteria viva (fig. 2), el incremento en RPC podría indicar que otras inmunoproteínas podrían estar actuando en respuesta a la bacteria (fig. 4). De igual manera, se observó que la actividad de la Mn-SOD de los camarones tratados con fucoidán no se incrementó significativamente ( $P > 0.05$ ), pero los niveles de RPC se incrementaron significativamente ( $P < 0.05$ ) desde las 24 a las 72 h (figs. 1, 3). Downs *et al.* (2001) reportaron que el incremento en RPC registrado en el camarón *Palaemonetes pugio* expuesto a estrés por temperatura se debió al incremento de diferentes inmunoproteínas.

La determinación de la respuesta antioxidante (Downs *et al.*, 2001; Campa-Córdova *et al.*, 2002) y oxidante (Muñoz *et al.*, 2000; González y Arenas, 2002; Campa-Córdova *et al.*, 2002) podrían utilizarse como herramientas útiles para medir respuesta inmune *in vivo* e *in vitro* de organismos en cultivo (vertebrados e invertebrados) expuestos constantemente a condiciones ambientales como temperatura, pH, oxígeno disuelto, salinidad u otros parámetros abióticos, así como a microorganismos patógenos. También es importante diseñar estudios dirigidos a conocer dosis adecuadas de inmunoestimulantes para evitar estrés fisiológico en los organismos de cultivo y con el propósito de mejorar la respuesta inmune de los camarones.

## Agradecimientos

Este trabajo fue realizado con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT 28884B), del Sistema de Investigación del Mar de Cortés (SIMAC 980106033) y del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR ABM-11). Agradecemos el apoyo técnico de Viridiana Peraza y María Jesús Romero.

## Referencias

- Alabi, A.O., Jones, D.A. and Latchford, J.W. (1999). The efficacy of immersion as opposed to oral vaccination of *Penaeus indicus* larvae against *Vibrio harveyi*. *Aquaculture*, 178: 1–11.
- Arala-Chaves, M. and Sequeira, T. (2000). Is there any kind of adaptive immunity in invertebrates? *Aquaculture*, 191: 247–258.
- Beauchamp, C. and Fridovich, I. (1971). Superoxide dismutase:

exposed to live *V. parahaemolyticus* for 1 h. Martin *et al.* (1993) suggested that live bacteria are able to invade shrimp tissues after a short period of exposure.

Groups treated with  $\beta$ -glucan showed a significant increase in RPC (fig. 4) at 2 and 24 h after challenge with live bacteria, but SODA increased at 48 h (fig. 2). Although SODA in shrimp exposed to  $\beta$ -glucan did not increase at 24 h after challenge with live bacteria (fig. 2), increased RPC could indicate that other immunoproteins are responding to the presence of live bacteria (fig. 4). In addition, Mn-SOD activity in shrimp treated with fucoidan did not increase significantly ( $P > 0.05$ ), but RPC increased significantly ( $P < 0.05$ ) from 24 to 72 h (figs. 1, 3). Downs *et al.* (2001) reported that increased RPC in grass shrimp (*Palaemonetes pugio*) was due to an increase in other immunoproteins.

Antioxidant (Downs *et al.*, 2001; Campa-Córdova *et al.*, 2002) and oxidant response (Muñoz *et al.*, 2000; González and Arenas, 2002; Campa-Córdova *et al.*, 2002) could become useful parameters to evaluate *in vivo* and *in vitro* immune response in cultured organisms (vertebrates and invertebrates) exposed to certain environmental conditions such as temperature, pH, dissolved oxygen, salinity or other biotic parameters, in addition to certain pathogenic microorganisms. It is important to design further studies focusing on appropriate doses of immunostimulants to avoid physiological stress and to enhance the immune response in shrimp culture.

## Acknowledgements

This work was supported by grants from the Mexican Council of Science and Technology (CONACYT 28884B), from the Sea of Cortés Research System (SIMAC 980106033), and from the Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR ABM-11). We thank Viridiana Peraza and María Jesús Romero for technical support.

English translation by the authors.

---

Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.*, 44: 276–286.

- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein using the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248–254.
- Bowie, A. and O'Neill, A.J. (2000). The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: Signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products. *J. Leukoc. Biol.*, 67: 508–514.
- Campa-Córdova, A.I., Hernández-Saavedra, N.Y., De Philippis, R. and Ascencio, F. (2002). Generation of superoxide anion and SOD activity in haemocytes and muscle of American white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) as a response to  $\beta$ -glucan and sulfated polysaccharide. *Fish Shellfish Immunol.*, 12: 353–366.
- De la Fuente, M. and Victor, V.M. (2000). Anti-oxidants as modulators of immune function. *Immun. Cell Biol.*, 78: 49–54.
- De la Peña, L.D., Nakai, T. and Muroga, K. (1995). Dynamics of *Vibrio* sp. PJ in organs of orally infected kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. *Fish Pathol.*, 30: 39–45.



