

Respuesta Inmune en Camarón Blanco, *Litopenaeus vannamei*, Expuesto a Infecciones Bacterianas y Virales

Angel I. Campa-Córdova, Antonio Luna-González, Ma. del Carmen Flores-Miranda, Ma. del Rosario Pacheco-Marges, Felipe Ascencio-Valle.

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR). Mar Bermejo 195, Col.

Playa Palo de Santa Rita, La Paz, B.C.S., 23090. México

Tel: +52-612-123-8464; Fax: +52-612-125-3625

E-mail: angcamp04@cibnor.mx

Resumen

En camarones el sistema inmune innato se expresa para protegerlos de sustancias extrañas y de microorganismos potencialmente patógenos. A nivel mundial, los virus son responsabilizados por las grandes pérdidas en el cultivo de camarón entre los que destaca por sus efectos negativos en la industria acuícola, el virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV). Sin embargo, existen otro tipo de patógenos como *Vibrio* sp. que también generan daños importantes en la producción. Investigaciones sobre el sistema antioxidante de camarones mostraron que las infecciones de origen viral y bacteriano inducen estrés oxidativo en los organismos cultivados por la generación excesiva de especies reactivas al oxígeno (EROs) implicadas en la activación de la fagocitosis, principal mecanismo de inmunidad celular. La prevención y control de enfermedades regulando la respuesta inmune a través de la dieta, es una estrategia que poco a poco se está abriendo camino en la acuicultura. Actualmente, las investigaciones se han enfocado a las respuestas que tiene el camarón (metabólica y fisiológicamente) a componentes presentes en la dieta, dando lugar al desarrollo de un nuevo campo de investigación conocido como genómica nutricional o nutrigenómica. En el presente estudio se presentan los resultados de supervivencia y parámetros inmunológicos del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* infectado experimentalmente con vibrios patógenos y virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV). Se evaluaron los aditivos alimenticios β -1,3 glucano, vitamina E y β -caroteno incluidos en la dieta en proporción 0.1, 0.01 y 0.01% respectivamente. Los camarones fueron alimentados diariamente durante 23 días y posteriormente infectados con WSSV. Se determinó la actividad antioxidante de SOD y

CAT en hepatopáncreas y músculo a las 0, 1, 6, 12, 24 y 48 h después de la infección. Los juveniles tratados con vitamina E y β -1,3 glucano mantuvieron un incremento en la actividad SOD desde las 12 a las 48 h post-infección. Los camarones alimentados con β -caroteno incrementaron la actividad SOD antes del reto con WSSV y los que fueron alimentados con β -1,3-glucano y vitamina E incrementaron la actividad CAT también antes del reto. La actividad CAT en músculo se incrementó respecto al grupo control con todos los grupos de camarones tratados desde 1 hasta 6 h posteriores a la infección con WSSV. La actividad antioxidante más alta se registró en los camarones alimentados con vitamina E. Los juveniles alimentados con vitamina E y posteriormente infectados con WSSV, registraron 100% de mortalidad a las 72 h, pero los que fueron alimentados con β -1,3-glucano y β -caroteno resistieron la infección hasta las 144 h.

Palabras clave: Acuicultura, *Litopenaeus vannamei*, patógenos, respuesta inmune.

1.0 Introducción

Las investigaciones sobre el sistema inmune de camarón esta motivada por el interés de mejorar el crecimiento, supervivencia y control sobre las enfermedades que afectan a este organismo; siendo estos componentes de gran relevancia en la producción en sistemas de cultivo comercial de este crustáceo.

La vibriosis representa serios problemas en el cultivo de camarones peneidos, registrando mortalidades masivas tanto en laboratorios de producción larvaria como en la etapa de engorda en muchas partes del mundo. Sin embargo, es poca la atención que se le ha dado a su investigación; por lo que el conocimiento sobre estas patologías y la epidemiología de *Vibrio* spp. patógenos en el cultivo de camarón son limitados (Goarant *et al.*, 2006; Jayasree *et al.*, 2006).

Los inmunoestimulantes son sustancias de diverso origen que tienen la capacidad de regular o modificar la respuesta inmune, por lo que también se les conoce como inmunomoduladores o inmunopotenciadores y pueden ser definidos como un componente natural que modula el sistema inmune y que se ve reflejado por el incremento de la resistencia del hospedero contra enfermedades que son causadas por patógenos. El uso de inmunoestimulantes como suplementos dietéticos, puede mejorar la defensa innata de los organismos y ofrecer resistencia a agentes patógenos en los períodos de alto estrés (Bricknell & Dalmo, 2005).

La utilización de bacterias probióticas, basado en el principio de exclusión competitiva de patógenos, y la utilización de la inmunoestimulación como forma natural de defensa de los camarones, son dos de los métodos preventivos más prometedores y controversiales de los últimos tiempos (Gullian, 2001).

Los inmunoestimulantes son sustancias de diverso origen que tienen la capacidad de regular o modificar la respuesta inmune, por lo que también se les conoce como inmunomoduladores o inmunopotenciadores y pueden ser definidos como un componente

natural que modula el sistema inmune y que se ve reflejado por el incremento de la resistencia del hospedero contra enfermedades que son causadas por patógenos. El uso de inmunoestimulantes como suplementos dietéticos, puede mejorar la defensa innata de los organismos y ofrecer resistencia a agentes patógenos en los períodos de alto estrés (Bricknell & Dalmo, 2005).

Como todo invertebrado, el sistema inmunológico de los camarones peneidos esta mediado por los hemocitos (hialinos, granulares, y semi-granulares) quienes poseen capacidad citotóxica y comunicación intercelular que les facilita las funciones de coagulación, reconocimiento, fagocitosis, melanización, formación de nódulos y encapsulación (Aguirre-Guzmán *et al.*, 2009). El sistema inmune de los camarones cuenta también con la presencia de varios componentes plasmáticos (péptidos antimicrobianos, histonas, enzimas lisosomales, lipopolisacáridos, proteínas de reconocimiento a glucanos), sistema profenoloxidasa, y la cascada de coagulación que favorece la destrucción de los patógenos (Zhen *et al.*, 2010).

Microorganismos y/o sus derivados (lipopolisacáridos, péptidoglicanos, laminarina, y β -glucano) han sido empleados para activar el sistema inmune de los camarones y entender los mecanismos de funcionamiento del mismo (Vici *et al.*, 2000). El suministro de estos productos con el alimento o aplicados en forma directa (inyección, inmersión, bio-encapsulación, o intubación) sugiere que pueden ser usados como una medida de protección en contra de los patógenos que afectan al camarón (Robles *et al.*, 1998).

Muchos mecanismos de defensa celulares en los crustáceos dependen de la producción controlada de radicales libres durante la fagocitosis y encapsulación (Muñoz *et al.*, 2000). Como respuesta al estrés oxidativo al que pueden estar expuestos los organismos, el metabolismo aerobio de los crustáceos genera sustancias reactivas al oxígeno que son eliminadas por un sistema de defensa antioxidante que incluye a la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), y peroxidasa (Muñoz *et al.*, 2000).

El presente estudio se enfocó en la medición de supervivencia, parámetros inmunológicos respuesta antioxidante en el camarón blanco, para determinar si estos compuestos pueden ser utilizados como indicadores de la activación del sistema inmune del camarón en respuesta a aditivos alimenticios y componentes de la pared celular de microorganismos como β -glucanos, así como de microorganismos patógenos y benéficos.

2.0 Materiales y Métodos

2.1 Preparación de los tratamientos.

2.1.1 Aislamiento de colonias presuntivas de *Vibrio* sp.

Se extrajeron los intestinos y hepatopáncreas de 6 camarones (juveniles de *L. vannamei*) enfermos y moribundos infectados con WSSV, los cuales se obtuvieron de una granja en Guasave, Sinaloa. Los tejidos se maceraron individualmente en tubos Eppendorf estériles con solución salina (NaCl) al 2.5%. Posteriormente, se sembraron por estría cruzada (30 μ L) en placas de Petri con Agar Tiosulfato Citrato Bilis Sacarosa (TCBS) con 2.5% de NaCl. Cada macerado se sembró por duplicado. Las placas se incubaron a 37 °C por 24 h. Las colonias verdes (no utilizan la sacarosa) aisladas se resembraron en un cultivo masivo en Tripticasa de Soya y Agar (TSA) con 2.5% de NaCl y se incubaron a 37°C por 24 h. Cada aislado de *Vibrio* presuntivo se almacenó a -80 °C en medio TSC con 15% (v/v) de glicerol.

