



CENTRO DE INVESTIGACIONES  
BIOLÓGICAS DEL NOROESTE, S.C.

---

Programa de Estudios de Posgrado

EFECTO DEL SILICIO ORGÁNICO SOBRE LA RESPUESTA INMUNE  
DEL CAMARÓN BLANCO *Litopenaeus vannamei*.

## **T E S I S**

Que para obtener el grado de

### **Maestro en Ciencias**

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales  
(Orientación en Biotecnología)

Presenta

**María Wenceslada Espinoza León**

**La Paz, B. C. S., 14 de Agosto de 2006**

**Tesis de Maestría en Ciencias en el Uso, Manejo y Preservación de los  
Recursos Naturales con Orientación en Biotecnología.**

María Wenceslada Espinoza León.

Comité Tutorial

**Director de Tesis:** Dr. Felipe Ascencio Valle

**Co-tutor:** Dr. Ángel I. Campa Córdova

**Co-tutor:** Dr. Roberto Civera Cerecedo

Comisión Revisora

Dr. Felipe Ascencio Valle

Dr. Ángel I. Campa Córdova

Dr. Roberto Civera Cerecedo

Miembros del Jurado de Examen

Dr. Felipe Ascencio Valle

Dr. Ángel I. Campa Córdova

Dr. Roberto Civera Cerecedo

Suplente: Dra. María Antonio Guzmán Murillo.

## RESUMEN

En los últimos años, la industria del cultivo de camarón ha sido seriamente afectada por la diseminación de diversas enfermedades virales y bacterianas las cuales han provocado importantes pérdidas económicas. Desde décadas pasadas se han venido realizando estudios relacionados con la inmunología del camarón, así como de compuestos que pudieran favorecer el sistema inmune del mismo. En el presente trabajo se evaluó el valor nutracéutico del silicio orgánico en *Litopenaeus vannamei*. Los organismos fueron expuestos a silicio orgánico tanto por inmersión (1, 10 y 100 mg de silicio orgánico/L) como por inclusión en la dieta (10, 50 y 100 mg silicio orgánico/kg alimento), y para evaluar el efecto del silicio orgánico sobre la respuesta inmune, se determinó el conteo total de hemocitos circulante (CTH), la producción de anión superóxido en hemocitos, la actividad de la superóxido dismutasa en hemocitos, músculo y hepatopáncreas, así como la actividad catalasa en músculo y hepatopáncreas. También se realizaron dos bioensayos de patogenicidad: uno con el virus del Síndrome de la Mancha Blanca WSSV y otro con la bacteria *Vibrio harveyi*, con la finalidad de demostrar si el silicio orgánico pudiese ser utilizado como medida profiláctica ante infecciones de este tipo. Antes de la infección con el virus del Síndrome de la Mancha Blanca (WSSV), los organismos fueron expuestos a silicio orgánico por inmersión (1, 10 y 100 mg de silicio orgánico/L), mientras que antes de la infección con *Vibrio harveyi* los organismos fueron expuestos a silicio orgánico por inmersión (1, 10 mg de silicio orgánico/L) o inclusión en la dieta (50 mg de silicio orgánico/kg de alimento); en los dos casos se determinó el porcentaje de supervivencia de los organismos. Los resultados obtenidos mostraron que el silicio orgánico tuvo un efecto inmunomodulador cuando fue aplicado por inmersión o inclusión en la dieta, en términos de: conteo total de hemocitos, actividad superóxido dismutasa en músculo y hepatopáncreas, así como en la actividad superóxido dismutasa en músculo y actividad catalasa en músculo y hepatopáncreas respectivamente. Asimismo, los resultados mostraron que el uso de silicio orgánico a concentraciones  $\geq 1$  mg/L no es efectivo como medida profiláctica ante infecciones producidas por virus del Síndrome de la Mancha Blanca WSSV y *Vibrio harveyi*. Después de suspender la aplicación de silicio orgánico por inmersión (1 y 10 mg de silicio orgánico/L) o en la dieta (50 mg de silicio orgánico/kg de alimento), se observó un incremento de la actividad superóxido dismutasa en hemocitos de organismos infectados y en el conteo total de hemocitos en organismos no infectados respectivamente.

**Palabras claves:** Sistema inmune, silicio orgánico, *Litopenaeus vannamei*, Virus de la Mancha Blanca, *Vibrio harveyi*.

## ABSTRACT

The shrimp culture industry has been seriously affected by the spread of several infectious viral and bacterial pathogens, which cause significant economic losses. In the last decade, many studies related to shrimp immunology have been undertaken, including chemical compounds that may improve the shrimp immune system. In this study, the potential value of organic silicon as a nutraceutical agent was evaluated for the whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei*. The test organisms were exposed to organic silicon in the water (1, 10, or 100 mg organic silicon L<sup>-1</sup>) or incorporated into their diet (10, 50, or 100 mg organic silicon kg<sup>-1</sup> of feed). After treatment, total hemocyte count, superoxide anions, superoxide dismutase, and catalase activity in hemocytes, muscle, and hepatopancreas were assayed. Two separate bioassays of pathogenicity were made to determine whether organic silicon can be used as an immuno-prophylactic agent to prevent infections with White spot syndrome virus (WSSV) and *Vibrio harveyi*. In one experiment, juvenile *L. vannamei* were first exposed to organic silicon in water (1, 10, or 100 mg organic silicon L<sup>-1</sup>) after being infected with White spot syndrome virus (WSSV). In the second experiment, juvenile shrimp were exposed to organic silicon in water (1 or 10 mg organic silicon L<sup>-1</sup>) and in the diet (50 mg organic silicon kg<sup>-1</sup> of feed), and then infected with *Vibrio harveyi*. In both cases, total hemocyte count and survival were measured. The results showed that organic silicon has an immuno-modulator effect on *L. vannamei* when applied in the water or is included in the diet. These results were observed in three assay methods—total hemocyte count, superoxide dismutase activity in muscle, and catalase activity in muscle and hepatopancreas. For White spot syndrome virus (WSSV) disease, organic silicon at 1 mg organic silicon L<sup>-1</sup> increased survival of shrimp by 10%, compared to the control group. Mortality was 75% for the control and the 10-mg organic silicon L<sup>-1</sup> treatment groups. Mortality was 100% for the 100-mg organic silicon L<sup>-1</sup> group. In shrimp infected with *Vibrio harveyi*, application of organic silicon in water at 1 mg organic silicon L<sup>-1</sup> showed the same mortality as the control group (75%). Mortality, when treated with 10 mg organic silicon L<sup>-1</sup>, was 82%. Mortality, when treated with 50 mg organic silicon kg<sup>-1</sup> of feed was 100%. Therefore, organic silicon should not be used at concentrations >1 mg L<sup>-1</sup> as an immuno-prophylactic measure for White spot syndrome virus (WSSV) and *Vibrio harveyi* infections. After suspending organic silicon in water (1 and 10 mg organic silicon L<sup>-1</sup>) or inclusion in diets at 50 mg organic silicon kg<sup>-1</sup> of feed, superoxide dismutase activity in hemocytes increased in infected shrimp, while total hemocyte count increased in uninfected shrimp.

Keywords: Immune system, organic silicon, *Litopenaeus vannamei*, White spot syndrome virus, *Vibrio harveyi*

## **DEDICATORIA**

*Dedico este trabajo a todas aquellas personas que hicieron posible la realización del mismo.*

### ***Especialmente:***

*A mi hija Silvia por ser fuente de inspiración para que continúe con mi superación.*

*A mi madre Enriqueta, por ser una gran mujer, por su amor y comprensión.*

*A Juan Manuel por despertar en mí el deseo de continuar superándome en la vida profesional y por todo el amor, cariño, comprensión apoyo brindado durante la realización de este trabajo, el cual sin su presencia no hubiese sido tan fácil.*

*A mis hermano (as) por su gran cariño, confianza y por apoyarme a que continuará superándome, especialmente a Isabel.*

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios por darme el Don de la vida y por las grandes oportunidades que me ha brinda en el andar de mi vida, por poner en mi camino cosas hermosas que le dan sentido a la vida, por su bendito e inmenso amor.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada para la realización del posgrado.

Al programa de posgrado y al CIBNOR por brindar su apoyo y las instalaciones necesarias para la realización de este trabajo. Así como el gran personal que ahí labora a la Dra. Thelma Castellano, Lic. Osvelia Ibarra, Lic. Leticia Rubio, Lupita, Betty y Claudia por su gran amabilidad.

A mi director de Tesis el Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle por su confianza, paciencia, por todo el apoyo brindado durante la realización de esta tesis, y por el tiempo empleado en la revisión de la misma; así como por su orientación oportuna para que este trabajo pudiera concluirse satisfactoriamente.

A mis asesores:

Dr. Ángel Isidro Campa Córdova por su ayuda en el aprendizaje y manejo de las técnicas de laboratorio, por su amista, el tiempo empleado y sus comentarios valiosos en la revisión de esta trabajo.

Dr. Roberto Civera Cerecedo por su apoyo, consejos y comentarios oportunos durante la realización de este trabajo.

A la Dra. Ma. Gpe. Martha Zarain Herzberg y su gran equipo de colaboradores (Juan y Gabriel), por su ayuda para que parte de esta tesis se pudiera realizar, especialmente a la M. C. Rosario Pacheco.

Al compañero Leopoldo Leyva por su gran colaboración en cada uno de los bioensayos realizados en el presente estudio y por ser una gran persona con la cual se pudo contar con toda confianza.

Al M.C. Cesar Orozco por proporcionarnos la cepa de *Vibrio harveyi* y por su valiosa ayuda en un bioensayo.

Al M.C. Alfonso Medel por su gran ayuda y asesoramiento en el uso de programas estadísticos.

Al laboratorio Histología e Histoquímica, a la M.C. María del Carmen Rodríguez Jaramillo por su gran ayuda en el procesamiento de las muestras e interpretación de los análisis histológicos.

A M.C. Claudia C. Bolaños por ser una gran persona y amiga y por su brindarme su valiosa ayuda con mi nena.

A la Sra. Josefina Cabán por su amable hospitalidad y su hermosa compañía.

Al laboratorio de Nutrición experimental a la M.C. Sandra de la Paz Reyes y su equipo de colaboradores por su gran ayuda y proporcionarnos el equipo necesario para la realización de dos bioensayos.

Al laboratorio de Ecofisiología de Organismos acuáticos al M.C. Armado Monge Quevedo, por permitir realizar uno de los bioensayos.

Al laboratorio Fisiología Comparada al Biol. Patricia Hinojosa Baltazar por su asesoramiento en el uso del equipo de laboratorio y por su amistad.

Al laboratorio Patogénesis Microbiana a la IBA. María de Jesús Romero Geraldo.

A Horacio Sandoval y Manuel Melero, por su brillante disponibilidad a la hora de requerir de sus servicios, y por ser tan amables.

A los Acuicultores de La Paz (A.P.S.A.), por proporcionar los organismos utilizados en el presente estudio.

A todas aquellas persona que pusieron un granito de arena para que este trabajo se realizara: Personal de Biblioteca: Ana María, Edgar, Tony, y a las secretarias del Dr. Felipe, Brenda y Martha.

A mis grandes amigos de Laboratorio de Patogénesis microbiana; Claudia, Perla, Norma, Mauricio, Carlos y a mis compañeros de generación.



## CONTENIDO

LISTA DE FIGURAS. ....	i
LISTA DE TABLAS. ....	iii
LISTA DE ABREVIATURAS. ....	iv
GLOSARIO DE TÉRMINOS ....	vi
<b>1. INTRODUCCIÓN. ....</b>	<b>1</b>
<b>2. ANTECEDENTES. ....</b>	<b>24</b>
Sistema de defensa de crustáceos. ....	25
Inmunoestimulación. ....	26
Inmunoestimulación en camarón <i>Litopenaeus vannamei</i> . ....	28
<b>3. JUSTIFICACIÓN. ....</b>	<b>32</b>
<b>4. HIPÓTESIS. ....</b>	<b>35</b>
<b>5. OBJETIVOS. ....</b>	<b>36</b>
Objetivo general. ....	36
Objetivos específicos. ....	36
<b>6. MATERIAL Y MÉTODOS. ....</b>	<b>37</b>
6.1 Alimentos experimentales. ....	37
6.1.1 Materias primas e ingredientes. ....	37
6.1.2 Formulación y fabricación de alimentos. ....	37
6.2 Análisis químicos. ....	38
6.3 Estabilidad de alimento en el agua. ....	39
6.4 <b>Experimento 1.</b> Evaluación del efecto del silicio orgánico sobre la respuesta inmune en juveniles de <i>Litopenaeus vannamei</i> al ser expuestos a tres niveles de silicio orgánico por inmersión. ....	39
6.4.1 Obtención de los organismos y aclimatación. ....	42
6.4.2 Sistema de cultivo. ....	42
6.4.3 Obtención de muestras. ....	44
6.4.4 Conteo total de hemocitos. ....	45
6.4.5. Anión superóxido. ....	45
6.4.6. Superóxido Dismutasa ( <i>SOD</i> ; <i>E.C. 1.15.1.1</i> ). ....	46
6.4.7 Catalasa ( <i>CAT</i> ; <i>E.C. 1.11.1.7</i> ). ....	46
6.4.8 Cuantificación de proteínas. ....	47
6.4.9. Análisis Estadísticos. ....	47
6.5 <b>Experimento 2.</b> Evaluación del efecto de la inclusión de silicio orgánico en el alimento sobre la respuesta inmune en juveniles de <i>Litopenaeus vannamei</i> . ....	48
6.5.1. Obtención de muestras. ....	48