- Downs, C., Fauth, J.E. and Woodley, C.M. (2001). Assessing the health of grass shrimp (*Palaemonetes pugio*) exposed to natural and anthropogenic stressors: A molecular biomarker system. *Mar. Biotechnol.*, 3: 380–397.
- Fridovich, I. (1995). Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu. Rev. Biochem.*, 64: 97–112.
- González, M. y Arenas, G. (2002). Caracterización de la respuesta inmune en el ostión del norte *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819) (Mollusca: Bivalvia). *Cienc. Mar.*, 28(3): 247–255.
- Harzevili, A.R.S., Van Duffel, H., Dhert, P., Swings, J. and Sorgeloos, P. (1998). Use of a potential probiotic *Lactobacillus lactis* Ar21 strain for the enhancement of growth in the rotifer *Brachionus plicatilis* (Müller). *Aquacult. Res.*, 29: 411–417.
- Henning, O., Itami, T., Maeda, M., Kondo, M., Natsukari, T. and Takahashi, T. (1998). Analyses of hemolymph immunoparameters in kuruma shrimp infected with panaeid rod-draped DNA virus. *Fish Pathol.*, 33: 389–393.
- Homblad, T. and Söderhäll, K. (1999). Cell adhesion molecules and antioxidative enzymes in a crustacean, possible role in immunity. *Aquaculture*, 172: 111–123.
- Hou, W.Y. and Chen, J.C. (2005). The immunostimulatory effect of hot-water extract of *Gracilaria tenuistipitata* on the white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. *Fish Shellfish Immunol.*, 19: 127–138.
- Itami, T., Takahashi, Y. and Nakamura, Y. (1989). Efficacy of vaccination against vibriosis in cultured kuruma prawns *Penaeus japonicus*. *J. Aquat. Anim. Health*, 1: 238–242.
- Itami, T., Asano, M., Tokushige, K., Kubono, K., Nakagawa, A., Takeno, N., Nishimura, H., Maeda, M., Kondo, M. and Takahashi, Y. (1998). Enhancement of disease resistance of kuruma shrimp, *Penaeus japonicus* after oral administration of peptidoglycan derived from *Bifidobacterium thermophilum*. *Aquaculture*, 164: 277–288.
- Leonard, K., Söderhäll, K. and Ratcliffe, N.A. (1985). Studies on prophenoloxidase and protease activity of *Blamerus craniifer* haemocytes. *Insect Biochem.*, 15: 803–810.
- Lorenzon, S., Guarrini, S., Smith, V.J. and Ferrero, E.A. (1999). Effects of LPS injection on circulating haemocytes in crustaceans *in vivo*. *Fish Shellfish Immunol.*, 9: 31–50.
- Lorenzon, S., Pasqual, P. and Ferrero, E.A. (2002). Different bacterial lipopolysaccharides as toxicants and stressors in the shrimp *Palaemon elegans*. *Fish Shellfish Immunol.*, 13: 27–45.
- Martin, G.G., Poole, D., Poole, C., Hose, J.E., Arias, M., Reynolds, L., McKrell, N. and Whang, A. (1993). Clearance of Bacteria injected into the haemolymph of the penaeid shrimp, *Sicyonia ingentis*. *J. Invertebr. Pathol.*, 62: 308–315.
- Matsuda, M., Yamori, T., Naitoh, M. and Okutani, K. (2003). Structural revision of sulfated polysaccharide B-1 isolated from a marine *Pseudomonas* species and its cytotoxic activity against human cancer cell lines. *Mar. Biotechnol.*, 5: 13–19.
- Muñoz, M., Cedeño, R., Rodríguez, J., Van der Knaap, W.P., Mialhe, E. and Bachère, E. (2000). Measurement of reactive oxygen intermediate production in haemocytes of the penaeid shrimp, *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 191: 89–107.
- Namikoshi, A., Wu, J.L., Yamashita, T., Nishizawa, T., Nishioka, T., Arimoto, M. and Muroga, K. (2004). Vaccination trials with *Penaeus japonicus* to induce resistance to white spot syndrome virus. *Aquaculture*, 229: 25–35.
- Pérez-Farfante, I. and Kensley, B. (1997). Penaeoid and sergestoid shrimps and prawns of the world: Keys and diagnoses for the families and genera. Editions of the National Museum of Natural History. Paris.
- Scholz, U., García-Díaz, G., Ricque, D., Cruz-Suárez, L.E., Vargas-Albores, F. and Latchford, J. (1999). Enhancement of vibriosis resistance in juvenile *Penaeus vannamei* by supplementation of diets with different yeast products. *Aquaculture*, 176: 271–283.
- Song, Y.L. and Sung, H.H. (1990). Enhancement of growth in tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by bacterin prepared from *Vibrio vulnificus*. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, 10: 98–99.
- 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. *Dev. Comp. Immunol.*, 18: 201–209.
- Sung, H.H., Kou, G.H. and Song, L. (1994). Vibriosis resistance induced by glucan treatment in tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Fish Pathol.*, 29: 11–17.
- Vázquez-Juárez, R., Vargas-Albores, F. and Ochoa J.L. (1993). A computer program to calculate superoxide dismutase activity in crude extracts. *J. Microbiol. Methods*, 17: 239–244.