2.1.2 Composición de la mezcla inmunoestimulante

Se usó una mezcla inmunoestimulante (MI) compuesta por 4 bacterias ácido lácticas y 1 levadura, previamente utilizada por Peraza-Gómez (2008) y Partida-Arangure (2009), la concentración de la mezcla utilizada fue de 2×10^6 UFC, en proporción 1:1:1:1? (es decir 4

x 10^5 UFC de cada aislado). Los aislados se conservan en el Departamento de Acuacultura CIIDIR-IPN (Unidad Sinaloa).

2.1.3 Incorporación de la mezcla inmunoestimulante (MI) al alimento balanceado

La mezcla de microorganismos previamente muertos por calor (70 °C) se incorporó al alimento balanceado (Camaronina[®]) utilizando como atrayente y ligante Dry Oil[®] (DO, Innovaciones Acuícolas S.A. de C.V.), siguiendo las instrucciones indicadas por el fabricante. También se impregnó de DO el alimento para el control sin la mezcla de microorganismos. El alimento se secó a temperatura ambiente durante 5 h, revolviendo manualmente cada hora y posteriormente se guardó en bolsas de plástico a 4 °C por 5 días.

2.1.4 Aditivos alimenticios

La vitamina E, el β -glucano de *Laminaria digitata* y el β -caroteno al 95% de pureza fueron adquiridos en Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA.

2.1.5 Preparación de dietas

Las dietas para camarones fueron formuladas con la ayuda del paquete MIXIT-Win^{MR} (Agricultural Software Consultants, Inc., San Diego, Ca., USA). Para la fabricación de las dietas se siguió la metodología empleada por Civera & Guillaume (1989). Se fabricó un alimento base (control) de acuerdo a los requerimientos nutricios reportados para camarón (Akiyama & Dominy, 1989), al cual se le adicionó el aditivo alimenticio a evaluar; la vitamina E se adicionó al 0.01%, el β -glucano se incorporó al alimento base a un nivel de inclusión del 0.1% y el β -caroteno al 0.01%. Se usó aceite de girasol para compensar el aporte lipídico de los pigmentos carotenoides. Para garantizar una granulometría uniforme

Campa, A. y A. Luna. 2011. Respuesta inmune en camarón blanco, *Litopenaeus vannamei*, expuesto a infecciones bacterianas y virales. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Hernández-Hernández, L. (Eds), Avances en Nutrición Acuicola XI - Memorias del Décimo Primer Simposio Internacional de Nutrición Acuicola, 23-25 de Noviembre, San Nicolás de los Garza, N. L., México. ISBN 978-607-433-775-4. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México, pp. 317-344.

y eliminar impurezas de cada ingrediente que pudiera afectar la composición final del alimento, fueron tamizados todos los ingredientes sólidos a través de un tamiz de 250 μm . Se mezclaron los macroingredientes (harina de pescado, pasta de soya, harina integral de trigo y gluten de trigo) y los microingredientes (premezclas de vitaminas, premezclas de minerales, vitamina C y fosfato dibásico de sodio) en una mezcladora (KITCHEN AID^{MR}) durante 20 minutos.

Paralelamente se hizo una emulsión con el aceite de hígado de bacalao, colesterol, aceite de girasol, lecitina de soya y BHT. En la emulsión de cada alimento se adicionó el aditivo correspondiente (β -caroteno, β -glucano y vitamina E). Se mezclaron los ingredientes secos con la emulsión durante 10 min y posteriormente se adicionó aproximadamente un 40% de agua del peso total de la masa del alimento. La masa obtenida fue extruída en tres ocasiones en un molino de carne (TORREY^{MR} Monterrey, N.L., México) hasta obtener pellets de 2 mm de diámetro, los cuales fueron cortados manualmente y secados a 40°C en una estufa con flujo de aire (VWR 1680 HAFO SERIES, USA) determinando la humedad periódicamente en una termobalanza (OHAUS MB200) hasta obtener aproximadamente un 8% de humedad de cada alimento. Para protegerlo de la luz y el calor los alimentos se empaquetaron en bolsas de plástico negras, etiquetadas y almacenadas en refrigeración (4°C) hasta su uso.

2.2. Bioensayos

2.2.1 Exposición de *L. vannamei* a *Vibrio* sp. y mezcla de probióticos

El experimento tuvo una duración de 21 días. Se utilizaron tinas de plástico con capacidad de 120 L con 80 L de agua de mar filtrada (20 μm) y aireación constante. En cada tina se colocaron 10 organismos con un peso aproximado de 8.1 ± 1.4 g. Se contó con 2 tratamientos control, los cuales se alimentaron con alimento + DO. Los organismos tratados con MI se alimentaron durante los primeros 6 días con el alimento adicionado con

Campa, A. y A. Luna. 2011. Respuesta inmune en camarón blanco, *Litopenaeus vannamei*, expuesto a infecciones bacterianas y virales. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Hernández-Hernández, L. (Eds), Avances en Nutrición Acuicola XI - Memorias del Décimo Primer Simposio Internacional de Nutrición Acuicola, 23-25 de Noviembre, San Nicolás de los Garza, N. L., México. ISBN 978-607-433-775-4. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México, pp. 317-344.

microorganismos, en 3 diferentes intervalos de frecuencia (diariamente, cada 3 días y cada 6 días). Durante los días intermedios se alimentaron con alimento + DO. En el día 7, los organismos de los tratamientos 2, 3, 4 y 5 se inyectaron con el inóculo de vibrios (LD₅₀) y el tratamiento 1 se inyectó con solución salina (2.5% NaCl). Los tratamientos quedaron de la siguiente manera: **1)** Camaronina + DO + 40 µL de solución salina (NaCl 2.5 %); **2)** Camaronina + DO+ 40 µL *Vibrio* LC₅₀; **3)** Camaronina + DO+ MI (diariamente) + 40 µL *Vibrio* LC₅₀; **4)** Camaronina + DO + MI (cada 3 días) + 40 µL *Vibrio* LC₅₀; **5)** Camaronina + DO + MI (cada 6 días) + 40 µL *Vibrio* LC₅₀. Los tratamientos se hicieron por triplicado. Los organismos se alimentaron al inicio a razón de 7% del peso corporal, 2 veces al día (09:00 y 17:00 h), siguiendo la tabla de alimentación de Purina. Se hizo un recambio del 50 % de agua cada 3 d. La limpieza diaria se hizo por sifoneo y el agua desechada se recuperó inmediatamente. Durante el experimento se registraron las variables fisicoquímicas del agua: temperatura, salinidad y oxígeno disuelto. Además, los organismos estuvieron sujetos a fotoperiodo natural. El análisis de los nutrientes (amonio, nitritos y nitratos) se realizó al inicio, a los 12 días y al final del experimento, se hizo por métodos químicos ya estandarizados internacionalmente (Strickland y Parsons, 1972), antes del recambio del 50 % de agua. Al final del experimento se tomaron muestras de hemolinfa para determinar los parámetros inmunológicos.

2.2.2 Exposición de *L. vannamei* a β -1,3 glucano, vitamina E y β -caroteno

Se prepararon 5 dietas experimentales y un control, el nivel de inclusión de cada inmunoestimulante que se utilizó, se estableció de acuerdo a experimentos anteriores en donde previamente se determinó la concentración que mejor estimula el sistema de defensa del camarón: Caroteno 0.01%, Glucano 0.1% (Flores-Leyva, 2006; Chang *et al.*, 2003), la vitamina E se suministró en un nivel de 0.01% (Fernández-Giménez *et al.*, 2004). Los organismos de 1.0-1.5 g de peso fueron distribuidos de manera aleatoria en las unidades

experimentales de 30 L de capacidad. En cada unidad se colocaron 10 juveniles, y cada dieta fue aleatoriamente asignada, se manejaron 4 réplicas por dieta. Los juveniles de *F. californiensis* durante 23 días previos al reto, fueron alimentados *ad libitum*, ajustando la cantidad diariamente en función del alimento consumido. Las condiciones de la calidad de agua en las que se mantuvieron fueron: temperatura $24\pm 1^{\circ}\text{C}$, salinidad: 35 ± 1 ups; oxígeno disuelto: >4 mg/L. Se hicieron recambios de agua diarios del 30%. Se registró diariamente la temperatura (termómetro de mercurio), el oxígeno (oxímetro YSI 55-12FT), pH (Potenciómetro Orión Research Sa250) y salinidad (refractómetro Sper Scientific 300011).