6.6 <b>Experimento 3.</b> Evaluación del efecto del silicio orgánico en la prevención de infecciones producidas por el Síndrome de la Mancha Blanca (WSSV). .....	49
6.6.1 Obtención de los organismos y aclimatación. ....	49
6.6.2 Sistema de cultivo. ....	49
6.6.3 Preparación del inóculo viral.....	50
6.6.4 Dosis letal media (DL <sub>50</sub> ).....	50
6.6.5 Exposición de juveniles de <i>Litopenaeus vannamei</i> con tres niveles de inclusión de silicio orgánico por inmersión.....	50
6.6.6 Infección con el virus de WSSV. ....	50
6.6.7 Análisis histológicos.....	51
6.7 <b>Experimento 4.</b> Evaluación del efecto del silicio orgánico en la prevención de infecciones producidas por <i>Vibrio harveyi</i> . ....	52
6.7.3 Preparación del inóculo. ....	53
6.7.4 Dosis subletal (DSL). ....	53
6.7.5 Exposición de juveniles de <i>Litopenaeus vannamei</i> al silicio orgánico por inmersión y en la dieta, y su posterior desafío con <i>Vibrio harveyi</i> . ....	54
6.7.5.1 Sistema de cultivo.....	54
6.7.6 Infección con la bacteria <i>Vibrio harveyi</i> . ....	54
6.7.7 Análisis histológicos.....	55
<b>7. RESULTADOS.</b> .....	56
7.1 Evaluación del efecto del silicio orgánico sobre la respuesta inmune en juveniles de <i>Litopenaeus vannamei</i> al ser expuestos a tres niveles de silicio orgánico por inmersión o inclusión en la dieta. ....	56
7.1.1 Conteo Total de Hemocitos Circulantes. ....	56
7.1.2 Generación de radicales libres ( $O_2^-$ ) en hemocitos.....	57
7.1.3 Actividad superóxido dismutasa en hemocitos.....	58
7.1.4 Actividad superóxido dismutasa músculo y hepatopáncreas.....	58
7.1.5 Actividad catalasa en músculo y hepatopáncreas.....	60
7.2 Efectos de silicio orgánico en la prevención de la infección del Virus del Síndrome de la Mancha Blanca (WSSV). ....	62
7.2.1 Dosis Letal Media (DL <sub>50</sub> ) del WSSV. ....	62
7.2.2 Porcentaje de supervivencia de <i>L. vannamei</i> . ....	63
7.2.3 Conteo Total de hemocitos circulantes.....	65
7.2.4 Tiempo de coagulación y parámetros físicos de hemolinfa.....	65
7.2.5 Diagnóstico confirmativo de infección por WSSV. ....	66
7.2.6 Daños histológicos.....	67
7.3 Efectos de silicio orgánico en la prevención de la infección de <i>V. harveyi</i> . ....	77
7.3.1 Dosis Subletal (DSL) con <i>V. harveyi</i> .....	77
7.3.2 Supervivencia de <i>L. vannamei</i> expuestos a <i>V. harveyi</i> .....	79
7.3.3 Conteo Total de Hemocitos Circulantes. ....	80
7.3.4 Producción de anión superóxido en hemocitos.....	81
7.3.5 Actividad enzimática SOD en hemocitos. ....	82
7.3.6 Daños histológicos.....	83

<b>8. DISCUSIÓN</b> .....	90
8.1 Conteo Total de Hemocitos. ....	90
8.2 Especies Reactivas de Oxígeno y enzimas antioxidantes. ....	95
8.3 Efecto del silicio orgánico en camarones infectados con WSSV y <i>V. harveyi</i> ...	99
<b>9. CONCLUSIONES.</b> .....	105
<b>10. RECOMENDACIONES.</b> .....	106
<b>11. BIBLIOGRAFÍA.</b> .....	108
<b>12. ANEXOS.</b> .....	124



## LISTA DE FIGURAS.

- Figura 1.** Sistema de cultivo utilizado para la evaluación del silicio orgánico como agente inmunonutricional. -----43
- Figura 2.** Conteo Total de Hemocitos Circulantes de camarones expuestos a silicio orgánico por inmersión y alimentados con dietas suplementadas con silicio orgánico. -56
- Figura 3.** Producción de  $O_2^-$  en hemocitos en camarones expuestos a silicio orgánico por inmersión y alimentados con dietas suplementadas con silicio orgánico. -----57
- Figura 4.** Actividad enzimática de SOD en hemocitos de camarones expuestos a silicio orgánico. -----58
- Figura 5.** Actividad de SOD de camarones expuestos a silicio orgánico por inmersión y alimentados con dietas suplementadas con silicio orgánico. -----59
- Figura 6.** Actividad CAT de camarones expuestos a silicio orgánico por inmersión y alimentados con dietas suplementadas con silicio orgánico. -----61
- Figura 7.** Dosis Letal Media ( $LD_{50}$ ) de organismos *L. vannamei* inyectados con diferentes diluciones de WSSV. -----63
- Figura 8.** Porcentaje de supervivencia de *L. vannamei*, después de ser infectados con WSSV. -----64
- Figura 9.** Conteo Total de Hemocitos Circulantes en organismos desafiados con WSSV. -----65
- Figura 10.** Diagnóstico confirmativo de WSSV. -----66
- Figura 11.** Sección histológica del órgano linfoide de juveniles de *L. vannamei*, infectados experimentalmente con WSSV. -----70
- Figura 12.** Lesiones características de WSSV en tejido hematopoyético de juveniles de *L. vannamei*, infectados experimentalmente con WSSV. -----71
- Figura 13.** Corte longitudinal de una sección de epitelio cuticular de juveniles de *L. vannamei*, infectados experimentalmente con WSSV. -----72
- Figura 14.** Sección longitudinal de branquias de juveniles de *L. vannamei*, infectados experimentalmente con WSSV. -----73
- Figura 15.** Sección histológica del tejido nervioso de juveniles de *L. vannamei*, infectados experimentalmente con WSSV. -----74

<b>Figura 16.</b> Sección histológica de glándula antenal de juveniles de <i>L. vannamei</i> , infectados experimentalmente con WSSV. -----	75
<b>Figura 17.</b> Sección histológica de ceca (A, B y C), corazón (D, E y F) de hepatopáncreas (G, H e I) de juveniles de <i>L. vannamei</i> , infectados experimentalmente con WSSV. -----	76
<b>Figura 18.</b> Dosis Subletal (DSL) de organismos <i>L. vannamei</i> inyectados con varias dosis de UFC/mL de <i>V. harveyi</i> . -----	78
<b>Figura 19.</b> Porcentaje (%) de supervivencia de <i>L. vannamei</i> infectados con <i>V. harveyi</i> . -----	79
<b>Figura 20.</b> Conteo Total de hemocitos Circulantes de organismos no infectados e infectados con una dosis de $1 \times 10^6$ UFC/mL de <i>V. harveyi</i> . -----	80
<b>Figura 21.</b> Producción de anión superóxido de organismos no infectados e infectados con una dosis de $1 \times 10^6$ UFC/mL de <i>V. harveyi</i> .-----	81
<b>Figura 22.</b> Actividad enzimática SOD en hemocitos de organismos no infectados e infectados con una dosis de $1 \times 10^6$ UFC/mL de <i>V. harveyi</i> .-----	82
<b>Figura 23.</b> Sección histológica de ceca de juveniles de <i>L. vannamei</i> , infectados experimentalmente con <i>V. harveyi</i> . -----	85
<b>Figura 24.</b> Sección histológica de hepatopáncreas de juveniles de <i>L. vannamei</i> , infectados experimentalmente con <i>V. harveyi</i> . -----	86
<b>Figura 25.</b> Sección histológica de tejido conectivo de juveniles de <i>L. vannamei</i> , infectados experimentalmente con <i>V. harveyi</i> . -----	87
<b>Figura. 26.</b> Sección histológica de branquias de juveniles de <i>L. vannamei</i> , infectados experimentalmente con <i>V. harveyi</i> . -----	88

**LISTA DE TABLAS.**

<b>TABLA I.</b> Principales países productores de camarón proveniente de la acuicultura. Tomado de Rosenberry (2005). -----	2
<b>TABLA II.</b> Composición del alimento (g/100 g alimento) para evaluar el producto comercial silicio orgánico en juveniles de <i>L. vannamei</i> a 3 concentraciones por baño de inmersión y 3 inclusión en el alimento.-----	40
<b>TABLA III.</b> Composición de la premezcla de vitaminas.-----	41
<b>TABLA IV.</b> Composición de la premezcla de minerales.-----	41
<b>TABLA V.</b> Características de la hemolinfa y de los hemocitos de organismos retados con WSSV.-----	66
<b>TABLA VI.</b> Daño histopatológico de <i>L. vannamei</i> infectados con WSSV.-----	69
<b>TABLA VII.</b> Daño histopatológico de <i>L. Vannamei</i> infectados con <i>V. harveyi</i> . -----	84
<b>TABLA VIII.</b> Resumen de Parámetros inmunológicos de <i>L. vannamei</i> evaluados en los 4 bioensayos.-----	89

**LISTA DE ABREVIATURAS.**

<b>ADN</b>	Ácido desoxiribonucleico
<b>ANOVA</b>	Análisis de varianza
<b>AOAC</b>	Association of Oficial Analytical Chemists
<b>APSA</b>	Acuicultores de La Paz S. A.
<b>BSA</b>	De las siglas en inglés: Suero de Albúmina Bovina
<b>CAT</b>	Catalasa
<b>CH<sub>3</sub> Si(OH)<sub>3</sub></b>	Silicio orgánico
<b>C.I.</b>	Cuerpo de inclusión
<b>CTH</b>	Conteo Total de hemocitos
<b>DL<sub>50</sub></b>	Dosis Letal Media
<b>D.O.</b>	Densidad óptica
<b>DSL</b>	Dosis subletal
<b>H&amp;E</b>	Hematoxilina y eosina
<b>mL</b>	Mililitro
<b>NBT</b>	Nitro Azul de Tetrazolio
<b>NRC</b>	Nacional Research Council
<b>OL</b>	Órgano linfoide
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	Anión superóxido
<b>PCR</b>	De las siglas en inglés: reacción en cadena de la polimerasa
<b>ROS</b>	Especies Reactivas de Oxígeno
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>SOD</b>	Superóxido Dismutasa
<b>T C</b>	Tiempo de coagulación



<b>U/mg</b>	Unidades por miligramo
<b>UFC</b>	Unidades formadoras de colonia
$\mu\text{L}$	Microlitro
<b>WSSV</b>	De las siglas en inglés: Síndrome del virus de la Mancha Blanca.

## GLOSARIO DE TÉRMINOS

**Acuicultura:** Estudio o técnica de cultivo de especies vegetales y animales en agua dulce o marina. La acuicultura estudia diversas formas de criar y cultivar especies de peces, crustáceos o moluscos.

**Anión superóxido:** Es un radical de oxígeno tóxico ( $O_2^-$ ) que se produce durante la fagocitosis como un mecanismo de destrucción.

**Branquias:** Órgano respiratorio de diversos organismos marinos y terrestre.

**Catalasa:** Es una proteína homotetramérica y contiene grupos hemínicos; esta asociada a los peroxisomas y remueve el peróxido de hidrógeno.

**Cariolisis:** disolución del núcleo.

**Cariorrexis:** Fragmentación de la cromática y su distribución por el citoplasma como resultado de la desintegración nuclear.

**Cepa:** Punto de arranque de una serie filogenética.

**Célula:** Unidad funcional de los tejidos vivos. Está constituida por el núcleo y el citoplasma; en este se encuentran diversos organelos, como las mitocondrias, el aparato de Golgi, el retículo endoplásmico y las ribosomas, encargadas de la síntesis y secreción de sustancias, cuyo control es ejercido por el núcleo.

**Cuerpo de inclusión:** Término genérico utilizado para designar cualquier masa circunscrita de materiales ajenos a la célula (por ejemplo plomo o virus) o metabólicamente inactivos (por ejemplo los cuerpos ceroides de Mallory) presentes en el citoplasma o el núcleo de una célula. Los cuerpos de inclusión se encuentran en las células infectadas con determinados virus filtrables, observados especialmente en las células nerviosas, epiteliales o endoteliales.

**Cuerpo de inclusión intranuclear:** Masas circunscritas de materiales extraños o metabólicamente inactivos, dentro del núcleo celular. Algunos son cuerpos de inclusión viral.

**Cuerpo de inclusión viral:** Área en el núcleo o el citoplasma de una célula, infectada por un virus, que muestra un comportamiento diferente ante la tinción. Algunos cuerpos de inclusión representan "las fábricas de virus" en las cuales los ácidos nucleicos virales o las proteínas se sintetizan; otras sólo son artefactos de coloración y fijación. Por ejemplo, los cuerpos de Negri pueden verse en el citoplasma o en los procesos de las células nerviosas de los animales que han muerto de rabia.

**Dosis Letal Media (DL-50):** Dosis de una sustancia capaz de causar la muerte del 50% (cincuenta por ciento) de los animales sobre los cuales se realizó el ensayo, y expresado en miligramos del producto por kilogramo del peso corporal.

**Hemocitos:** Células de la hemolinfa de los crustáceos.

**Hemolinfa:** Sangre, líquido extracelular de los crustáceos.

**Hepatopáncreas:** Glándula digestiva de crustáceos y moluscos.

**Histopatología:** es un método de diagnóstico de enfermedades que nos permite identificar anomalías a nivel celular en cortes o secciones de tejidos de organismos, los mismos que son sometidos a tinciones generales y/o específicas para cada propósito.

**Hospedero:** Son los organismos que son capaces de ser infectados por un agente.

**Huésped:** Son los organismos simples o complejos capaces de infectar a otros organismos.

**Infeción:** Crecimiento de un organismo dentro de otro organismo.

**Infestar:** Transmitir de un organismo a otro los gérmenes de una enfermedad.

**Inmune:** Capaz de resistir una enfermedad infecciosa.

**Inóculo:** Material usado para iniciar un cultivo microbiano.

**Inmunidad:** Capacidad de un organismo para resistir la infección.

**Inmunomodulador:** son sustancias que actúan activando componentes celulares y humorales involucrados en el sistema inmune de los organismos, ocasionando a su vez el aumento o disminución de ciertos parámetros inmunológicos.

**Letargia:** Estado de somnolencia o estupor profundo.

**Necrosis:** Muerte celular con rompimiento de la membrana nuclear y plasmática, y con liberación del contenido celular biológicamente activo dando lugar a una inflamación local.

**Núcleo cariorréxico:** Fragmentación del núcleo en trozos con cromatina condensada.

**Núcleo picnótico:** retracción del núcleo con condensación de la cromatina o colapso total del núcleo en una sola esfera densa.

**Nutracéutico:** Es un agente bioactivo proporcionado en forma concentrada para mejorar las características nutritivas, es un componente del alimento, o una mezcla compleja de sustancias químicas, fisiológicamente activas, cumpliendo una función igual que los nutrientes de los alimentos, contribuyendo a reducir la incidencia de ciertas enfermedades crónicas.