2.2.3. Infección experimental

Los camarones fueron infectados individualmente inyectando el inóculo viral en el cuarto segmento abdominal. El control negativo fue inoculado con buffer PBS. Posteriormente, se continuó con el programa regular de alimentación, incluyendo los tratamientos. Los muestreos se llevaron a cabo a las 0, 1, 6, 12, 24 y 48 h postinfección. Finalmente la selección de sobrevivientes a las 96 h post-infección.

2.3. Procesamiento de muestras

2.3.1 Obtención de hemolinfa

La hemolinfa se extrajo en el periodo de intermuda. La muestra se tomó en ayunas entre las 8:00 y 9:00 a.m. para evitar diferencias debidas al ciclo circadiano. La extracción de hemolinfa se realizó con jeringas para insulina (27G x 13 mm) de la parte ventral que comprende el primer segmento de los pleópodos, ligeramente anterior al poro genital. La jeringa se cargó con una solución isotónica para camarón y EDTA como anticoagulante (SIC- EDTA, Na_2) (NaCl 450 mM, KCl 10 mM, Hepes 10 mM + EDTA, Na_2 10 mM, pH

7.3, 850 mOsm/kg) previamente enfriado a 4 °C (Vargas-Albores *et al.*, 1993) en una proporción 2:1 (2 volúmenes de SIC-EDTA por cada volumen extraído de hemolinfa).

2.3.2 Conteo y separación de hemocitos

Se utilizó una cámara de Neubauer con una retícula de 0.01 mm para realizar el conteo de hemocitos. Se tomaron 50 µL de hemolinfa y se diluyeron en una solución de formol al 4% en una proporción 1:3 (v/v). A partir de esta dilución se realizaron 2 conteos en el microscopio. Para separar los hemocitos del plasma se centrifugó la muestra a 3000 x g, por 3 min, a 4 °C. Se separó el plasma del paquete celular. Las células se lavaron con 1 mL de SIC y se centrifugaron a 3000 x g, por 3 min, a 4 °C. Se adicionaron 600 µL de cacodilato de sodio 10 mM a pH 7 y se centrifugaron a 15 000 x g, durante 5 min, a 4 °C, para romper las células y obtener el contenido celular (sobrenadante del lisado de hemocitos, SLH). El SLH y el plasma se congelaron a -70 °C para la determinación de enzimas hidrolíticas y proteína.

2.3.3 Detección de la actividad de la lisozima

Se preparó una solución de 4 mg/mL de la bacteria liofilizada *Micrococcus luteus* (Sigma) en agua destilada y un búfer (Tris-HCl 50 mM, pH 5.2) con el cual se preparó agarosa al 1%. La agarosa fundida en el búfer se dejó reposar hasta que se enfrió a 40 °C. A 14 mL del búfer se le agregó 1 mL de la solución bacteriana y se mezcló. La mezcla se vació en una caja de Petri y se hicieron 8 pozos de 6 mm de diámetro, los cuales se llenaron con 30 µL de cada muestra de SLH, saliva de humano (diluida 1:9 en solución salina 0.1% NaCl) como control positivo y búfer como control negativo. Las muestras se incubaron por 48 h a 37 °C y se midió el diámetro del halo de lisis. Los resultados se expresaron en unidades (0.1

mm = 1 U) relacionadas a la proteína (U/mg de proteína). El análisis se realizó por triplicado (3 pozos por muestra).

2.3.4 Proteína

La concentración de proteína se determinó de acuerdo al método descrito por Bradford (1976), utilizando albúmina de suero bovino para construir una curva estándar.

2.3.5 Evaluación de enzimas antioxidantes

Para la determinación las enzimas catalasa y superóxido dismutasa, se seccionó del camarón el hepatopáncreas y los 2 primeros segmentos abdominales, los cuales fueron mantenidos en congelación a -20 °C hasta el momento de realizar los análisis. De acuerdo a Campa-Córdova *et al.* (2002), la enzima superóxido dismutasa (SOD), es considerada una molécula asociada a la modulación de la respuesta inmune en crustáceos. Para esto, se maceraron aproximadamente 100 mg de tejido (hepatopáncreas y músculo) en 1 mL de buffer fosfatos (50 mM pH 7.0), este extracto crudo se almacenó a -80°C y posteriormente fue utilizado en la determinación de la actividad enzimática. La actividad de SOD se determinó de acuerdo al método descrito por Beauchamp & Fridovich (1971), utilizando NBT en presencia de riboflavina. La actividad específica será calculada en unidades por mg de proteína, utilizando un programa de computadora (Vázquez-Juárez *et al.*, 1993). La actividad enzimática relativa se expresó como la tasa de actividad enzimática de camarones tratados con respecto a la actividad de camarones del control y fue usado como un índice de la actividad de MnSOD. La actividad de la enzima catalasa se determinó utilizando el método Downs *et al.* (2001), El peróxido de hidrógeno (H₂O₂) es el sustrato de la catalasa, la actividad se determinó sobre la base del cambio de la absorbancia a 240 nm durante 3 min. El cálculo de la actividad se realizó con el empleo del coeficiente de extinción del

H_2O_2 igual a $0.04 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Se define la unidad de actividad enzimática como la cantidad de enzima que cataliza la transformación de un μmol de H_2O_2 por minuto bajo las condiciones del ensayo.

2.4. Análisis estadístico

Los resultados de supervivencia para el IV experimento se sometieron a análisis de varianza, previa transformación de los porcentajes de supervivencia por medio de arcoseno $\sqrt{\%/100}$ para normalizar su distribución. Posteriormente, se hicieron análisis de varianza de un vía (ANOVA). Los valores $P < 0.05$ fueron considerados significativamente diferentes. Cuando se presentaron diferencias significativas, se utilizó un análisis *a posteriori*, usando la prueba de Tukey (HSD) para identificar la naturaleza de estas diferencias ($p < 0.05$).

3.0 Resultados

3.1 Supervivencia de *L. vannamei* tratados con una mezcla de probióticos y con exposición de *Vibrio* sp.

En la figura 1 se observa la supervivencia final. Los resultados muestran un 100 % de supervivencia para el tratamiento I (Control I; Camaronina+ DO + Solución salina 2.5 % NaCl). El tratamiento II (Control II; Camaronina + DO + LC_{50} de vibrios) mostró una supervivencia de 70 %. El tratamiento III (Camaronina + DO + MPI diariamente + LC_{50} de vibrios) presentó un 90 % de supervivencia. El tratamiento IV (Camaronina + DO + MPI cada 3 días + LC_{50} de vibrios) presentó una supervivencia de 93.3 %. El tratamiento V (Camaronina + DO + MPI cada 6 días + LC_{50} de vibrios) mostró un 86.7 % de supervivencia. La supervivencia en el tratamiento I fue significativamente diferente con los tratamientos II (control II, $p < 0.003$) y V (MPI cada 6 días, $p < 0.03$), pero no con los tratamientos III y IV (MPI diario y cada 3 días, $p > 0.05$). Se presentaron diferencias

significativas entre la supervivencia del tratamiento II y el tratamiento IV ($p < 0.02$). No hubo diferencias significativas entre los tratamientos a los cuales se alimentó con la Mezcla con Potencial Inmunoestimulante con diferente frecuencia.

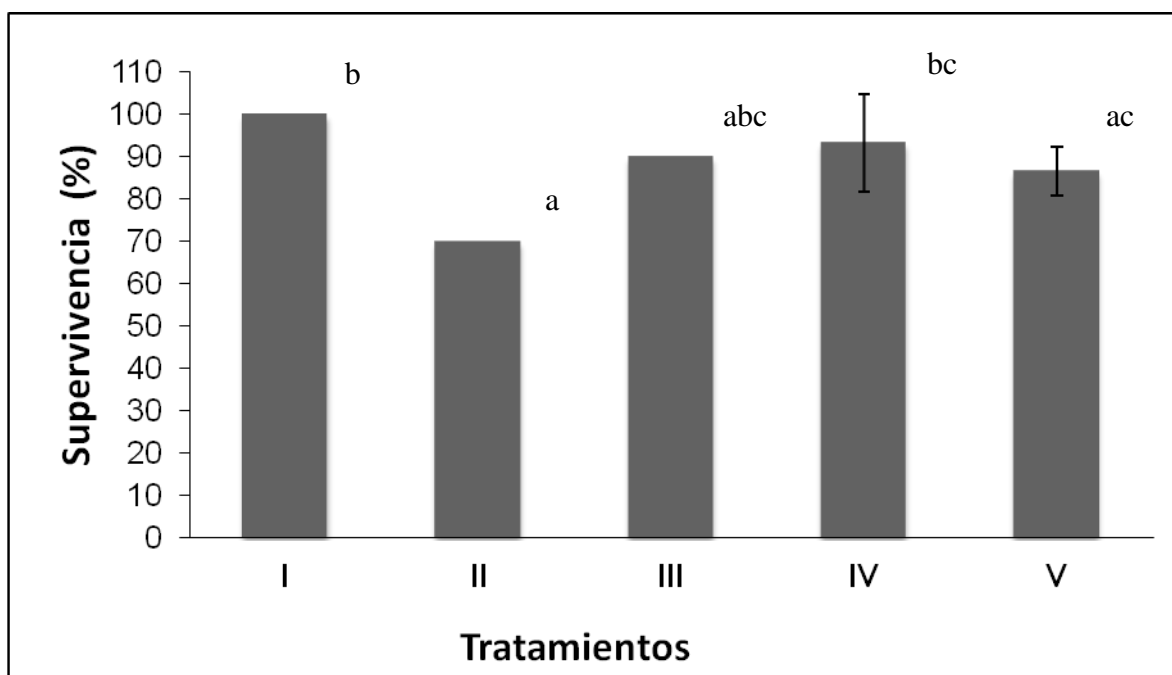


Figura 1. Supervivencia final de *Litopenaeus vannamei* en la evaluación del efecto de microorganismos con potencial inmunoestimulante en infecciones con vibrio(s) patógeno(s). Tratamientos: I) Control I, Camaronina + DO + Solución salina 2.5 % NaCl; II) Control II, Camaronina + DO + LC₅₀ de vibrios; III) Camaronina + DO + MPI diariamente + LC₅₀ de vibrios; IV) Camaronina + DO + MPI cada 3 días + LC₅₀ de vibrios y V) Camaronina + DO + MPI cada 6 días + LC₅₀ de vibrios). Letras diferentes muestran diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$). Las barras de error indican el promedio \pm DE.

3.2 Conteo de hemocitos totales

En la figura 2 se observa el número promedio de hemocitos totales en cada uno de los tratamientos. En el tratamiento I (Control I; Camaronina+ DO + Solución salina 2.5 % NaCl), el número promedio de hemocitos totales fue de $19.9 \times 10^6 \pm 2.0 \times 10^6$; en el tratamiento II (Control II; Camaronina + DO + LC₅₀ de vibrios) fue de $13.8 \times 10^6 \pm 1.0 \times 10^6$; en el tratamiento III (Camaronina + DO + MPI diariamente + LC₅₀ de vibrios) fue de $24.0 \times 10^6 \pm 3.0 \times 10^6$; en el tratamiento IV (Camaronina + DO + MPI cada 3 días + LC₅₀ de vibrios) fue de $21.1 \times 10^6 \pm 3.0 \times 10^6$ y en el tratamiento V (Camaronina + DO + MPI cada 6 días + LC₅₀ de vibrios) fue de $17.6 \times 10^6 \pm 2.0 \times 10^6$. En el tratamiento III, el número de hemocitos totales fue significativamente diferente al tratamiento II ($p < 0.05$), pero no así entre los demás tratamientos ($p > 0.05$).

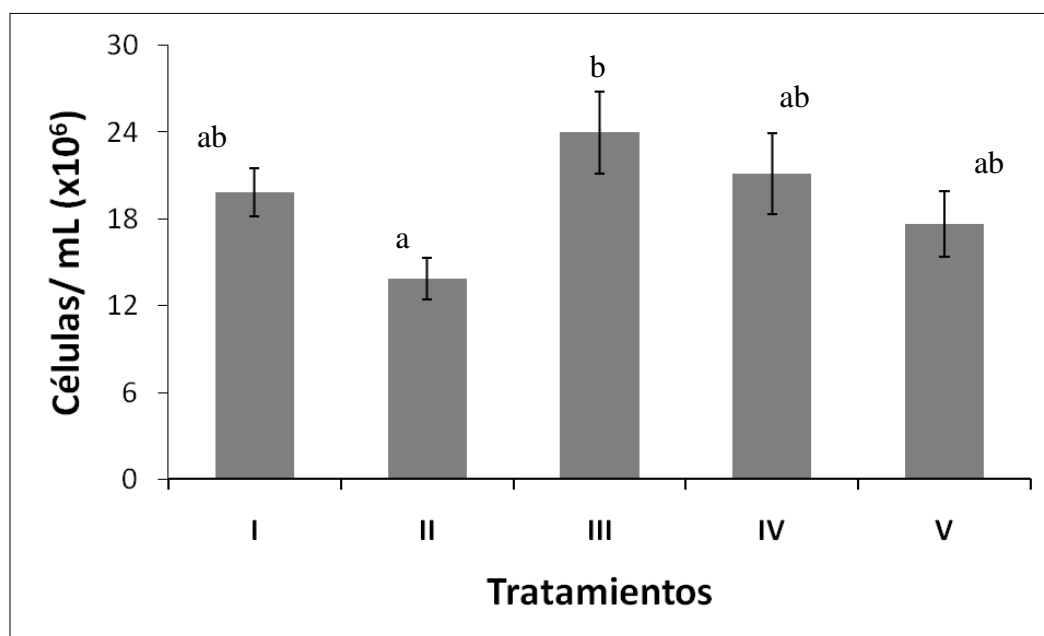


Figura 2. Conteo de hemocitos totales en *L. vannamei*. Tratamientos: I) Control I, Camaronina + DO + Solución salina 2.5 % NaCl; II) Control II, Camaronina + DO + LC₅₀ de vibrios; III) Camaronina + DO + MPI diariamente + LC₅₀ de vibrios; IV) Camaronina + DO + MPI cada 3 días + LC₅₀ de vibrios y V) Camaronina + DO + MPI cada 6 días + LC₅₀ de vibrios). Letras diferentes muestran diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$). Las barras de error indican el promedio \pm EE.

3.3 Determinación de Proteína

La determinación de la proteína se hizo tanto en plasma como en el Sobrenadante Lisado de Hemocitos (SLH). El tratamiento I), camarones alimentados con la dieta control y no infectado con vibrios presentó una concentración promedio de 29.34 ± 2.96 y 0.14 ± 0.02 mg/mL para plasma y SLH, respectivamente; II) para los camarones alimentados con la dieta control e infectados con vibrios fue de 13.16 ± 0.14 y 0.21 ± 0.01 mg/mL para

plasma y SLH, respectivamente; III) para los camarones alimentados diariamente con camaronina adicionada con la MPI fue de 40.69 ± 3.69 y 0.17 ± 0.01 mg/mL para plasma y SLH, respectivamente; IV) para los camarones alimentados cada 3 días con camaronina adicionada con la MPI fue de 32.58 ± 2.19 y 0.08 ± 0.00 mg/mL para plasma y SLH, respectivamente y V) para los camarones alimentados cada 6 días con camaronina adicionada con la MPI fue de 31.17 ± 10.40 y 0.13 ± 0.02 mg/mL para plasma y SLH, respectivamente (Fig. 3).