**Órgano linfoide:** Tejido en que las células predominantes son hemocitos o linfocitos, etc.

**Patogenicidad:** Capacidad de un microorganismo de infectar (invadir y multiplicarse en un ser vivo), produciendo unos síntomas (enfermedad) en un hospedero susceptible.

**Patógeno:** Es un agente capaz de causar enfermedades.

**PCR:** es una técnica que consiste en la amplificación de material genético (ADN de virus, bacteria, etc.) con la ayuda de reactivos específicos (primers) para cada uno de los patógenos. La identificación del patógeno se la realiza observando bandas específicas de tamaño específico para cada uno de los patógenos.

**Proteína:** Macromolécula compuesta por una o varias cadenas polipeptídicas, cada una de las cuales tiene una secuencia característica de aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos.

**Radical libre:** Es toda molécula en la cual uno de los átomos presenta un electrón desapareado.

**Silicio orgánico:** son moléculas que posee al menos un átomo de carbono enlaza al silicio, llamadas también silanoles. Éstas se pueden encontrar en los magmas de ciertos volcanes y pueden ser sintetizadas.

**Superóxido dismutasa (SOD):** enzima que se encuentra dentro de la célula y remueve los radicales superóxido.

**Tejido:** Cada una de las estructuras celulares, con idéntica naturaleza y origen, que desempeñan en conjunto una determinada función en los organismos vivos.

**Vibrios:** son agentes patógenos que afectan a un amplio rango de organismos invertebrados y poseen una gran variación en lo que a patogenicidad se refiere.

**Vibriosis:** son las enfermedades infecciosas causadas por bacterias del género *Vibrio*.

**Virión:** Una partícula viral; ácido nucleico del virus rodeado por una cubierta de proteína.

**Virulencia:** Es el grado o expresión de la patogenicidad de una agente infeccioso.

**Virus:** Elemento genético que contiene ADN o ARN y que es capaz de alterar entre estados intracelular y extracelular; este último es el estado infeccioso.

## 1. INTRODUCCIÓN.

### **El camarón de cultivo**

Dentro de la explotación de los recursos marinos, la captura y comercialización del camarón es una de las actividades económicas más rentables en varios países. En el Pacífico Mexicano habitan 3 especies de penaeidos que se explotan comercialmente: *Litopenaeus vannamei*, *Litopenaeus stylirostris* y *Farfantepanaeus californiensis*, siendo la más importante *P. vannamei*, que se cultiva principalmente en Sinaloa, Sonora, Nayarit y Baja California Sur, la cual se caracteriza por preferir salinidad baja característica de los esteros y *P. stylirostris*, que se cultiva principalmente en Sonora, debido a su alta resistencia y rápido crecimiento en temperatura y salinidad extremas características de la zona (Audelo *et al.*, 2006).

La acuicultura de camarón se ha expandido significativamente a lo largo de América Latina y Asia durante la década de los 80's (Moss, 2002). Actualmente la producción acuícola del camarón a nivel global se encuentra alrededor de 1,568,386 MT (Rosenberry, 2005). Casi el 84% del camarón cultivado proviene de Asia, destacando como productores principales Tailandia, China, Vietnam e India (Tabla 1). En Occidente, Ecuador es el mayor productor de camarón (Tabla 1).

**TABLA I.** Principales países productores de camarón proveniente de la acuicultura. Tomado de Rosenberry (2005).

<b>PAÍS</b>	<b>PRODUCCIÓN TONS. MET.</b>	<b>PRODUCTIVIDAD RELATIVA (%)</b>
Tailandia	325,000	21.4
China	312,000	20.5
Vietnam	250,000	16.4
Indonesia	242,000	15.9
India	113,000	7.4
Bangladesh	40,000	2.6
Ecuador	71,000	4.6
Brasil	70,000	4.6
México	40,000	2.6
Venezuela	30,000	1.9
Honduras	23,000	1.5
Colombia	17,000	1.1
Guatemala	12,600	0.82
Belice	15,800	0.30
Nicaragua	4,600	0.30
Panamá	3,400	0.22
Perú	2,000	0.13
Costa Rica	286	0.01
<b>TOTAL</b>	<b>1,568,386</b>	<b>100</b>

El atractivo mercado norteamericano ha estimulado en México el cultivo del camarón, perfilándose como una actividad productiva de gran importancia económica. Como consecuencia, esta actividad ha crecido sostenidamente durante los últimos 10 años en México a un ritmo de 15 % anual (Salinas, 1999), de tal manera que en 2001, la producción total de camarón del país alcanzó el tercer lugar (48,014 toneladas) después de la producción de mojarra (68,476 toneladas) y ostión (50,565 toneladas). La camaronicultura, representó en el 2001, el principal ingreso económico (\$2, 738, 018,000 MN), superando los ingresos generados por la mojarra (\$523, 564,000 MN) y contribuyendo con más del 45 % del volumen total de la producción pesquera de camarón a nivel nacional. La producción de camarón en México encuentra su principal mercado en la exportación del producto a países como Estados Unidos, Japón y Europa, en los cuales prevalece una gran demanda por los productos del mar, superando sus producciones nacionales (Salinas, 2002).

Esta actividad en México tomó importancia desde 1984 con el primer proyecto de cría de camarón en el norte de Sinaloa; hoy representa una actividad económica importante debido a su alta rentabilidad, por lo que se ha visto enormemente incrementada en los últimos 20 años, en especial a lo largo de la costa este del Mar de Cortez, particularmente en el estado de Sinaloa y Sonora donde se encuentra el 97% de las granjas de camarón, convirtiéndose en una de las zonas productoras de camarón más importante en Latinoamérica (Páez-Osuna *et al.*, 2003; Rosenberry, 2005). Sin embargo la producción en el 2005 disminuyó entre 20 y 25% comparada con la del 2004 en su mayor parte por infecciones producidas por el Virus de la Mancha Blanca (WSSV) en los estados de Sinaloa y Sonora (Rosenberry, 2005).

Debe considerarse que el cultivo de camarón es una actividad de alto riesgo donde la aparición y diseminación de enfermedades pueden afectar seriamente la producción. En camarones *penaeidos* se han aislado bacterias del género *Vibrio* como causantes de enfermedades, principalmente *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. harveyi* (Garriques y Arévalo, 1995). En México, diversos virus han provocado pérdidas dramáticas en los cultivos: *Baculovirus penaei* en 1998, Infección hipodérmica y necrosis hematopoiética (IHHNV) entre 1989 y 1990, síndrome de Taura (TSV) a partir de 1995, y muy recientemente el síndrome de la mancha blanca (WSSV) y la enfermedad de la cabeza amarilla (YHV) surgen como amenazas potenciales para la salud de los cultivos (De la Rosa-Vélez, 2001).

En países como Ecuador, las enfermedades en los tanques de cultivo provocaron pérdidas por 1,000 millones de dólares en 1999-2000, desplomándose la producción en

un 80% durante los primeros meses del 2000 (Salinas, 2001). En México, las enfermedades causaron mortalidades por encima de lo habitual, y originaron cosechas tempranas, y por ende, con tallas pequeñas causando una disminución de exportaciones por tallas chicas, que no tienen un mercado atractivo para la exportación, significando una disminución en los ingresos del 22% en el año 2000. Estos ejemplos nos dan una idea de los efectos causados por las enfermedades microbianas en esta actividad y ponen de manifiesto la vulnerabilidad existente en este aspecto (Salinas, 2001).

En los cultivos intensivos, debido a la alta densidad de población, el desarrollo y la transmisión de patógenos es sumamente peligrosa. Además del uso de los antibióticos, el control del número de microorganismos se basa en la regulación de las características del agua, la cual puede controlar parcial y momentáneamente el problema infeccioso, pero no permite conocer la condición de salud de la población cultivada, por lo que podrían presentarse nuevos cuadros infecciosos (Lightner, 1985).

### **Enfermedades infecciosas en camarón**

La mayoría de las enfermedades ocasionadas en los cultivos de camarón están relacionadas al rompimiento del equilibrio entre: el medio ambiente, la fisiología del hospedero, las estrategias invasoras del parásito, el estrés asociado a la intensificación del cultivo del camarón, la manipulación genética, al estado inmunológico de los organismos, a una nutrición y manejo inadecuados (Vargas-Albores *et al.*, 1996).

Los principales microorganismos que amenazan el desarrollo de la industria camaronera, y que han venido ocasionados enfermedades infecciosas, son de tipo vibriosis y viral; ya que en términos de impacto económico, éstos han provocando

anualmente pérdidas millonarias, por lo que la prevención y control encierra la mayor importancia a este problema. El estudio de las enfermedades de los crustáceos es reciente, por lo que en ciertas ocasiones se desconoce el agente causal, sin embargo, actualmente ya se cuenta con disciplinas como la inmunología, la histología, la infectología, la epidemiología y la biología molecular, entre otras, las cuales han aportado herramientas para el diagnóstico y control de enfermedades.

### **Virus patógenos para camarón.**

Aunque existen cerca de 20 virus reconocidos para camarones penaeidos, únicamente cuatro especies tienen importancia económica para la industria acuícola: YHV (Yellow Head Virus), WSSV (White Spot Syndrome Virus), IHNV (Infectious Hematopoietic Necrosis virus) y TSV (Taura Syndrome Virus). La Mancha Blanca causada por el WSSV, es hasta el momento la más devastadora enfermedad reportada para camarones penaeidos cultivados (Lightner, 1996; Flegel, 1997).

### **Virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV).**

El primer brote del virus de la mancha blanca (WSSV) se presentó en China en 1993 y de ahí se extendió a Japón a través de la importación de larva infectada; en 1994 se presentaron mortalidades superiores al 80% en menos de una semana en Tailandia, y más tarde en Taiwán, India, Indonesia, Sri Lanka, Malasia, y Bangladesh. En el año de 1995 se detectó por primera vez en Texas, EE.UU (Lightner *et al*, 1998), y ese mismo año en Panamá y la costa pacífica de Colombia; en 1997 se encontró en Carolina del Sur. En Enero de 1999, la presencia de WSSV fue detectada en muestras de tejidos de camarones de granjas en tres países centroamericanos: Nicaragua, Guatemala y



Honduras. En México se definió la presencia de WSSV en Julio de 1999 (Unzueta-Bustamante, 1999; Audelo y Montiel, 2005) en granjas de cultivo de penaeidos en las costas de Sonora y Sinaloa, México.

### **Características ultraestructurales del WSSV.**

El WSSV es causado por un virus fusiforme, cuyos viriones miden aproximadamente 70-150 nm por 275-380 nm de longitud (Jory y Dixon, 1999; Lightner, 1996b). El genoma es una cadena doble de ADN (dsADN), la cual presenta una longitud estimada de 150 kpb. Con base en las características morfológicas y su estructura genómica, se define al WSSV como miembro del género NOB (Non-Occluded Baculovirus) de la subfamilia Nudibaculovirinae de Baculoviridae (Wang-Hsiung *et al.*, 1995). La replicación del WSSV tiene lugar en el núcleo de las células infectadas. La morfología viral comienza por la formación de membranas de novo en el nucleoplasma (Durand *et al.*, 1997). En los núcleos infectados los virones tienen una distribución paracristalina o desordenada.

### **Desafío con WSSV.**

Las pruebas de desafío al WSSV han demostrado que este virus es altamente virulento, llegando a provocar mortalidades de hasta 100% en los animales desafiados (Sahul *et al.*, 2001).

Los aspectos a considerar en una infección con WSSV son el amplio número de hospederos, las múltiples vías de infección, la gran velocidad de replicación del virus, su poder de propagación y el estado fisiológico del huésped, aunque organismos infectados han muerto en postmuda (Echeverría *et al.*, 2002), se sugiere una mayor

susceptibilidad al virus durante la premuda tardía (Hassno *et al.*, 1999a), el mismo que estaría estrechamente asociado a la temperatura, donde la susceptibilidad de *Litopenaeus vannamei* al virus es mayor a temperaturas frías (inferiores a 29 ° C).

Se han realizado infecciones experimentales con WSSV mediante inyección, inmersión e ingestión (Takahashi *et al.*, 1994). Las infecciones por inyección tienen la ventaja de permitir la infección con concentraciones virales conocidas y estandarizadas, sin embargo, violan la primera barrera natural de defensa del camarón que es la cutícula y los mecanismos de defensa a ella asociados. El sitio de inyección característico es entre el 2° y 3° segmento abdominal para camarones (Corbel *et al.*, 2001). Al contrario de la inyección, las infecciones realizadas por ingestión representarían una vía natural de infección (Lightner *et al.*, 1998) y proveen una herramienta para evaluar y comparar resistencia al virus entre familias de *L. vannamei* (Moss *et al.*, 2001). Las infecciones por inmersión con WSSV realizadas en *L. vannamei* (Wu *et al.*, 2001) han demostrado que el agua constituye un vehículo de transmisión, indicando el peligro potencial de altas cargas virales en los estanques de cultivo.

El signo clínico principal del WSSV en camarones penaeidos es la presencia de puntos blancos de 1 a 2 mm de diámetro dentro de la superficie del caparazón. El color del cuerpo de los organismos enfermos es de pálido a rojizo, el órgano linfoide se presenta turgente, contraído (Takahashi *et al.*, 1994) o hipertrofiado (Vidal *et al.*, 2001).

Las características histopatológicas ocasionadas por el WSSV en animales moribundos revelan células infectadas con núcleo hipertrofiado, cuerpos de inclusión eosinófilos a basófilos en células ectodermales y mesodermales de los apéndices, branquias,

estómago, intestino anterior y posterior, y tejido nervioso. En otros casos, se observan dos patologías: esferoides, núcleo picnótico y carrieréxicos en células del órgano linfoide, tejido hematopoyético, tejido conectivo, corazón y glándula antenal (Momoyama *et al.*, 1994; Pacheco-Marges, 2004; Maldonado-Villavicencio, 2003, Rodríguez *et al.*, 2003; Morales-Covarrubias, 2004).