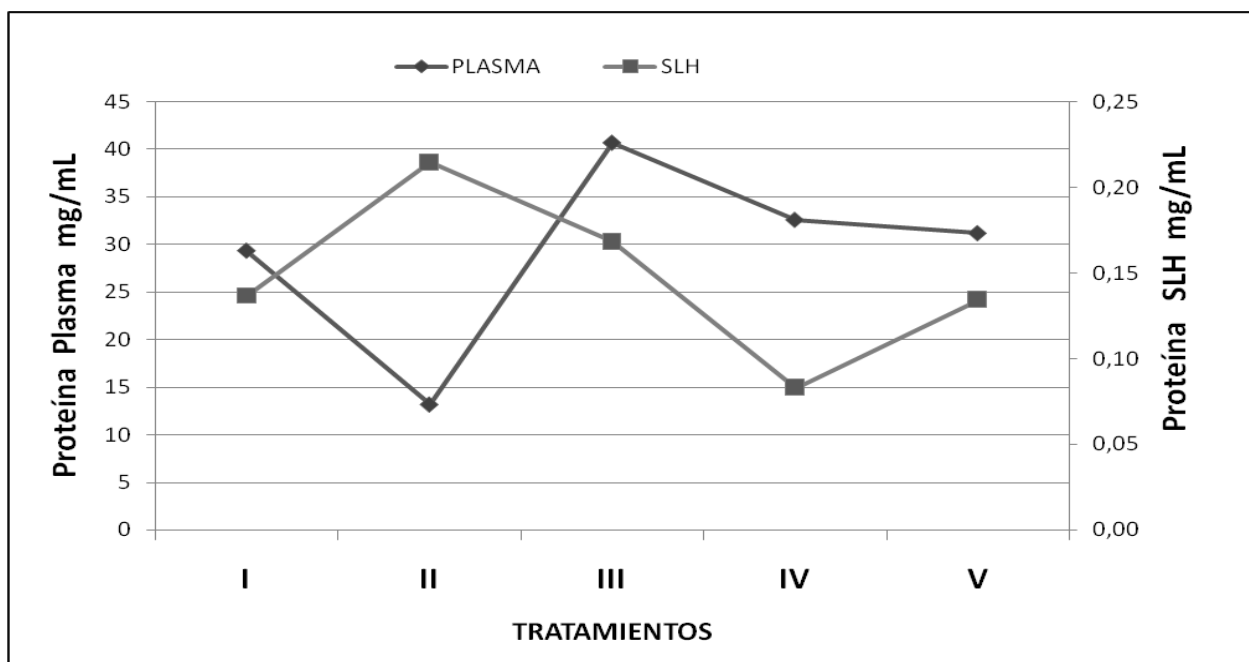


Figura 3. Concentración de proteína en plasma y SLH de *Litopenaeus vannamei*. Tratamientos: I) Control I, Camaronina + DO + Solución salina 2.5 % NaCl; II) Control II, Camaronina + DO + LC50 de vibrios; III) Camaronina + DO + MPI diariamente + LC50 de vibrios; IV) Camaronina + DO + MPI cada 3 días + LC50 de vibrios y V) Camaronina + DO + MPI cada 6 días + LC50 de vibrios).

La figura 4 muestra los organismos alimentados con vitamina E y los organismos del grupo control alcanzaron el 100% de mortalidad a las 72 h después de la infección.

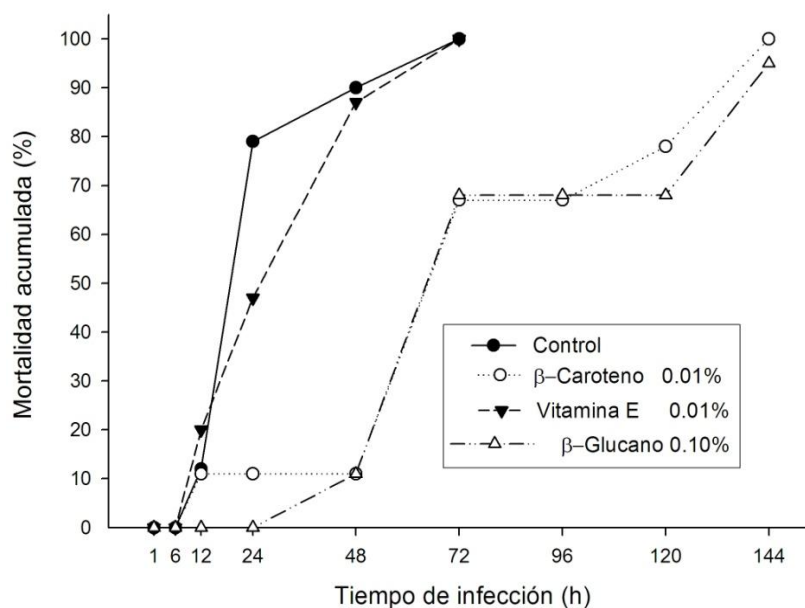


Figura 4. Mortalidad (%) de juveniles de *Litopenaeus vannamei* infectados con WSSV. Los camarones fueron alimentados previamente con β -caroteno, β -1,3 glucano y vitamina E durante 23 días.

3.4. Conteo total de hemocitos

Durante este experimento se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) en el CTH en todos los tiempos de muestreo (Figura 5). Después de 1 h postinfección se observó una mayor concentración de hemocitos en camarones alimentados con los tratamientos experimentales que en el control. Sin embargo, es a las 6 h donde se registró una caída drástica en la concentración en todos los tratamientos junto con el control. En los

organismos tratados con β -caroteno a las 12 h se observó la mayor concentración de hemocitos con respecto a los demás tratamientos y el control. En general los organismos alimentados con β -glucano y β -caroteno registraron las mayores concentraciones de hemocitos durante todo el experimento, siendo las 12 y 48 h donde observaron las mayores concentraciones para β -caroteno y β -glucano respectivamente.

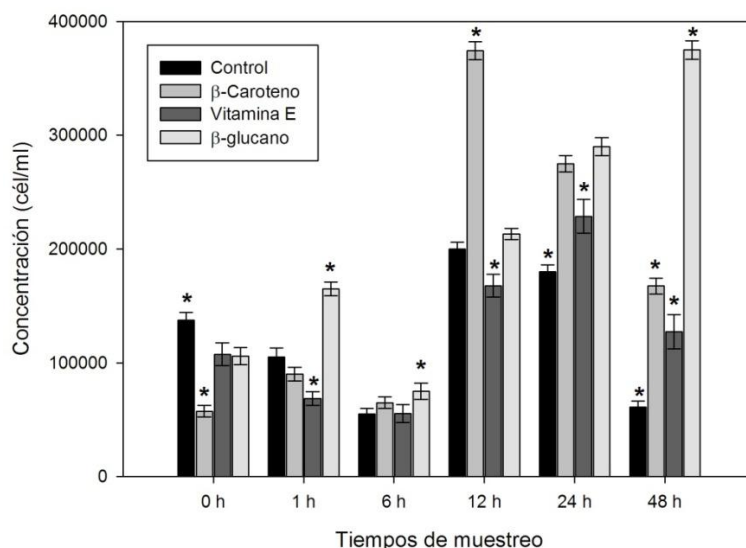


Figura 5. Representación grafica del comportamiento de la concentración de hemocitos, en cada uno de los tratamientos y el control, durante el reto con WSSV. Barras verticales = error estándar; *diferencias significativas ($p < 0.05$).

3.5 Actividad de enzimas antioxidantes

En hepatopáncreas se observó un incremento significativo ($p < 0.05$) en la actividad relativa de SOD (RSOD) a las 12 h posteriores a la infección, se registró una mayor actividad RSOD (2 veces más) en camarones alimentados con los 3 tratamientos con respecto al control (Figura 6a). Mientras que a las 24 h, sólo se registraron diferencias significativas ($p < 0.05$) en la actividad RSOD en los camarones alimentados con vitamina E y β -glucano.

Al tiempo 0 (antes de la infección) se observó un incremento significativo en la actividad de RSOD en músculo de camarones alimentados con β -caroteno (Figura 6b). Aunque no se observaron diferencias significativas a la 1 y 6 h post infección, la actividad RSOD de los organismos alimentados con β -glucano se fue incrementando de manera gradual y es a las 12 h donde se observa un incremento significativo en camarones alimentados tanto con β -glucano como con vitamina E. A las 24 h todos los organismos tratados presentan diferencias significativas con respecto al control. Mientras que a las 48 h sólo los camarones alimentados con β -glucano y con vitamina E mantuvieron diferencias significativas ($p < 0.05$) con el control.

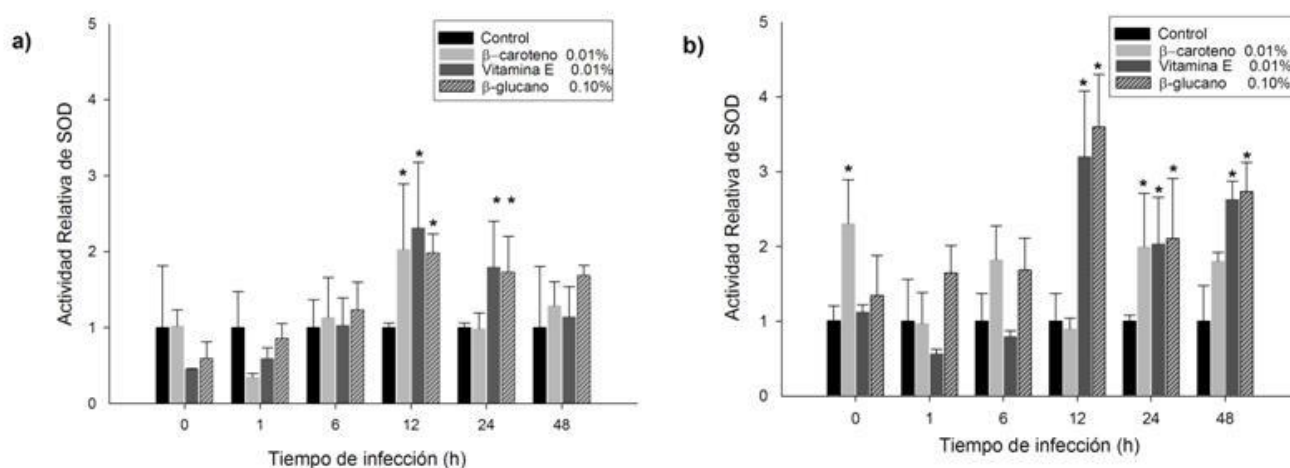


Figura 6. Actividad relativa de SOD en hepatopáncreas (a) y músculo (b) de juveniles de *Litopenaeus vannamei* infectados con WSSV. La dieta de los camarones fue suplementada con β -caroteno, β -1,3 glucano y vitamina E durante 23 días antes del reto con WSSV.

*Significativamente diferente al grupo control ($p < 0.05$).

La actividad relativa de CAT en hepatopáncreas fue significativamente mayor ($p < 0.05$) en los camarones tratados con vitamina E y β -1,3-glucano al final del periodo de inmunoestimulación (0 h) (Figura 7a). En los camarones alimentados con β -1,3-glucano se

observa una respuesta de CAT más temprana, que mantiene durante las 12 h postinfección, cayendo la actividad a las 24 y 48 h. En el músculo, la actividad de CAT se incrementa significativamente ($p<0.05$) en todos los tratamientos a la 1 h posterior al reto con WSSV (Figura 7b). La mayor actividad de la enzima se observa a las 12 y 24 h en organismos tratados con vitamina E (hasta 3 veces más con respecto al control). En todos los tratamientos se registra una disminución de CAT a las 24 h. Sin embargo, a las 48 h se observó un leve incremento en la actividad en organismos tratados con β -1,3-glucano en relación al control y el resto de los tratamientos.

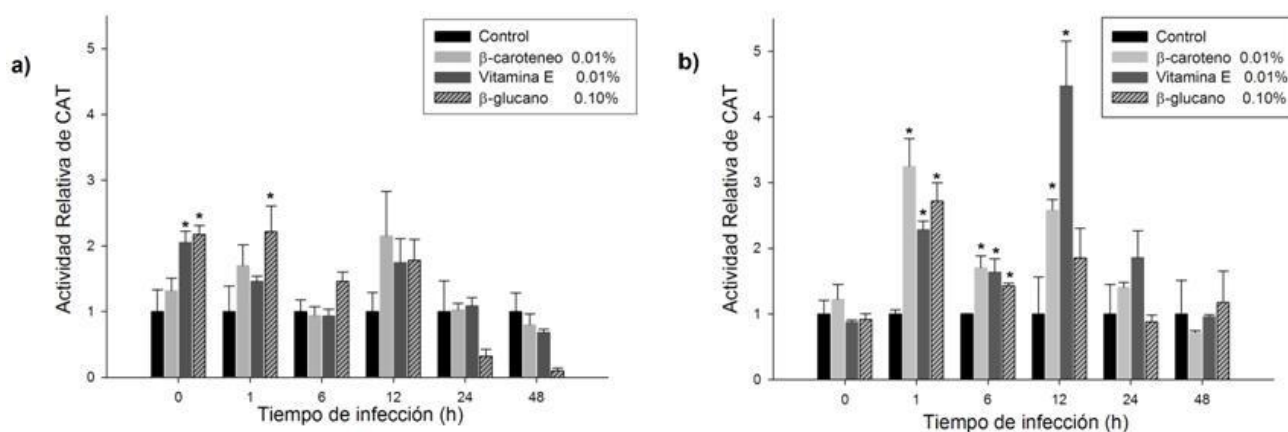


Figura 7. Actividad relativa de CAT en hepatopáncreas (a) y músculo (b) de juveniles de *Litopenaeus vannamei* infectados con WSSV. La dieta de los camarones fue suplementada con β -caroteno, β -1,3- glucano y vitamina E durante 23 días antes del reto con WSSV.

* Significativamente diferente al grupo control ($p<0.05$).

4.0 Discusión

En el experimento con juveniles de camarón expuestos a vibrios, la supervivencia fue significativamente mayor en el tratamiento donde los camarones fueron infectados con

vibrios y alimentados con la mezcla inmunoestimulante (cada 3 días) respecto del tratamiento II donde los camarones fueron infectados con vibrio solamente. Respecto a lo encontrado en nuestro trabajo, Chang *et al.* (1999) encontraron una mayor supervivencia en postlarvas alimentadas con β -glucano y desafiadas con WSSV con respecto a las poslarvas alimentadas sin el inmunoestimulante y retadas con el mismo virus. Además, Coutteau *et al.* (2001) mencionan que al adicionar un inmunoestimulante comercial en el alimento, éste mejora la supervivencia de *L. stylirostris* después de una infección experimental con *V. penaeicida*.

Con respecto al conteo de hemocitos totales, se observó un efecto inmunoestimulante de la MI a una concentración de 2×10^6 UFC/g, en el tratamiento que fue alimentado diariamente con ella, mostrando una mejor respuesta a la infección producida por vibrios. Le Moullac *et al.* (1998) mencionan que los individuos que tengan en circulación una alta cantidad de hemocitos resistirán mejor la presencia de un patógeno. A pesar de que en este experimento no se obtuvieron diferencias significativas con respecto al control alimentado solo con Camaronina + Dry OiL, si se observó un aumento en el número de hemocitos totales cuando se alimento con la MI, y este a su vez se incremento conforme se redujo el intervalo de tiempo entre las dosis. Peraza-Gómez (2008) menciona que el aumento en el número de hemocitos pudo ser inducido por componentes de la pared celular de la mezcla inmunoestimulante (peptidoglucanos de las BAL y β -glucanos de la levadura). Rodríguez *et al.* (2007) describen un incremento en el número total de hemocitos al adicionar β -1,3/1,6-glucanos en la dieta por lo menos 15 días antes de la infección con el virus WSSV.

La MI administrada cada 3 días mejoró significativamente la supervivencia de los camarones respecto al control II. Sin embargo, no hubo diferencias respecto al número de hemocitos debido a la lisis causada por los vibrios y a la falta de estimulación diaria. Por otro lado, la MI administrada diariamente incrementó significativamente los hemocitos respecto al control II; sin embargo, no mejoró la supervivencia. Lo anterior pudo deberse a un agotamiento en el sistema inmune debido a que los camarones se inmunoestimularon

durante 21 días. Sajeevan *et al.* (2006) observaron un efecto parecido en la supervivencia de *Fenneropenaeus indicus* alimentado con una dieta suplementada con glucanos, donde el mejor tratamiento fue al que se alimentó cada 7 días con dicha dieta, ellos obtuvieron una disminución en la supervivencia relacionada con la frecuencia de la dosis, es decir, si aumentaba o disminuía.