Los cuerpos de inclusión han sido clasificados en 5 tipos de acuerdo a la morfología y tonos de coloración (con tinción de hematoxilina de Harris-eosina Floxin) que se presentan durante el desarrollo de la enfermedad. Los cuerpos de inclusión tipo 1, se caracterizan por presentar un ligero halo claro rodeando la parte central fuertemente eosinófila que cubre  $\frac{3}{4}$  partes o más de la célula, cromatina marginada interrumpida o poco visible y en ocasiones más marcada. En los cuerpos de inclusión tipo 2, (tipo Cowdry A) se observa un halo claro bien marcado entre la parte central eosinófila a veces fuerte a veces clara y la orilla puede estar bien marcada con cromatina marginada o difusa. En los cuerpos de inclusión tipo 3, se observan fuertemente eosinófilos a ligeramente basófilos, cubriendo por completo la célula, observándose la cromatina marginal marcada. En los cuerpos de inclusión tipo 4, se observan eosinófilos o ligeramente basófilos cubriendo por completo la célula, cromatina marginal ausente, y en los cuerpos de inclusión tipo 5, se observan eosinófilos o basófilos llenando por completo la célula, cromatina marginal interrumpida o poco visible (Rodríguez *et al.*, 2003; Pacheco-Marges, 2004; Morales-Covarrubia, 2004).

La literatura ha reportado diferencias en la susceptibilidad al virus en diferentes especies de crustáceos. Se han descrito mortalidades acumuladas del 100% al 8° día

post-inoculación (Lighther et al., 1998) en juveniles *L. vannamei* infectado por inyección intramuscular. Por otro parte, se ha observado que en estadios tardíos de infección por WSSV, es también afectado el órgano hematopoyético del animal (Chang-Fang et al., 1996), situación que imposibilitaría o dificultaría cualquier oportunidad de recuperación inmunitaria del huésped. Sin embargo, en *Penaeus monodon* se ha observado que infecciones de baja intensidad con WSSV (detectables sólo con PCR anidado) pueden mantenerse por largos períodos sin provocar la muerte de los camarones (Tsai-Feng et al., 1999).

La situación es diferente cuando el ingreso de partículas virales es masivo. Infecciones experimentales en *P. monodon* y *P. japonicus*, utilizando baños a altas concentraciones virales, provocan la mortalidad del 100 % de los animales en 5 días (Chou-Hsiung et al., 1998; Kanchanaphum et al., 1998). La ingestión de alimento altamente contaminado ocasiona un ataque viral aún más agresivo, provocando mortalidades más rápidas, como se ha observado en *P. monodon* (Chou et al., 1998) y en *L. vannamei* (Rodríguez et al., 2000), ya que el virus es capaz de invadir la totalidad de órganos preferidos en 52 h, además éste tiene afinidad por la quitina del huésped, así que en *P. monodon* se han observado partículas virales adheridas a la base de las setas de la cutícula, (Chang-Fang et al., 1996), hecho que también ha sido señalado por Lightner (1996).

#### **Especies de *Vibrio* patógenos para camarón.**

Otras de las enfermedades que han ocasionado pérdidas millonarias en el cultivo de camarón son las asociadas a las especies de *Vibrio* como: *V. harveyi* (Liu-Chung et al., 1996), *V. damsela* (Song-Ling y Lee, 1993), *V. alginolyticus* (Lee-Kau et al., 1996) y *V.*

*parahaemolyticus* (Sung-Hung *et al.*, 1999), *V. vulnificus*, *V. penaeicida*, *V. anguillarum*, *V. nereis*, *V. tuboashi*, y *V. fluviales* (Lightner, 1996; Vandenberghe *et al.* 1998; Sudheesh y Xu 2001; Saulnier *et al.*, 2000a). Estos microorganismos oportunistas se consideran parte del ecosistema normal del camarón y causan enfermedades solamente en condiciones que favorecen al huésped, éstos representan cerca del 80% de la población de bacterias en la superficie de agua occidental del océano Pacífico (Tsukamoto *et al.*, 1993).

*Vibrio harveyi* esta asociado particularmente a tejidos de superficie, órganos blancos e intestino de los animales marinos (Baumann *et al.*, 1971; O'Brien y Sizemore 1979; Ruby y Morin 1979; Ramesh *et al.* 1986; Ramesh y Venugopalan 1989). Desde la década pasada se han observado pérdidas masivas de *Penaeus monodon* y *P. japonicus* atribuidos a la patogenicidad de esta especie de *Vibrio* luminiscente, la cual ha sido reconocida en cultivo de penaeidos en las principales regiones camaronícolas, como: Taiwan (Song-Ling y Lee-Kau, 1993; Liu-Chu *et al.* 1996a,b), China (Vandenberghe, *et al.*, 1998), Australia (Pizzutto y Hirst, 1995), Filipinas (Baticados y Lavilla-Pitogo *et al.*, 1990), Tailandia, Indonesia e India ( Karunasagar *et al.*, 1994; Jiravanichpaisal *et al.*, 1994; Sunaryanto y Mariam, 1986).

Se han obtenido una variedad de productos extracelulares de varias especies de *Vibrio* a partir de peces y crustáceos marinos con la finalidad de aislar y examinar sus propiedades enzimáticas y factores de virulencia (Lee-Kau *et al.*, 1999). La patogenicidad de diferentes cepas de *V. harveyi* y sus productos extracelulares (ECP) han sido reportados (Liu-Chun *et al.* 1996a). Esta patogenicidad se atribuye a la

presencia de factores extracelulares de virulencia como proteasas, hemolisinas, quitinasa y fosfolipasa (Liu-Chung *et al.*, 1996); una cisteín proteasa fue aislada y purificada a partir de una cepa patógena de *V. harveyi* Taiwanesa (Liu-Chung *et al.*, 1997). También ha sido aislada una proteasa alcalina de un extracto a partir del sobrenadante de *V. harveyi*, aunque su caracterización será reportada en el futuro (Fukasawa *et al.*, 1998). Lavilla *et al.* (1990) encontraron que el órgano blanco de infección de *V. harveyi* luminiscente fue el hepatopáncreas de *P. monodon*. Jiravanichpaisal *et al.* (1994) reportaron la multiplicación de un *V. harveyi* patógeno en el lumen de hepatopáncreas de los camarones, anterior a su disseminación sistémica con una marcada necrosis en el corazón y órgano linfoide.

### **Sistema inmune del camarón.**

El sistema inmune incluye un conjunto de mecanismos que permiten el reconocimiento de lo propio y lo extraño con el objetivo de proteger la integridad biológica del individuo. Estos mecanismos involucran el reconocimiento del invasor, así como la presencia de un sistema efector que elimina cualquier elemento que afecte dicha integridad (Bayne, 2003). Los invertebrados y los camarones han desarrollado un sistema de defensa para su protección, el cual consiste en un sistema inmune innato (Hoffman y Reichhart, 2002; Roch, 1999; Vargas-Albores y Yepiz-Plascencia, 1998). Éste es llamado sistema inmune innato porque consiste de una línea de defensa no específico (Fujita *et al.*, 2004; Mallon *et al.*, 2003), el cual esta basado en elementos de diferenciación celular, protección contra estrés oxidativo, así como factores celulares y humorales, y sistemas multiméricos como el sistema de coagulación (Montaño-Pérez y *et al.*, 1999) y el sistema profenoloxidasa (proFO) (Hernández-López *et al.*, 1996;

Gollas-Galván *et al.*, 1999), que involucran a ambos tipos de factores (humorales y celulares), los cuales se conjuntan para eliminar microorganismos y parásitos que evidencien un peligro potencial para el hospedero (Söderhall *et al.*, 1992; Vargas-Albores *et al.*, 2000; Vorbach *et al.*, 2003).

La primera línea de defensa en los crustáceos es la cutícula, la cual constituye una barrera física y biológicamente activa (Sugumaran, 1996), a ella estarían asociados actividad microbicida (Destoumieux *et al.*, 2000) y actividad fenoloxidasa (Sugumaran, 1996).

En los crustáceos la circulación es abierta y la hemolinfa es análoga a la sangre y la linfa de vertebrados (Söderhäll *et al.*, 1992; Söderhäll y Smith, 1983; Johansson *et al.*, 1986; Martín *et al.*, 1998; Roch, 1999). Ésta baña los tejidos, denominándose hemocele a los sitios donde ella circula. Las células sanguíneas que se encuentran en este sistema son los hemocitos, los cuales constituyen la fracción celular de la hemolinfa.

Los hemocitos de crustáceos juegan un papel importante en la respuesta inmune, ya que son los primeros efectores de la inmunidad celular no específica en el hospedero, éstos participan en procesos: de reconocimiento y comunicación célula-célula, fagocitosis, encapsulación, nodulación, melanización, coagulación, lisis de las células extrañas, y citotoxicidad (Johansson, *et al.*, 2000). La defensa inmune es realizada básicamente a través de la circulación de los hemocitos y principalmente a los elementos claves de la inmunidad que están localizados dentro de ellos, y los que se encuentran en el plasma (Bachère, *et al.*, 2000). Los hemocitos han sido clasificados en base a criterios

estructurales, morfológicos, citoquímicos, antigénicos, funcionales y principalmente por la presencia de gránulos citoplasmáticos como son: a) hialinos cuyo tamaño es de  $12.4 \times 7.8 \mu\text{m}$  de diámetro (H); b) semigranulares (SG) los cuales tienen un diámetro de  $14.8 \times 8.3 \mu\text{m}$  y c) granulares (G) con un diámetro de  $13.6 \times 9.5 \mu\text{m}$  (Söderhäll y Smith, 1983; Martin y Graves, 1985; Tsing, 1987; Hose y Martin, 1992; Söderhäll y Cerenius, 1992; Rodríguez *et al.*, 1995; Johansson *et al.*, 2000).

En el plasma de crustáceos se encuentran en circulación innumerables moléculas de diferente papel fisiológico como: sustancias inhibidoras del crecimiento bacteriano, inhibidores enzimáticos, sustancias causantes de lisis celular, aglutininas, péptidos antimicrobianos como peneidinas, lectinas, inhibidores de proteasas, proteínas de reconocimiento, varias lipoproteínas, entre ellas el factor de coagulación y las proteínas fijadoras de  $\beta$ -glucanos (Bachère *et al.*, 2000).

El reconocimiento de patógenos por las células del sistema inmune en invertebrados, seguido por la inducción de una respuesta inmune efectiva, es esencial para la supervivencia de la mayoría de los organismos multicelulares (Nappi y Ottaviani, 2000). Dentro del sistema inmune de reconocimiento de los crustáceos se encuentran proteínas plasmáticas como: la proteína de unión a los lipopolisacáridos (LPS-BP, lipopolysaccharide binding protein), la proteína de unión a  $\beta$ -glucanos (BGBP,  $\beta$ -glucan binding protein) y las proteínas de unión a los péptidoglicanos. Estas proteínas activan la defensa celular, después de una reacción con el ligando. La LPS-BP es una proteína capaz de formar complejos con los componentes de la pared celular de bacterias Gram negativas, para estimular la respuesta inmune por parte de los



hemocitos. Por su parte la BGBP es una proteína que reconoce 1, 3  $\beta$ -glucanos y estimula a los hemocitos para liberar el sistema pro-PO (Sritunyalucksana y Söderhäll, 2000).

### **Especies reactivas de oxígeno.**

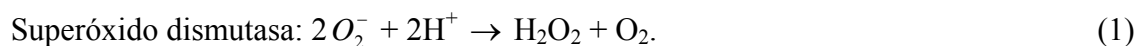
Muchos mecanismos de defensa celulares en los crustáceos dependen de la producción controlada de radicales libres durante la fagocitosis y encapsulación (Muñoz *et al.* 2000; Rodríguez y Le Moullac 2000). Durante estos procesos los hemocitos llevan a cabo un fenómeno conocido como estallido respiratorio de manera similar al observado en fagocitos de mamíferos. El mecanismo involucrado en la destrucción intracelular del material fagocitado comprende la generación de varios intermediarios reactivos de oxígeno y nitrógeno (Luna-González *et al.*, 2003).

Durante el metabolismo aerobio se generan constantemente pequeñas cantidades de sustancias reactivas de oxígeno (ROS), incluyendo radicales hidróxilo (OH $\cdot$ ), el anión superóxido ( $O_2^-$ ) y el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), como respuesta a estímulos externos e internos. Estas mínimas concentraciones de ROS pueden ser indispensables en muchos procesos, como el sistema de señales intracelulares (que está relacionado con otros procesos como la proliferación celular y apoptosis), la inmunidad, y la defensa contra microorganismos. Sin embargo, altas dosis o eliminación inadecuada de ROS son tóxicas para las células vivas, ya que pueden dar lugar a estrés oxidativo, que puede causar graves disfunciones metabólicas, daño a macromoléculas biológicas, lo cual conduce a la iniciación de la peroxidación de lípidos con implicaciones patológicas que van desde la distrofia muscular, incremento a la susceptibilidad a enfermedades e incluso a la muerte del animal (NRC 1993). Por lo que para protegerse a sí mismas de

tales compuestos indeseados y potencialmente peligrosos formados en el metabolismo del oxígeno, cada célula necesita poseer sistemas que se encarguen de éstos.

El anión superóxido  $O_2^-$  se forma fácilmente donde existe oxígeno molecular, siendo éste eliminado por la enzima superóxido dismutasa (SOD) donde se forma peróxido de hidrógeno y  $O_2$  [Eq. (1)]. (Pipe *et al.*, 1993; Homblad y Söderhäll, 1999).

El peróxido de hidrógeno es transformado en agua y oxígeno por acción de la catalasa [Eq. (2)] (Kashiwagi *et al.*, 1997) y por la peroxidasa en presencia de un agente reductor [Eq. (3)].



### **Enzimas antioxidantes.**

La acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) incluyen a los radicales libres y a moléculas derivadas del oxígeno con una elevada reactividad, mientras que las especies reactivas de nitrógeno (RNS) comprenden radicales libres y moléculas derivadas del nitrógeno, las cuales se forman como subproductos del metabolismo aerobio (Kashiwagi *et al.*, 1997) y durante el estrés oxidativo (Mackay and Bewley, 1989) pueden dañar a los organismos aerobios. Una producción excesiva de ROS y RNS puede causar muerte celular, necrosis de tejidos, efectos citotóxicos causados por el metabolismo celular, lo cual es una amenaza para la salud del individuo (Griswold *et al.*, 1993). Por tal motivo, los organismos han desarrollado defensas antioxidantes,

incluyendo mecanismos enzimáticos y no enzimáticos para disminuir los efectos tóxicos activados por las especies reactivas de oxígeno (Mackay and Bewley, 1989; Parkes *et al.*, 1993). Las defensas enzimáticas antioxidantes son ascorbato, glutatión reductasa, catalasa y peroxidasas, superóxido dismutasa, las cuales eliminan eficientemente el peróxido de hidrógeno de las células (Campa-Córdova *et al.*, 2005). Las defensas no-enzimáticas son antioxidantes de bajo peso molecular como ácido ascórbico,  $\alpha$ -tocoferol, ácido úrico, glutatión,  $\beta$ -carotenos y vitamina E. Los antioxidantes son responsables de proteger a las células y moléculas del estrés oxidativo y son muy importante para terminar la cascada de producción de radicales libres y las reacciones en cadena que inducen a la peroxidación de lípidos, y también juegan un papel vital en mantener las células inmunes en un ambiente reducido (Campa-Córdova *et al.*, 2002; Luna-González *et al.*, 2003). Un balance en las enzimas oxidantes como las antioxidantes es de gran importancia para mantener la homeostasis en los organismos aerobios (Asahi *et al.*, 1995).

En los últimos años se le ha dado mucha importancia al estudio de las enzimas antioxidantes y sus genes en crustáceos, ya que su presencia en diferentes órganos de los mismos es fundamental para contrarrestar los efectos tóxicos de los radicales libres producidos por ataques de microorganismos como bacterias, virus, protozoarios, etc. e incluso, por cambios adversos que se presentan en los medios de cultivo ya sea naturales o artificiales. En estudios reciente se han aislado, purificado, y caracterizado algunas de estas enzimas en *L. vannamei*, por ejemplo se ha reportado una secuencia parcial del gen de la Mn-SOD (Gross *et al.* 2001) y actividad de SOD (Campa-Córdova, *et al.*, 2002). También se ha realizado la clonación y caracterización parcial de los genes

de las enzimas antioxidantes catalasa y SOD en *P. vannamei* (Tavares-Sánchez *et al.*, 2002); además se ha reportado la secuencia del gen de la catalasa en diferentes órganos de *L. vannamei*, (Tavares-Sánchez *et al.*, 2004). Yao-Luan *et al.*, 2004, purificaron y caracterizaron la enzima MnSOD de músculo de *Macrobrachium nipponense*.

### **Catalasa (CAT) ( E.C. 1.11.1.7).**

La catalasa es una enzima oxidoreductasa que cataliza la conversión de dos moléculas de peróxido de hidrógeno en dos moléculas de agua y una de oxígeno. Esta enzima es una ubiquinona la cual esta presente en procariotas y eucariotas (Kashiwagi *et al.*, 1997; Klotz *et al.*, 1997). Esta es una hemoproteína formada por cuatro subunidades idénticas (Wu and Shad, 1995) de aproximadamente 50-60 kDa (García *et al.*, 2000; Klotz *et al.*, 1997). Es una enzima altamente conservada que ha sido identificada a partir de un gran número de especies incluyendo: bacterias, hongos, plantas y animales. Por otra parte, se conoce un segundo grupo de proteínas de catalasa con actividad peroxidasa, destacándose la importancia de estas enzimas en prácticamente todos los organismos. Esta enzima se localiza principalmente en los peroxisomas, pero también se ha detectado en el citoplasma y en la mitocondria (Radi *et al.*, 1991, Kinnula *et al.*, 1995).

Se ha detectado la actividad catalasa en *Macrobrachium malcolmsonii* (Arun *et al.*, 2003), en el cangrejo *Carcinus maenas* (Orbea *et al.*, 2000) y en el camarón rojo *Aristeus antennatus* (Mourente y Díaz, 1999). La actividad catalasa se incrementa paralelamente en crustáceos *Balanus balanoides* con la acumulación de hidrocarburos poliaromáticos (Niyogi *et al.*, 2001). La suplementación de vitamina E en la dieta disminuye la peroxidación de lípidos y modula la actividad catalasa en algunos tejidos, por ejemplo, de manera específica en las branquias disminuye, pero se mantiene sin

cambio en hepatopáncreas de *M. rosenbergii* (Dandapat *et al.*, 2000). Se ha detectado actividad catalasa en hepatopáncreas, branquias y músculo de *L. vannamei* (Tavares-Sánchez *et al.*, 2004).

### **Superóxido Dismutasa (SOD) ( E.C. 1.15.1.1).**

La superóxido dismutasa, es una enzima antioxidante que juega un papel importante en el sistema de defensa de todos los organismos aerobios constituyendo la primera línea de defensa contra los daños oxidativos, causado por agentes contaminantes en el medio ambiente, a infecciones causadas por microorganismos, exposición de los organismos a hipoxia, a hiperoxia, a cambios de temperatura o a inmunoestimulantes (Fridovich, 1995; Neves *et al.*, 2000). Esta enzima se ha 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). Es posible que estas moléculas antioxidantes jueguen un papel importante en la modulación del sistema inmune, así como para prevenir la aparición de tumores, reducir el colesterol en la sangre y evitar enfermedades coronarias (Das *et al.*, 2002). Algunos estudios como los realizados por Downs *et al.* (2001) y Ellis (1996), enfatizan la importancia de las enzimas antioxidantes como moduladores de la respuesta inmune en organismos marinos, al incrementar los niveles de algunas enzimas antioxidantes y moléculas del sistema inmune mediante pruebas de estrés.

La actividad de SOD ha sido reportada en especies de crustáceos como: *Macrobrachium nipponense*, *P. vannamei*, *L. vannamei* y *Palaemonete pugio*, esta enzima juega un papel importante en la inmunidad (Neves *et al.*, 2000). Esta enzima ha sido aislada, purificada y particularmente caracterizada en músculo del langostino *Macrobrachium nipponense* (Yao-Luan, *et al.*, 2004). Johansson *et al.* (1999) han reportado una SOD extracelular en acocil la cual al enlazarse a peroxinectina puede mediar o regular la adhesión célula y la fagocitosis en la inmunidad del organismo. Downs *et al.* (2001) reportaron el papel inmunomodulatorio de la enzima mitocondrial superóxido dismutasa en el camarón *Palaemonete pugio* en respuesta a factores ambientales estresantes. De acuerdo a la función de esta enzima antioxidante (SOD) en el organismo, se ha utilizado como un indicador potencial de estrés oxidativo en organismos marinos. Campa-Córdova *et al.* (2002) han reportado la acción inmunomoduladora de superóxido dismutasa en camarón blanco *L. vannamei* y recientemente Gómez-Anduro *et al.*, (2006) hicieron la caracterización molecular de la MnSOD citosólica de *L. vannamei*.

Otro de los compuestos a los cuales se le han atribuido propiedades antioxidantes es a las moléculas de silicio orgánico, llamadas también silanoles, las cuales se distinguen del silicio mineral por el hecho de que ellas poseen al menos un átomo de carbono enlazado al silicio. Desde los años 50 se han venido sintetizando moléculas de silicio orgánico, con lo cual se da inicio a la *Silicoterapia*, actualmente existen varios productos que contienen silicio orgánico, los cuales han sido utilizados para mejorar la salud del humano, animales y plantas. Por otra parte, se sabe que los magmas de ciertos volcanes son rico en silicio orgánico (Ribault, L. 2004).

Se han venido realizando trabajos sobre el silicio orgánico y el mineral absorbible desde los años treinta con los cuales se ha demostrado de manera irrefutable que el silicio orgánico se puede calificar de nutriente fundamental tanto para humanos como para los animales (Carlisle, 1974). Es indispensable para la calcificación temprana de los huesos y las conchas de los animales ya que promueve el crecimiento de los huesos y los cartílagos.

En la década de los 90', algunas compañías farmacéuticas utilizaron formulaciones a base de silicio en vendajes para quemaduras y heridas porque se reconoció que ayuda a estabilizar las quemaduras y a curar las heridas más rápidamente (Aubert y Magolon, 1993).

#### **Presencia y balance del silicio en el agua de mar.**

El silicio está presente en el agua de mar tanto en solución como en forma particulada. La forma soluble del elemento es quizá el ácido ortosilícico  $[\text{Si}(\text{OH})_4]$ , la solubilidad de éste se encuentra en el orden de 50 mg Si/L. También se observa en suspensión un amplio espectro de material silíceo finamente dividido (Riley y Chester, 1989).

#### **Asimilación e importancia del silicio en los organismos marinos.**

En algunas partes de los océanos las aguas superficiales están rodeadas de diversos organismos los cuales tienen esqueletos compuestos de una forma no cristalina de ópalo de sílice hidratado como vegetales (diatomeas y algunas Chysophata) e invertebrados (radiolarios, pterópodos y esponjas) que tienen estructura silificadas (Riley y Chester,

1989). Poco se conoce sobre la forma como son absorbidos los silicatos por los organismos marinos, pero sí se sabe que se requiere energía para la deposición y que los grupos sulfhidrilo (-SH) de las proteínas están involucrados en algún camino. También se ha demostrado que después que el ácido silícico ha sido adsorbido sobre una monocapa proteica éste polimeriza y forma una estructura, probablemente debido a los enlaces hidrógenos del ácido silícico (Clark *et al.*, 1975). Un mecanismo similar puede estar involucrado en la deposición de sílice en diatomeas. Lewin (1962) ha sugerido que la deposición puede tomar lugar sobre la membrana citoplasmática y que sirve como una plantilla para la estructura final. El peso de la sílice por célula en cualquier especie varía con la concentración de silicio en el medio y con la proporción de la división celular.

El silicio se encuentra presente por todas partes en el cuerpo humano, que contiene en promedio siete gramos. En el cuerpo humano, encontramos al silicio bajo distintas formas: un 10% libres y solubles en el agua, 60% combinado con las proteínas y 30 % combinado con los lípidos. En 1972 se reportó que el silicio es esencial para la formación y mantenimiento normal de los huesos, cerebro y vasos sanguíneos, por lo tanto, se ha afirmado que el silicio es importante para mantener la salud en humanos (Carlisle, 1972, 1987; Becker *et al.*, 1979). También se sabe que se encuentra, sobre todo, en el tejido conjuntivo, en la aorta, en los vasos sanguíneos, en los cartílagos, en el timo, en el hígado, en el bazo, en el páncreas, en la piel, en las uñas y en el cabello. La tasa en sangre es inferior a 10 ppm (partículas por millón) y la orina excretada diariamente contiene alrededor de 20 miligramos.



Se absorbe básicamente mediante la alimentación aunque, en su forma orgánica, es fácilmente absorbido a través de la piel. En cuanto a su eliminación, normalmente tiene lugar por vía renal y por las heces, pero también se pierde silicio al cortarse el cabello, las uñas o al expulsar mucosidades.

En el ámbito inmunitario, el silicio participa en dar señales para conformación de complejos antígeno-anticuerpo. Favorece también la transformación de los linfocitos B en linfocitos T. Ejerce un papel importante en la síntesis de las hormonas vinculadas a la inmunidad. Por ejemplo, actúa sobre el sistema linfático. En un papel más sinérgico, se sabe que refuerza la acción del zinc y el cobre (Ribault-Le, 2005).

El silicio orgánico estimula el sistema inmunológico, ya que refuerza las defensas inmunitarias de los organismos, dinamiza protege y regenera la totalidad de las células del cuerpo como el tejido conectivo que forma parte de la mayoría de los tejidos corporales, y mejora el funcionamiento de las células del organismo, la eliminación de desechos y la transmisión de información, entre otras. Es un complemento útil en muchos problemas crónicos, que puede acompañar a cualquier tipo de terapia. El silicio orgánico está vinculado a una molécula orgánica (aminoácido), que para poder pasar la barrera digestiva, éste se asocia a una proteína que le sirve de acarreadora. Esta proteína no le es específica, se vincula también con otros oligo-elementos, minerales y sustancias (Ribault-Le, 2005).

Por otra parte, su presencia es muy importante en el suelo, al igual que en el seno del reino vegetal ya que funge como: apoyo en la resistencia ante agresiones producidas

por hongos, asimismo puede ser benéfico para el desarrollo de las plantas en condiciones de estrés biótico o abiótico (Parra-Terraza *et al.*, 2003). Si se estudia su presencia en el seno de los distintos reinos, se puede reconocer que es un protagonista importante del ser vivo, de acuerdo a las múltiples funciones que desempeña en cada organismo.

### **Bioquímica del silicio.**

Para poder comprender la biodisponibilidad del silicio orgánico, es importante diferenciar las formas bioquímicas la sílice y el silicio. El silicio coloidal (sílice mineral: arcilla u otros) se forma por coloides en suspensión en el agua. Para poder aumentar la asimilación de un coloide, es necesario reducirlo.

Su deficiencia produce alteraciones y deformaciones en el crecimiento óseo. Además puede generar una amplia gama de padecimientos como: patologías coronarias, alteraciones osteoarticulares y del tejido de sostén, disminución de las defensas, problemas broncopulmonares, retraso del crecimiento, huesos frágiles, piel deshidratada, acné, tendencia a abscesos y fistulas, amigdalitis, deficiencia intelectual, conjuntivitis, caries dentales, fragilidad y/o caída del cabello, uñas frágiles y opacas, tendinitis, fibrosis, flacidez articular. Además, tanto en la tuberculosis como en el cáncer se ha confirmado la falta de este mineral (Ribault-Le, 2005).

## 2. ANTECEDENTES.

De acuerdo a la presencia de infecciones causadas por agentes virales y bacterianos en el ámbito de la acuicultura de especies marinas, las cuales han provocado cuantiosas pérdidas en términos de impacto económico a nivel mundial, ha surgido la necesidad de realizar una diversidad de trabajos que permitan disminuir riesgos asociados a microorganismos patógenos. En el campo científico, se han realizado una gran diversidad de trabajos que nos permiten obtener más información sobre el sistema inmune de organismos acuáticos, así como sobre las diferentes vías de propagación de los microorganismos patógenos. Trabajos referentes a la inmunoestimulación de los mismos, con su posterior desafío con WSSV y *V. harveyi* (Rodríguez, 2004; Molina, 2004; Maldonado-Villavicencio, 2003; Cheng, W. *et al.*, 2005), con la finalidad de descubrir el comportamiento del sistema de defensa de éstos organismos ante un inmunoestimulante, qué mecanismos de defensa están directamente relacionados ante un ataque viral ó bacteriano para determinar la efectividad del inmunoestimulante, misma que se puede definir evaluando parámetros inmunológicos, la supervivencia y daño histopatológico de organismos retados (Rodríguez *et al.*, 2003; Maldonado-Villavicencio, 2003; Zhang-Zhi *et al.*, 2005). Estos trabajos han servido de mucha ayuda para poder buscar otras alternativas que en un momento puedan servir para poder disminuir de una manera significativa las pérdidas económicas ocasionadas por la presencia de estas infecciones.