La actividad de la lisozima en el plasma fue mayor en el tratamiento II infectado con *Vibrio* con respecto al tratamiento I no infectado, ambos alimentados con la dieta control. Las lisozimas de los peneidos se encuentran bien caracterizadas y han mostrado tener actividad lítica contra diferentes especies de bacterias Gram positivas y Gram negativas, incluyendo especies patógenas de *Vibrio* (Hikima *et al.*, 2003; de-la-Re-Vega *et al.*, 2006).

El uso de aditivos alimenticios en la dieta con el propósito de proporcionar un mayor crecimiento o incrementar la respuesta del sistema inmune, es una práctica que día a día es más común en la industria alimenticia del cultivo del camarón. La genómica funcional o nutrigenómica utiliza como herramientas a la genómica, transcriptómica, proteómica y metabolómica, y también a la bioinformática para la investigación nutricional (van Ommen & Stierum, 2002). El objetivo de la nutrigenómica es precisamente determinar el efecto que estos aditivos incluidos en la dieta tienen sobre el genoma de un individuo, e intenta relacionar el resultado de diferentes fenotipos a diferencias en la respuesta celular y/o genética del sistema biológico (Mutch *et al.*, 2005). En la investigación nutricional acuícola, la integración de estas herramientas de investigación apenas ha iniciado. Empezando por la exploración del genoma de algunas especies de peces como el pez cebra (*Danio rerio*), y peces de importancia comercial como el pez japonés medaka (*Oryzias latipes*), pez globo (*Fugu rubripes*) y últimamente la secuenciación del crustáceo *Daphnia pulex*, estos estudios son muy recientes en comparación con investigaciones de nutrigenómica realizadas en mamíferos.

En la presente investigación se usaron como aditivos alimenticios β -1,3-glucano, β -caroteno y vitamina E, se estudió su capacidad de incrementar respuestas de defensa del sistema inmune innato en músculo y hepatopáncreas del camarón blanco (*L. vannamei*). Existen diferentes métodos que han sido utilizados como indicadores para conocer el estado de salud o enfermedad de los camarones (Rodríguez & LeMoullac, 2000; Chang *et al.*, 2003). Durante el desarrollo de este trabajo se evaluaron variables de campo tales como la determinación de crecimiento en peso y mortalidad acumulada, y parámetros inmunológicos como son el conteo total de hemocitos (CHT) y enzimas antioxidantes (CAT y SOD). En cuanto a las variables de campo, se encontraron diferencias significativas en la ganancia en peso y mortalidad acumulada en camarones después de 23 días de alimentación con 0.01% de β -caroteno, estos resultados difieren de los resultados reportados por Supamattaya *et al.* (2005), quienes no encontraron diferencias significativas en la ganancia en peso ni en la supervivencia de *P. monodon*, en su investigación ellos utilizaron 2 niveles de inclusión 0.012% y 0.02% en el alimento. Así mismo Flores-Leyva (2006) quien utilizó un nivel de inclusión del 0.01% de β -caroteno, no encontró diferencias significativas en las tasas de crecimiento, ni en el conteo total de hemocitos, sin embargo si obtuvo una menor mortalidad acumulada (30%) a las 72 h con respecto al control (50%) durante un reto con WSSV en *L. vannamei*.

En el presente trabajo, la mayor mortalidad acumulada se registró en los organismos del control y los del tratamiento con vitamina E en donde se registró el 100% de mortalidad a las 72 h. De igual forma, los camarones alimentados con vitamina E tuvieron el menor rendimiento en peso (3.04 g) y una menor concentración de hemocitos totales con respecto a los demás tratamientos. Nuestros resultados contrastan con lo reportado por Lee & Shiau (2004), quienes aseveran que un nivel de inclusión de 0.008-0.01% de vitamina E en dietas, maximizan el crecimiento y las respuestas inmunes no específicas de *P. monodon*. Esta discrepancia en los resultados se debe posiblemente a los diferentes requerimientos de

vitamina E que tienen ambas especies. El nivel de inclusión que se utilizó para este trabajo, se basó en los requerimientos de vitamina para *L. vannamei*. He *et al.* (1992), confirmaron lo encontrado en el presente trabajo, ellos reportan tasas de crecimiento y supervivencia significativamente más bajas cuando las dietas de camarones son deficientes en vitamina E. Con el tratamiento de β -1,3-glucano hubo una mayor resistencia de los organismos al finalizar el experimento que fue al séptimo día, los cuales fueron analizados por PCR, dando positivo para WSSV. Con este resultado se infiere que hubo una resistencia en estos organismos a la infección (Figura 4). Los β -1,3-glucanos han sido utilizados para aumentar la resistencia en crustáceos en contra de infecciones tanto bacterianas como virales (Dalmo & Bogwald, 2008). La administración de β -1,3-glucano ha probado que aumenta la supervivencia de *P. monodon* cuando es retado con WSSV, las mortalidades son significativamente más bajas que en los controles (Chang *et al.*, 2000, 2003). También su efecto se ve reflejado en la concentración de hemocitos totales; López *et al.* (2003), observaron un incremento en la concentración de hemocitos totales en camarones alimentados con dietas suplementadas con β -glucano con respecto a dietas con otros aditivos y el control. Lo anterior concuerda con los resultados obtenidos en la presente investigación; los camarones alimentados con el tratamiento de β -1,3-glucano mantuvieron en general la mayor concentración de hemocitos totales en el transcurso del experimento, sólo se registró una caída rápida de la concentración a las 6 h seguida de una recuperación en las horas posteriores de muestreo. De acuerdo a Söderhäll *et al.* (2003), esta caída se debe a la agregación celular en el interior del organismo, esta pérdida severa genera una acelerada maduración de precursores de hemocitos, seguido de la liberación de nuevas células en el sistema de circulación. Los hemocitos tienen un papel importante en la defensa celular, un número más bajo de lo normal de hemocitos circulantes en crustáceos, está correlacionado con una resistencia reducida a patógenos (Le Moullac & Haffner, 2000).

Referencias bibliográficas

- Aguirre-Guzmán G, Sánchez-Martínez J.G, Campa-Córdova A.I, Luna-González A, Ascencio F. (2009) Penaeid shrimp immune system: A Minireview. *Thai Journal of Veterinary and Medicine* **39**, 205-215.
- Akiyama, D.M. & W.G. Dominy. 1989. Penaeid shrimp nutrition for the comercial feed industry. p. 20 In: Texas Shrimp Farming Manual, Vol. 1: Grow-out Technology. Texas Agricultural Extension Service and Texas A&M University, Sea Grant College Program.
- Beauchamp, C. & I. Fridovich. 1971. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.* 44: 276–286.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248–54.
- Bricknell, I. y R.A. Dalmo. 2005. The use of immunostimulants in fish larval aquaculture. *Fish & Shellfish Immunology* 19 (5):457-472.
- Campa-Córdova A.I., Hernández-Saavedra N.Y., Philippis R. De, Ascencio F. (2002) Generation of superoxide anion and SOD activity in haemocytes and muscle of American white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) as a response to β -glucan and sulphated polysaccharide. *Fish & Shellfish Immunology* **12**, 353-366.
- Chang, C.F; M.S. Su; H.Y. Chen; C.F. Lo y I.C. Liao. 1999. Effect of dietary β -1,3-glucan on resistance to white spot syndrome virus (WSSV) in postlarval and juvenil *Penaeus monodon*. *Diseases of Aquatic Organisms* 36: 163-168.
- Chang, C.F., Chen, H.Y., Su, M.S., Liao, I.C. 2000. Immunomodulation by dietary β -1,3-glucan in the brooders of the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Fish Shellfish Immunol* 10: 505–514.
- Chang, C.F., M.S. Su, H.Y. Chen & I.C. Liao. 2003. Dietary β -1,3-glucan effectively improves immunity and survival of *Penaeus monodon* challenged with white spot syndrome virus. *Fish Shell. Immunol.* 15: 297-310.
- Civera, R. & Guillaume, J. 1989. Effect of sodium phytate on growth and tissue mineralization of *Penaeus japonicus* and *Penaeus vannamei* juveniles. *Aquaculture* 77: 145-156.
- Coutteau, P.; S. Ceulemans; L. Chim; D. Saulnier y P. Lemaire. 2001. Improved nutrition enhances immune competence, disease resistance in penaeid shrimp. *Global Aquaculture Advocate* 4(5):
- Dalmo, R.A. & Bogwald, J. 2008. β -glucans as conductor of immune symphonies. *Fish Shellfish Immunol*, 25: 384-396.