La nutrición y el control de enfermedades son los puntos que han requerido mayor atención por parte, no solamente de los acuacultores, sino de todos los involucrados en la producción animal. La aparición de una enfermedad está relacionada con el

rompimiento del equilibrio entre el huésped y su medio y la estrategia invasora utilizada por el patógeno agresor. En los animales acuáticos la situación se complica a favor del agresor ya que el medio constituye una vía de diseminación del patógeno. Varios trabajos realizados en diferentes penaeidos y otros crustáceos, sugieren que el WSSV y los *Vibrios* aprovechan el hecho de que sus huéspedes son organismos acuáticos y además de ingresar por medio del alimento, utilizan el agua como vehículo de transporte e ingreso. Por otra parte el tejido epitelial no sólo sería la puerta de entrada en el cuerpo del hospedero, sino también uno de los blancos preferidos por el virus (Chang-Fang *et al*, 1996). En efecto, los primeros tejidos invadidos por el virus son: estómago, hepatopáncreas, branquias, hemocitos y epitelio cuticular (Chang-Fang *et al*, 1996). Esto además de facilitar una rápida diseminación del virus en los tejidos a través del hemocele, implicaría también, una eficaz y rápida inmunosupresión.

#### **Sistema de defensa de crustáceos.**

Gracias a los avances científicos realizados con lo que respecta a la inmunología de camarón, se han descubierto varios componentes celulares y humorales que están directamente relacionados con los diferentes procesos de defensa en estos organismos, los cuales pueden ser utilizados para poder definir el estado inmunológicos de los mismos cuando éstos han sido inmunoestimulados y desafiados con algún patógeno, algunos de estos componentes son: células circulantes o hemocitos, moléculas inmunoefectoras (proteínas, péptidos) proteínas plasmáticas, enzimas e inhibidores (Maldonado-Villavicencio, 2003; Magallón-Servín, 2004; Campas-Córdova *et al.*, 2005).

**Inmunoestimulación.**

Dentro de las estrategias involucradas para prevenir pérdidas en la acuicultura ocasionadas por enfermedades producidas por bacterias y virus, están las prácticas básicas de buen manejo, quimio-terapia, vacunación, probióticos e inmunoestimulantes (Dehasque-Marleen *et al.*, 2003).

La inmunoestimulación profiláctica ha sido una de las técnicas más exitosas, empleadas para el control de enfermedades infecciosas en el hombre. Por ello se ha propuesto que la inmunoestimulación puede ser una vía adecuada para prevenir infecciones producidas por agentes virales (Scholz, *et al.*, 1999; López-Hernández *et al.*, 2003), para camarones cultivados, ya que existen evidencias que señalan el efecto protector de los  $\beta$ -glucanos y péptidoglicanos contra el WSSV con lo cual se reducen así los riesgos y costos de producción (Rendón y Balcázar, 2003). Sin embargo, para lograrlo se tiene que profundizar sobre el conocimiento del sistema inmune del camarón, mecanismos de defensa involucrados como: la presencia de células o moléculas de reconocimiento, y los requisitos para la inmunoestimulación, principalmente su expresión y su regulación para poder proponer estrategias confiables de manipulación y estimulación.

Los inmunoestimulantes son sustancias que tienen la cualidad de alertar al sistema inmune no específico y pueden ser extraídas de las paredes de microorganismos, como bacterias Gram negativas (lipopolisacáridos), bacterias Gram positivas (péptidoglicanos) y de hongos, levaduras y algas ( $\alpha$ -glucanos), también pueden ser químicos, drogas, estresantes o acciones que elevan el mecanismo de las defensas no específicas o la respuesta inmuno-específica (Rendón y Balcázar, 2003).

La vía de inmunoestimulación es un factor muy importante, sobre todo en caso de organismos pequeños, donde la eficiencia de la estimulación se debe valorar en términos de factibilidad de técnica. Existen varias vías de estimulación que han sido descritas por diferentes autores como: inmersión, inyección (Chen y Ainsworth, 1992; Jorgensen *et al.*, 1993, Rorstad *et al.*, 1993), la administración por vía oral incorporando las sustancias inmunoestimulantes en el alimento (sería el método más práctico para los sistemas de cultivo de camarón).

Por otra parte, una estrategia muy interesante es el manejo de la salud del animal mediante probióticos, los mismos que pueden actuar a la vez como inmunoestimulante. (Aguirre-Guzmán y Ascencio-Valle, 1999; Gatesoupe, 2000; Gullian-Klanian, 2001). La vacunación ofrece la mejor prevención contra enfermedades específicas, pero todavía no existen vacunas efectivas contra un gran número de patógenos bacterianos y virales de importancia comercial. Aunado a esto, la vacunación no es aplicable a larvas o estadios tempranos de juveniles de peces y camarones los cuales tienen un sistema inmune poco desarrollado y depende de un sistema inmune no específico, respectivamente (Berger, 2000; Kimbrell and Beutler, 2001).

Asimismo, se ha probado que el sistema inmune se puede también modular mediante aditivos nutricionales como las vitaminas C y E, las cuales promueven un buen funcionamiento de las células inmunitarias demostrando una respuesta positiva sobre el sistema inmune del camarón. Molina *et al.* (2002), observaron que al incluir en la dieta de *L. vannamei* una mezcla de 50 mg de vitamina E / 50 mg de vitamina C con 75 mg

$\beta$ -glucano por kg de balanceado, la respuesta inmunitaria mejoró y aumentó la resistencia ante una infección con WSSV (Molina *et al.*, 2002).

### **Inmunoestimulación en camarón *L. vannamei*.**

El interés en el uso de inmunoestimulantes ha aumentado con la presencia de enfermedades en camarones frecuentemente expuestos a condiciones estresantes. El primer paso para intentar la inmunoestimulación en los camarones es demostrar la existencia de moléculas específicas de reconocimiento y, que tales moléculas, pueden ser inducidas o activadas. Además, y tal vez sea la parte más difícil, es encontrar una forma operativamente viable de llevar a cabo la inmunoestimulación. Las vitaminas E y C dietéticas han sido utilizadas en combinación con glucanos para mejorar el sistema inmune del camarón *L. vannamei* con su posterior desafío con WSSV (Molina *et al.*, 2002); ya que éstas actúan removiendo, disminuyendo o previniendo la iniciación y/o propagación de los radicales libres nocivos producidos a través de la actividad celular normal y de factores medio ambientales adversos (Chew, 1995).

En realidad el uso de  $\beta$ -glucanos como inmunoestimulante ha dado resultados alentadores para mejorar la resistencia a enfermedades virales y bacterianas en peces y crustáceos ya que se ha demostrado que los glucanos tienden a mejorar la resistencia a enfermedades en *P. monodon* (Chang-Fang *et al.*, 1999; Chang-Fang *et al.*, 2003), y la respuesta inmunitaria en *L. vannamei* (Otero, 2001). Asimismo, se ha estudiado el efecto de inmunoestimulantes ( $\beta$ -glucanos, lipopolisacáridos (LPS) y fucoidán) en respuesta a la actividad antioxidante de la MnSOD en *L. vannamei* (Campa-Córdova *et al.*, 2005). Estos polisacáridos, formados por enlaces  $\beta$ -1.3 y  $\beta$ -1.6, forman parte de la

pared celular de las levaduras y hongos (Maldonado-Villavicencio, 2003). En otros estudios se ha reportado que en *P. monodon* los parámetros inmunológicos como; CTH, PO,  $O_2^-$  y SOD se incrementan cuando son alimentados con dietas que contienen concentraciones de  $10\text{g Kg}^{-1}$  dieta de  $\beta$ -glucanos, además aumentan la supervivencia de éstos organismos en un 50 % ante una infección con WSSV (Chang-Fang *et al.*, 2003).

En hemocitos de penaeidos se ha demostrado la activación de la respuesta celular mediante antígenos microbianos de superficie como  $\beta$ -glucanos, LPS, zymosan (Leonard *et al.*, 1985; Song-Ling y Hsieh-Ting, 1994), péptidoglicanos (Itami *et al.*, 1998) y de bacterias como *V. vulnificus* y *V. parahaemolyticus* (Sung-Hung *et al.*, 1994; Campa-Córdova *et al.*, 2002). Se demostró que el uso de polisacáridos sulfatados y  $\beta$ -glucanos por inmersión aumenta la capacidad respiratoria de *L. vannamei* (Campa-Córdova *et al.*, 2002), En otros trabajos se ha reportado que el uso de cepas probióticas como: *Bacillus sp.* (P64), *V. alginolyticus* y *Vibrio sp.* (P62) han mejorado la respuesta inmunitaria e incrementan el peso promedio de *L. vannamei* (Guillan-Klanian, 2001). En otro trabajo se concluyó que el efecto del inmunoestimulante es de carácter selectivo, ya que existen familias resistentes al WSSV sin inmunoestimulante y cuando estas familias son expuestas a  $\beta$ -glucanos no se observa el mismo efecto. Por otra parte, se ha demostrado que una de las características propias de familias resistentes al WSSV, es que el número de hemocitos hialinos tiende a disminuir ante la infección, el porcentaje de hemocitos atípicos disminuye significativamente a las 24 h de infección y además existe una rápida proliferación de hemocitos saludables y la ubicación de estos en sitios estratégicos (Maldonado-Villavicencio, 2003).



Una forma para evaluar la eficacia de inmunoestimulantes y otras moléculas inmunomoduladoras en crustáceos, además de la supervivencia, sería mediante la cuantificación de parámetros inmunitarios. Estudios sobre parámetros celulares y humorales tales como: actividad catalasa, generación de radicales de oxígeno, actividad lizosima, actividad fenoloxidasa, conteo total de hemocitos, la actividad de la superóxido dismutasa, actividad profenoloxidasa, fosfatasa alcalina, fosfatasa àcida e índice mitótico del tejido hematopoyético, hemoaglutinación (Rodríguez *et al.*, 2000; Campa-Córdova *et al.*, 2002; Magallón-Servín, 2004; Zhang-Zhi *et al.*, 2005), se están realizando como bioindicadores de salud. El diagnóstico hemocitario podría constituir un marcador del estado fisiológico e inmunitario de los camarones (Tsing *et al.*, 1987), estableciendo de esta forma un sistema de control inmune que permitirá la detección de inmunodeficiencias y control de la calidad ambiental (Tsing *et al.*, 1987; Bachère, 2000).

### **Comportamiento inmunitario de organismos desafiados con WSSV y *V. harveyi*.**

Los mecanismos de resistencia del camarón blanco *L. vannamei* al virus de la mancha blanca (WSSV) y otros agentes virales han sido estudiados por varios autores (Rodríguez, 2004, Zhang-Feng *et al.*, 2005). Mecanismos de defensa hemocitarios tales como infiltración, fagocitosis y encapsulación de células, se encuentran asociados a los procesos inmunitarios del camarón. En los crustáceos, cada tipo de célula tiene un rol en las reacciones de defensa, y la respuesta se ve influenciada por el tipo de patógeno o partícula extraña reconocida por el hospedero como no propia (Jiravanichpaisal *et al.*, 2001). Algunos de los parámetros a los cuales se le ha dado mucha importancia en la actualidad con lo que respecta a organismos desafiados con WSSV, son la

diferenciación de hemocitos, así como la expresión de diferentes enzimas involucradas en la eliminación de sustancias reactivas de oxígeno, que a su vez son generadas cuando los organismos son invadidos por algún patógeno. También se ha detectado que un factor clave para disminuir las mortalidades en cultivo por la presencia de WSSV, es el control de un parámetro fisicoquímico del medio de cultivo como lo es la temperatura, ya que ciertos estudios realizados han reportado que la temperatura de 33°C es ideal (Holmblad y Söderhäll, 1999; Rodríguez., *et al.*, 2001; Tavares-Sánchez *et al.*, 2004 y Campa-Córdova *et al.*, 2005).

### 3. JUSTIFICACIÓN.

Las enfermedades en acuicultura, vienen provocando anualmente pérdidas millonarias, por lo que la prevención y control encierra la mayor importancia. Por otro lado, se tiene que el sistema inmune juega un papel muy importante en las relaciones existentes entre desnutrición e infección. Las deficiencias nutricionales resultan ser fuertes condicionantes de supresión de diversas funciones inmunes que son fundamentales para proteger eficientemente a un organismo de infecciones bacterianas o virales (Langseth, 1999). Dentro de este tipo de interrelaciones se incluye no únicamente lo relacionado con problemas de deficiencias nutricionales, sino que también se incluye lo relacionado a fases de crecimiento y desarrollo. El común denominador en todos estos casos es una deficiencia inmunitaria asociada a problemas nutricionales. De aquí que una de las áreas de aplicación de los nutracéuticos se refiere a la estimulación del sistema inmune de organismos saludables con el fin de mejorar aún más sus condiciones de salud.

A pesar del número de logros terapéuticos alcanzados, especialmente en el campo de los antibióticos, las infecciones y sus consecuencias siguen siendo uno de los mayores problemas desde el punto de vista salud. En adición a esto, ha venido ocurriendo un incremento dramático en la incidencia de bacterias patógenas resistentes a antibióticos. En virtud de ello, ha surgido la preocupación de que la industria farmacéutica va a resultar ineficiente en el desarrollo de antibióticos efectivos a una velocidad suficientemente rápida como para poder competir con el desarrollo de resistencia microbiana a antibióticos de primera generación. Estos factores han renovado el interés en la posibilidad de incluir en los alimentos microorganismos benéficos, como una alternativa a las terapias de antibióticos en infecciones bacterianas (Rolfé, 2000).