Campa, A. y A. Luna. 2011. Respuesta inmune en camarón blanco, *Litopenaeus vannamei*, expuesto a infecciones bacterianas y virales. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Hernández-Hernández, L. (Eds), Avances en Nutrición Acuicola XI - Memorias del Décimo Primer Simposio Internacional de Nutrición Acuicola, 23-25 de Noviembre, San Nicolás de los Garza, N. L., México. ISBN 978-607-433-775-4. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México, pp. 317-344.

- de-la-Re-Vega, E., A. García-Galaz, M.E. Díaz-Cinco y R.R. Sotelo-Mundo. 2006. White shrimp (*Litopenaeus vannamei*) recombinant lysozyme has antibacterial activity against Gram negative bacteria: *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio cholerae*. *Fish Shellfish Immunol.* 20:405-8.
- Downs C., Fauth J. E. & Woodley C. M. (2001). Assessing the health of grass shrimp (*Palaeomonetes pugio*) exposed to natural and anthropogenic stressors: a molecular biomarker system. *Marine Biotechnology* 3, 380-397.
- Fernández-Giménez, A., J. Fenucci & A. Petriella. 2004. The effect of vitamin E on growth, survival and hepatopancreas structure of the Argentine red shrimp *Pleoticus muelleri* Bate (Crustacea, Penaeidea). *Aquac. Res.* 35: 1172-1178.
- Flores -Leyva, L. 2006. Evaluación de pigmentos carotenoides como aditivos alimentarios para la prevención de infecciones producidas por el virus del Síndrome de la Mancha Blanca (WSSV) y la bacteria *Vibrio harveyi* en camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. Tesis de Maestría. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. La Paz, BCS, México.
- Goarant, C.; Y. Reynaud; D. Ansquer; S. Decker; D. Saulnier y F. Le Roux. 2006. Molecular epidemiology of *Vibrio nigripulchritudo*, a pathogen of cultured penaeid shrimp (*Litopenaeus stylirostris*) in New Caledonia. *Systematic and Applied Microbiology* 29: 570-580.
- Gullian, M. 2001. Estudio del efecto inmunoestimulante de bacterias probióticas asociadas al cultivo de *Penaeus vannamei*. ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DEL LITORAL. Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar. Tesis de maestría. 54 pp.
- He, H., Lawrence, A.L., Liu, R. 1992. Evaluation of dietary essentiality of fat-soluble vitamins, A, D, E and K for penaeid shrimp (*Penaeus vannamei*). *Aquaculture*. 103: 177-185.
- Hikima, S.; J. Hikima; J. Rojtinakorn; I. Hirono y T. Aoki. 2003. Characterization and function of kuruma shrimp lysozyme possessing lytic activity against *Vibrio* species. *Gene*; 316:187-95.
- Jayasree, L.; P. Janakiram y R. Madhavi. 2006. Characterization of *Vibrio* spp. Associated with Diseased Shrimp from Culture Ponds of Andhra Pradesh (India). *Journal of the World Aquaculture Society*.
- Lee, M.H. & Shiau, S.Y. 2003. Increase of dietary vitamin C improves haemocyte respiratory burst response and growth of juvenile grass shrimp, *Penaeus monodon*, fed with high dietary copper. *Fish Shellfish Immunol.* 14: 305–315.
- Le Moullac, G.; L.P. De Laborie; D. Saulnier; C. Goarant y M. Dehasque. 1998. Principles and problems involved in the evaluation of immunostimulants on juvenile shrimp. En: R.C. Cerecedo; B.M.

- Claudia; J. Pérez-Estrada; L.E. Suarez & M.D. Ricque (eds). Avances de Nutrición Acuícola. Memorias del IV Symposium International de Nutrición Acuícola, La Paz, B.S.C, México 1-12.
- Le Moullac, G. & Haffner, P. 2000. Environmental factors affecting immune responses in crustacea. *Aquaculture* 191: 123-132.
- López, E., Cuzon, G., Gaxiola, G., Taboada, G., Valenzuela, G., Pascual, C., Sánchez, A., Rosas, C. 2003. Physiological, nutritional, and immunological role of dietary h 1-3 glucan and ascorbic acid 2-monophosphate in *Litopenaeus vannamei* juveniles. *Aquaculture* 224: 223-243.
- Muñoz, M., Cedeno, R., Rodríguez, J., Van der Knaap, W., Mialhe, E., Bachere, E., 2000. Measurement of reactive oxygen intermediate production in hemocytes of penaeid shrimp, *Penaeus vannamei*, *Aquaculture* 191, 89-107.
- Mutch, D.M, Wahli, W., Williamson, G. 2005. Nutrigenomics and nutrigenetics: the emerging faces of nutrition. *FASEB J* 19: 1602-1616.
- Robles R., Sorgeloos P., Van Duffel H. & Nelis H. (1998) Progress in biomedication using live foods. *Journal of Applied Ichthyology* **14**, 207-212.
- Rodríguez, J., LeMoullac, G., 2000. State of the art of immunological tools and health control of penaeid shrimp. *Aquaculture* 191, 109-119.
- Rodríguez J., Y. Espinosa, F. Echeverría, G. Cárdenas, R. Román, y S. Stern. 2007. Exposure to probiotics and β -1,3/1,6-glucans in larviculture modifies the immune response of *Penaeus vannamei* juveniles and both the survival to White Spot Syndrome Virus challenge and pond culture. *Aquaculture*. 273:405-415.
- Sajeevan T.P., Rosamma P., Bright-Singh I.S. (2006) Immunostimulatory effect of a marine yeast *Candida sake* S165 in *Fenneropenaeus indicus*. *Aquaculture* **257**, 150-155.
- Soderhäll, I., Bangyeekhun, E., Mayo, S. and Soderhäll, K. 2003. Hemocyte production and saturation in an invertebrate animal; proliferation and gene expression in hematopoietic stem cells of *Pacifastacus leniusculus*. *Dev. Comp. Immunol.* 27: 661-672.
- Strickland, J.D.H. y T.R. Parsons. 1972. A practical handbook of seawater analysis. Bulletin 167 (2ª edición). Fish. Res. Bd. of Canada.
- Supamattaya K., Kiriratnikom, S., Boonyaratpalin, M., Borowitzka, L., 2005. Effecto of a *Dunaliella* sp extract on growth performance, health condition, immune response and disease resistance in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Aquaculture* 248: 207-216.
- van Ommen, B., Stierum, R. 2002. Nutrigenomics: exploiting systems biology in the nutrition and health arena. *Curr Opin Biotechnol.* 13: 517-521.

- Vargas-Albores, F.; M.A. Guzmán-Murillo y J.L. Ochoa. 1993. An anticoagulant solution for haemolymph collection and prophenoloxidase studies of Penaeid shrimp (*Penaeus californiensis*). *Comp. Biochem. Physiol. A* 106: 299–303.
- Vázquez-Juárez, R., F. Vargas-Albores F. & J.L. Ochoa. 1993. A computer program to calculate superoxide dismutase activity in crude extracts. *J. Microbiol. Meth.* 17: 239–244.
- Vici V., Bright Sing I.S., Bhat S.G. Application of bacterins and yeast *Acremonium dyosporii* to protect the larvae of *Macrobrachium rosenbergii* from vibriosis. *Fish Shellfish Immunol* 2000; 10:559-563.
- Zhen-Ming C., Liu G., Zhao S., Li J. & Peng Y. (2010) Marine yeasts as biocontrol agents and producers of bio-products. *Applied Microbiology and Biotechnology* **86**, 1227–1241.