El campo de la investigación científica con nutraceuticos se caracteriza por el inadecuado entendimiento, pero da resultados muy interesantes cuando estos son aplicados en organismos. Las investigaciones con nutraceuticos han consistido en experimentos con docenas de diferentes cepas bacterianas o suplementos nutricionales, y en combinaciones de cepas usadas a diferentes dosis en estudios *in vitro* en animales o en humanos, con docenas de metas de investigación. A partir de los resultados positivos obtenidos, y pese a la ausencia de modelos de mecanismos de acción, éstos contribuyen a darle validez al concepto de nutraceutico. Un reflejo de esto es el hecho de que se ha expandido considerablemente a nivel mundial el número de productos que contienen nutraceuticos (Sanders, 2000). En este sentido, es importante mencionar que expertos en el campo de nutraceuticos y alimentos funcionales han manifestado que un prerrequisito para el éxito de un proyecto de investigación y desarrollo científico de nutraceuticos debe contemplar el desarrollo de conocimiento básico sobre la interacción de un elemento o suplemento nutricional con el huésped (Tannock, 1999).

Ahora bien, tomando en consideración el gran potencial nutraceutico que el silicio orgánico ofrece, y tomando en consideración el impacto que representa WSSV en la camaronicultura, en el presente trabajo de tesis se propuso un estudio encaminado a evaluar, desde el punto de vista inmunológico, bioquímico, fisiológico y nutricional, el valor nutraceutico (inmunoestimulador-antioxidante) del silicio orgánico, estableciendo para ello un sistema de administración por inmersión e incluido en el alimento artificial a fin de asegurar la ingesta de silicio orgánico y mayor permanencia en el tracto digestivo de juveniles de camarón blanco, y con ello favorecer los niveles de

incorporación del nutracéutico por las células del camarón, y de un modelo experimental de infecciones producidas por WSSV y *V. harveyi* en camarón blanco.

Para poder desarrollar un esquema terapéutico para prevenir la infección o reinfección por WSSV o *Vibrios* patógenos es necesario tener conocimiento de cómo manipular y controlar los factores de adhesión, internalización, y proliferación de WSSV en las fases tempranas de los procesos de infección, pero al mismo tiempo, estimular el sistema inmune del camarón mediante la aplicación de compuestos nutracéuticos. El presente trabajo de tesis fue directamente dirigido sobre estos puntos en particular. El proyecto tiene aplicación directa en cuidado de la salud de la camaronicultura en México, así como en otros países en desarrollo de la región, ya que WSSV y vibrios patógenos son hoy por hoy uno de los mayores contribuyentes de las enfermedades infecciosas y mortalidades en los cultivos de camarón. De igual manera, desde el punto de vista de la industria alimenticia, farmacéutica, y/o biotecnológica, el proyecto abre la posibilidad de darle un valor agregado al silicio orgánico, actualmente en México solo utilizado en la agricultura como fertilizante para reducir condiciones de estrés en cultivos en suelos pobres.

#### **4. HIPÓTESIS.**

1. El silicio orgánico actuará como un agente inmunomodulador sobre la respuesta inmune del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* provocando cambios significativos en el número de hemocitos circulantes, y la actividad de las enzimas antioxidantes: superóxido dismutasa y catalasa.
  
2. El silicio orgánico incrementa de manera significativamente la resistencia de *Litopenaeus vannamei* ante infecciones provocadas por el virus del Síndrome de la Mancha Blanca y la bacteria patógena *Vibrio harveyi*.

## 5. OBJETIVOS.

### **Objetivo general.**

Evaluar el efecto del silicio orgánico sobre la función inmune del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, así como su capacidad profiláctica ante infecciones con Virus del Síndrome la Mancha Blanca (WSSV) y la bacteria *Vibrio harveyi*.

### **Objetivos específicos.**

1. Evaluar el efecto del silicio orgánico sobre el contenido de hemocitos circulantes, actividad de la enzima superóxido dismutasa, actividad catalasa y producción de anión superóxido en juveniles de *Litopenaeus vannamei* expuestos a diferentes concentraciones de silicio orgánico tanto por inmersión o por incorporación del mismo en el alimento.
2. Evaluar la supervivencia, conteo total de hemocitos y daño histopatológico en tejidos y órganos de juveniles de *Litopenaeus vannamei* desafiados con el Virus del Síndrome de la Mancha Blanca (WSSV), previamente expuestos a silicio orgánico por inmersión.
3. Evaluar el conteo total de hemocitos, actividad de la enzima superóxido dismutasa, contenido de proteína soluble y producción de anión superóxido, así como la supervivencia y el daño histopatológico de *Litopenaeus vannamei* desafiados con *Vibrio harveyi*, después de haber sido expuestos a silicio orgánico por inmersión o en el alimento.

## **6. MATERIAL Y MÉTODOS.**

Los trabajos experimentales se realizaron en el Laboratorio de Nutrición acuícola y Ecofisiología de Organismos Acuáticos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C., (CIBNOR) ubicado a 17 km. de la ciudad de La Paz, Baja California Sur, México, así como en el Laboratorio de Sanidad Acuícola del Centro de Ciencias de Sinaloa (CCS), en Culiacán, Sinaloa, México.

### **6.1 Alimentos experimentales.**

#### **6.1.1 Materias primas e ingredientes.**

La mayor parte de los ingredientes para los alimentos fueron adquiridos de casas comerciales. El silicio orgánico fue donado por el Dr. Edgar Quero Gutiérrez del Instituto Tecnológico Superior de Uruapan.

#### **6.1.2 Formulación y fabricación de alimentos.**

Para la formulación del alimento de referencia se tomaron como base los requerimientos nutricios reportados para el camarón blanco *L. vannamei* (Akiyama y Dominy, 1989), utilizando el paquete MIXIT-Win<sup>MR</sup> (Agricultural Software Consultants, Inc., San Diego, Ca, USA) (Tabla 1). La composición de las premezclas de minerales y de vitaminas se muestra en las Tablas 2 y 3, respectivamente.

En la planta de alimentos del CIBNOR los ingredientes sólidos fueron molidos en un pulverizador (PULVEX Mod.200) y pasados a través de un tamiz de 250  $\mu\text{m}$ . Se mezclaron primero los macroingredientes secos (harina de pescado, pasta de soya, harina integral de trigo, y gluten de trigo) durante 8 minutos en una mezcladora



KITCHEN AID<sup>MR</sup>, después se adicionaron los microingredientes (vitamina C, cloruro de colina, colesterol, fosfato dibásico de sodio, ácido algínico, premezcla de vitaminas y premezcla de minerales) y se mezclaron durante 8 minutos. Posteriormente, se hizo una emulsión con el aceite de hígado de bacalao, aceite de girasol, lecitina de soya y BHT; misma que fue incorporada a la mezcla de ingredientes secos y mezclada durante 5 min. Una vez homogeneizados los ingredientes, se agregó el silicio orgánico junto con el agua, los cuales juntos guardarían una proporción de (45-50%) con respecto al peso de la masa de cada alimento, y se mezclaron durante 2 ó 3 minutos. La masa resultante fue extruída en tres ocasiones en un molino de carne (TOR-REY<sup>MR</sup> Monterrey, N.L., México) para obtener pelets de 2 mm de diámetro, mismos que fueron cortados manualmente y secados en un horno a una temperatura de 40 °C por 16 h. Posteriormente, los alimentos fueron embolsados, etiquetados y almacenados bajo refrigeración (4°C) hasta su uso.

## **6.2 Análisis químicos.**

Los alimentos fueron analizados en su composición química proximal utilizando la metodología descrita en AOAC (1995). La humedad se determinó por diferencia de peso (No. 930.15); el contenido de cenizas se determinó por calcinación en mufla a 550° C (No. 942.05); para la cuantificación de proteína cruda se utilizó un digestor y un destilador automático TECATOR<sup>MR</sup>, siguiendo el método de microkjeldahl, utilizando el factor general de 6.25 (No. 976.05); el extracto etéreo se cuantificó utilizando un equipo SOXHTEC-AVANTI<sup>MR</sup>, para lo cual se uso éter de petróleo como solución extractora (No. 920.39) y el contenido de fibra cruda se determinó por hidrólisis sucesiva, ácida y básica (ácido sulfúrico e hidróxido de sodio) (No. 920.39). El Extracto Libre de Nitrógeno (E.L.N.) de los alimentos fue calculado restando los porcentajes de

proteína cruda, extracto etéreo, fibra cruda y cenizas de cada uno expresados en base seca. La energía (cal/g) por medio de calorímetro (Parr<sup>MR</sup> Mod. 1261).

### 6.3 Estabilidad de alimento en el agua.

Los alimentos fueron sometidos a una prueba de estabilidad en agua, siguiendo la metodología descrita en Goytortúa-Bores (2000): dos g de alimento (porcentaje de humedad conocido) se colocaron en un matraz Erlenmeyer de 250 mL, el cual contenía 200 mL de agua destilada a 27°C. Después de una hora de inmersión, sin agitación, el contenido del matraz se filtró a través de un papel filtro Whatman No. 1, previamente secado y pesado, con la ayuda de una bomba de vacío. El papel filtro con el alimento residual se sometió a un secado en una estufa con flujo de aire a 40°C por 24 horas. La fórmula utilizada para determinar la estabilidad de la muestra en el agua, calculada como porcentaje de materia seca retenida, es la siguiente:

$$\% \text{ de materia Seca Retenida} = \frac{\text{Peso seco de alimento residual}}{\text{Peso seco de alimento inicial}} \times 100$$

**6.4 Experimento 1.** Evaluación del efecto del silicio orgánico sobre la respuesta inmune en juveniles de *Litopenaeus vannamei* al ser expuestos a tres niveles de silicio orgánico por inmersión.

Para realizar los experimentos del presente trabajo y evaluar el efecto del silicio orgánico sobre la respuesta inmune del camarón blanco *L. vannamei* tanto por inmersión como por inclusión en la dieta se diseñaron 4 alimentos.

TABLA II. Composición en ingredientes (g/100g de alimento), composición proximal (g/100g de materia seca, excepto humedad) y estabilidad en el agua de los alimentos para evaluar el producto comercial sílice orgánico en juveniles de *L. vannamei*.

INGREDIENTE	ALIMENTO			
	Control	CH <sub>3</sub> Si(OH) <sub>3</sub> 10	CH <sub>3</sub> Si(OH) <sub>3</sub> 50	CH <sub>3</sub> Si(OH) <sub>3</sub> 100
Harina de Pescado <sup>1</sup>	20,0	20,0	20,0	20,0
Pasta de soya <sup>1</sup>	25,0	25,0	25,0	25,0
Harina integral de trigo <sup>1</sup>	38,9	38,9	38,9	38,9
Gluten de trigo <sup>2</sup>	4,0	4,0	4,0	4,0
Ácido algínico <sup>3</sup>	2,0	2,0	2,0	2,0
Premezcla de vitaminas <sup>4</sup>	1,8	1,8	1,8	1,8
Premezcla de Minerales <sup>5</sup>	0,5	0,5	0,5	0,5
Cloruro de Colina <sup>6</sup>	0,2	0,2	0,2	0,2
Vitamina C, Stay C 35% <sup>1</sup>	0,09	0,09	0,09	0,09
Fosfato dibásico de sodio <sup>7</sup>	1,2	1,2	1,2	1,2
Colesterol <sup>8</sup>	0,5	0,5	0,5	0,5
Aceite de Hígado de Bacalao <sup>9</sup>	3,0	3,0	3,0	3,
Aceite de Girasol <sup>10</sup>	1,3	1,3	1,3	1,3
Lecitina de Soya <sup>11</sup>	1,5	1,5	1,5	1,5
BHT <sup>12</sup>	0,004	0,004	0,004	0,004
Silicio orgánico <sup>13</sup>	-----	0.001	0.005	0.01
<b>Composición proximal<sup>14</sup></b>				
Humedad	5.79±0.1	5.37±0.0	6.47±0.1	5.79±0.1
Proteína cruda	35.87±0.2	35.71±0.3	35.95±0.3	36.63±0.1
Extracto etéreo	7.88±0.1	7.72±0.1	7.68±0.3	7.89±0.1
Fibra cruda	1.12±0.0	1.07±0.0	0.92±0.0	0.88±0.0
Cenizas	7.5±0.0	7.49±0.0	7.49±0.1	7.37±0.1
E.L.N. <sup>15</sup>	47.6	48.0	48.0	47.2
Energía bruta (Cal/g) <sup>16</sup>	4627	4639	4630	4651
Hidroestabilidad (%)	95	92	96	95

<sup>1</sup> Promotora Industrial Acuasistemas, S.A., La Paz, BCS, México, <sup>2</sup> Gluten y almidones industriales S.A. de C.V., México, D.F., <sup>3</sup> Sigma A-7128, <sup>4</sup> ICN Biomedical Inc. Ohio. USA. SIGMA Co. St. Louis. USA., <sup>5</sup> SIGMA Co. St. Louis, USA. <sup>6</sup> Roche, D.F. México. <sup>7</sup>SIGMA # cat. S-0876., <sup>8</sup>SIGMA # cat. S-8503. <sup>9</sup> Aceite de hígado de bacalao, Farmacia París, México, D.F. <sup>10</sup> AcGir0401, <sup>11</sup> ODONAJI, Distribuidora de alimentos naturales y nutricionales S.A. de C.V. México, D.F. <sup>12</sup> Butylated hydroxytoluene, ICN # cat. 101162, <sup>13</sup> D.F. México. <sup>14</sup> Los valores son los promedios de tres réplicas ± desviación estándar. <sup>15</sup> Extracto libre de nitrógeno.

<sup>1</sup> Promotora Industrial Acuasistemas, S.A., La Paz, BCS, México, <sup>2</sup> Gluten y almidones industriales S.A. de C.V., México, D.F., <sup>3</sup> Sigma A-7128, <sup>4</sup> ICN Biomedical Inc. Ohio. USA. SIGMA Co. St. Louis. USA., <sup>5</sup> SIGMA Co. St. Louis, USA. <sup>6</sup> Roche, D.F. México. <sup>7</sup>SIGMA # cat. S-0876., <sup>8</sup>SIGMA # cat. S-8503. <sup>9</sup> Aceite de hígado de bacalao, Farmacia París, México, D.F. <sup>10</sup> AcGir0401, <sup>11</sup> ODONAJI, Distribuidora de alimentos naturales y nutricionales S.A. de C.V. México, D.F. <sup>12</sup> Butylated hydroxytoluene, ICN # cat. 101162, <sup>13</sup> D.F. México. <sup>14</sup> Los valores son los promedios de tres réplicas ± desviación estándar. <sup>15</sup> Extracto libre de nitrógeno.

TABLA III Composición de la premezcla de vitaminas (Davis and Arnold, 2002).

<b>Vitaminas</b>	<b>Catálogo</b>		<b>g/kg de premezcla</b>
Vit. A Acetate (20,000 UI/g)	ICN	160079	5.0
Vitamin D <sub>3</sub> (850,000 UI/g)	ICN	160107	0.001
dl-alfa-tocopheryl acetate (250 UI/g)	SIGMA	T-3376	8.0
Menadione	ICN	102259	2.0
Thiamin-HCl	ICN	103029	0.5
Riboflavin (B <sub>2</sub> )	ICN	102813	3.0
Pyridoxine-HCl (B <sub>6</sub> )	ICN	102777	1.0
DL Ca-Pantothenate	ICN	101228	5.0
Nicotinic acid	ICN	102446	5.0
Biotin	ICN	101023	0.05
Inositol	ICN	102052	5.0
Vitamin B <sub>12</sub>	ICN	103271	0.002
Folic acid	ICN	101725	0.180
Filler (alfa-cellulose)	SIGMA	C- 8002	865.2

Biomedical Inc. Ohio. USA. SIGMA Co. St. Louis. USA.

TABLA IV Composición de la premezcla de minerales (Davis and Arnold, 2002).

<b>Minerales</b>	<b>Catálogo SIGMA*</b>	<b>g/100 g de premezcla</b>
Cobalt chloride	C - 2644	0.004
Cupric sulfate pentahydrate	C - 6917	0.25
Ferrous sulfate	F - 7002	4.00
Magnesium sulfate heptahydrate	M - 9697	28.39
Manganous sulfate monohydrate	M -3634	0.65
Potassium iodide	P - 4286	0.07
Sodium selenite	S - 1382	0.01
Zinc sulfate heptahydrate	Z - 0501	13.19
Filler (alfa-cellulose)	C- 8002	53.43

SIGMA, Co. St., Louis, USA.

#### **6.4.1 Obtención de los organismos y aclimatación.**

Se utilizaron juveniles de *L. vannamei* (Boone, 1931) donados por Acuacultores de La Paz, S. A. (APSA), ubicada en la ciudad de La Paz, B.C.S. Éstos fueron aclimatados en el Laboratorio de Nutrición Experimental del CIBNOR dentro de tanques de plástico con 1,500 L de capacidad a una temperatura de 27 °C, concentración de O<sub>2</sub> >4 mg/L y salinidad de 40 ppm. Los organismos se alimentaron dos veces al día a saciedad aparente, con un pelet comercial con 35% de proteína, durante 15 días.

#### **6.4.2 Sistema de cultivo.**

El sistema de cultivo utilizado para llevar a cabo la exposición de los organismos al silicio orgánico tanto por inmersión (Exp. 1) como por inclusión en la dieta (Exp. 2), consistió de 12 acuarios de fibra de vidrio de 60 L de capacidad cada uno. Cada acuario está equipado con sistema de aireación (exhaustor externo) y control de temperatura [calentadores sumergibles de 250W (EBBO-JAGER<sup>MR</sup>) con precisión de  $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ ], iluminación con focos de 60 w controlados por un reloj a manera de mantener un fotoperíodo (12h luz/12h) constante a lo largo de los experimentos, y drenaje. (Fig. 1).



Fig. 1. Sistema de cultivo utilizado para la evaluación del silicio orgánico como agente inmunonutricional, tanto por inmersión como por inclusión en la dieta en el Laboratorio de Nutrición Experimental en el CIBNOR.

Para evaluar el silicio orgánico como un agente inmunomodulador por inmersión, organismos con peso promedio de  $10 \pm 0.5$  g fueron colocados en 12 acuarios a razón de 8 organismos por acuario y se aclimataron al alimento control por tres días. Posteriormente fueron expuestos por inmersión a diferentes concentraciones de silicio orgánico (0, 1 10 y 100 mg/L) por triplicado. Se llevó a cabo un monitoreo diario de temperatura y oxígeno disuelto (oxímetro YSI<sup>MR</sup> Modelo 57) y salinidad con un refractómetro.

**6.4.3 Obtención de muestras.** Después de iniciada la exposición de los organismos al silicio orgánico por inmersión, se tomaron muestras de hemolinfa, músculo y hepatopáncreas a las 6, 24, 48 y 72h, y se congelaron  $-80^{\circ}\text{C}$ . En cada muestreo se determinó el peso y el estadio de muda de cada organismo de acuerdo a la técnica descrita por Promwikorn *et al.* (2004), utilizando únicamente aquellos en estadio C para realizar los análisis.

#### **Extracción de hemolinfa**

A cada camarón se le tomó una muestra de 500  $\mu\text{L}$  de hemolinfa con un volumen mínimo de solución anticoagulante. La hemolinfa se extrajo de la región ventral del camarón entre el último par de pereopodos y el primer par de pleópodos. Para evitar la coagulación de la muestra se utilizó SIC-EDTA (450mM de NaCl, 10mM de KCl, 10mM HEPES, 10mM EDTA en agua destilada, pH 7.3), en relación 1:1 de acuerdo a la técnica reportada por Campa-Córdova *et al.*, (2002). Esta fue conservada en tubos Eppendorf de 1.5 mL en hielo, para su procesamiento inmediato.

Los parámetros inmunológicos determinados en la hemolinfa fueron: conteo total de hemocitos de acuerdo a la técnica utilizada por Campa-Córdova *et al.* (2002); producción de anión superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) técnica descrita por Song-Ling y Hsied-Ting (1994). La actividad superóxido dismutasa (SOD) se determinó de acuerdo con el método propuesto por Beauchamp y Fridovich (1971) y la cuantificación de proteína soluble se determinó de acuerdo al método de Bradford (1976). En hepatopáncreas y en músculo se cuantificó la proteína total soluble, actividad SOD, y la actividad catalasa mediante la técnica de Aebi (1985).

#### **6.4.4 Conteo total de hemocitos.**

Para el conteo total de hemocitos se utilizó la técnica utilizada por Campa-Córdova *et al.* (2002). Se tomaron 100  $\mu\text{L}$  de muestra (Solución Hemolinfa: SIC EDTA) a la que se le agregaron 400  $\mu\text{L}$  de formaldehído al 4 % en solución SIC EDTA. Los hemocitos fueron contados en una cámara Neubauer, con ayuda de un microscopio compuesto.

#### **6.4.5. Anión superóxido.**

La producción de anión superóxido en hemocitos fue cuantificada de acuerdo a la técnica descrita por Song-Ling y Hsied-Ting (1994). Cien  $\mu\text{L}$  de hemolinfa recolectada de un solo camarón fueron colocados en tubos Eppendorf cónicos de 1.5 mL por triplicado y fueron centrifugados a 800g durante 5 min a 4°C (condiciones de centrifugación=\*) en una centrifuga Beckman, Modelo GS-15R; Rotor No. F2402. Después se eliminó el sobrenadante y se realizó un lavado con 100  $\mu\text{L}$  solución anticoagulante, bajo las mismas condiciones de centrifugación (\*), se separó el sobrenadante, se agregaron 50  $\mu\text{L}$  de laminarian (2mg/mL) a los tubos positivos y 50  $\mu\text{L}$  de HSSB. Tanto a los tubos positivos como al control se les agregaron 50  $\mu\text{L}$  de NBT (0.3%); las muestras fueron incubadas por 30 minutos a una temperatura de 37 °C. La reacción inicial fue terminada con la remoción del NBT, para lo cual las muestras fueron centrifugadas (\*), el sobrenadante fue removido y se hicieron lavados con 100  $\mu\text{L}$  de metanol absoluto y 2 lavados con 100  $\mu\text{L}$  metanol al 70%. Después de los 3 lavados, los hemocitos fueron secados a temperatura ambiente durante 2 horas y se le agregó KOH 2M y DMSO para disolver el formazan citoplasmático. La densidad óptica de la disolución del formazan fue medida a 630 nm. Se utilizó la relación de D.O.<sub>630</sub> de los hemocitos estimulados y D.O.<sub>630</sub> de los hemocitos control como un índice de



comparación de los efectos de los diferentes tratamientos sobre la generación del anión superóxido. Los resultados de son expresados en D.O.

#### **6.4.6. Superóxido Dismutasa (SOD; E.C. 1.15.1.1).**

La actividad de la SOD se determinó de acuerdo con el método propuesto por Beauchamp y Fridovich (1971), utilizando nitro azul de tretazolio (NBT) en presencia de riboflavina, lo que permitió obtener la actividad de la SOD tanto en extracto crudo de músculo, hepatopáncreas y hemocitos en unidades por miligramos (U/mg) de proteína utilizando un programa de computadora (Vázquez-Juárez *et al.*, 1993).

#### **6.4.7 Catalasa (CAT; E.C. 1.11.1.7).**

La actividad catalasa se determinó de acuerdo a Aebi (1985), por registro de la disminución de la concentración de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) a 240 nm con base a un coeficiente de extinción  $40 M^{-1} \cdot cm^{-1}$ , donde 1 unidad de catalasa descompone  $1 \mu mol$  de  $H_2O_2 \text{ min}^{-1}$ . Por lo tanto, el cambio en la densidad óptica (desaparición del peróxido de hidrógeno) por unidad de tiempo es una medición de la actividad catalasa.

### **Músculo y hepatopáncreas.**

#### ***Superóxido dismutasa.***

Se pesaron 100 mg de músculo en tubos Eppendorf y se homogenizaron con Buffer de fosfato pH 7.8 en proporción 1:5, la disrupción del tejido se hizo con unas pinzas durante 5 min. La disrupción de la glándula digestiva (hepatopáncreas) se llevó a cabo con un Politron. El homogenizado fue centrifugado a 4,000 rpm/5 min/4°C, después se separó el sobrenadante y se procedió a realizar los diferentes parámetros inmunológicos. Las muestras siempre se conservaron en hielo.

### ***Actividad catalasa.***

Se pesaron 100 mg de músculo en tubos Eppendorf y se homogenizaron con Buffer de fosfato pH 7.0 en proporción 1:10, la disrupción del tejido se hizo con unas pinzas durante 5 min. La disrupción de la glándula digestiva (hepatopáncreas) se llevó a cabo con un Politrón.

El homogenizado fue centrifugado a 4,000 rpm/5 min/4°C, después se separó el sobrenadante y se procedió a realizar los diferentes parámetros inmunológicos.

Las muestras siempre se conservaron en hielo.

### **6.4.8 Cuantificación de proteínas**

El contenido total de proteína soluble en los extractos crudo de músculo, glándula digestiva y en hemocitos se determinó de acuerdo al método de Bradford (1976), utilizando una curva de BSA (Bovine SERUM Albumin, SIGMA) como estándar, lo que permitió obtener la concentración de proteínas totales (mg/mL).

### **6.4.9. Análisis Estadísticos.**

Primero se realizó una prueba de normalidad en los datos y posteriormente, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía. En los casos donde hubo diferencia significativa ( $P < 0.05$ ), se utilizó la prueba de Tukey para determinar diferencias significativas entre tratamientos. Todos los ensayos estadísticos se realizaron con un 95% de confianza ( $P = 0.05$ ) utilizando el programa STATISTICA 6.0.

**6.5 Experimento 2.** Evaluación del efecto del silicio orgánico sobre la respuesta inmune en juveniles de *L. vannamei* al ser alimentados con la inclusión de silicio orgánico en la dieta.

Organismos con peso promedio de  $12 \pm 0.5$  g fueron colocados en 12 acuarios a razón de 8 organismos por acuario y se aclimataron al alimento control por tres días. Posteriormente, se alimentaron con los alimentos fabricados con diferentes concentraciones de silicio orgánico (0, 10, 50 y 100 mg/kg). Los tratamientos se evaluaron por triplicado.

**6.5.1. Obtención de muestras.** Después de iniciada la alimentación de los organismos con la dieta con silicio orgánico, se realizaron muestreos a las 24, 96, 216 y 264 h, para determinar el estado inmunológico de los organismos. El procedimiento fue similar al referido en la sección de 6.4.3. Los parámetros inmunológicos determinados fueron los mismos mencionados en la secciones de la 6.4.4-6.4.8 con excepción de la actividad SOD en hemocitos. Para el procesamiento de los resultados se usaron los análisis estadísticos referidos en la sección 6.4.9.

**6.6 Experimento 3.** Evaluación del efecto del silicio orgánico por inmersión en la prevención de infecciones producidas con WSSV.

**6.6.1 Obtención de los organismos y aclimatación.** Los camarones utilizados en este experimento fueron juveniles de *L. vannamei* (Boone, 1931), donados por Acuícola Baltasar Rojo, ubicado en el Dorado, Culiacán, Sinaloa. Éstos fueron aclimatados en el Laboratorio de Sanidad Acuícola del Centro de Ciencias de Sinaloa, dentro de taras de plástico de 60L de capacidad a una temperatura de 27 °C, concentración de oxígeno disuelto > 4 mg/L y salinidad de 40 ppm. Los organismos se alimentaron dos veces al día a saciedad aparente con un pelet comercial con 35% de proteína, durante 3 días.

**6.6.2 Sistema de cultivo.**

Posterior al período de aclimatación (5 días), los organismos con un peso promedio de  $8 \pm 0.5$  g, fueron distribuidos aleatoriamente en peceras de vidrio de 18 L de capacidad y alimentados diariamente con un pelet comercial con 35 % de proteína para camarón.

Las condiciones de cultivo que se utilizaron fueron: temperatura  $27 \pm 0.5$  °C; salinidad:  $37 \pm 1$  ‰; oxígeno disuelto: >4 mg/L; recambio de agua/día: 10 ‰; fotoperíodo controlado: 12 horas luz: 12 horas oscuridad. Se colocaron 5 organismos por tanque (por triplicado) por cada dilución (1:1, 1:10, 1:100 y 1:1000), un control y un control negativo (agua de mar filtrada y esterilizada). Los alimentos fueron suministrados a razón del 5 % de la biomasa inicial de cada tanque, posteriormente la ración fue ajustada diariamente en función del alimento consumido. Diariamente se determinó la temperatura, el oxígeno disuelto, el pH y la salinidad.

**6.6.3 Preparación del inóculo viral.** El inóculo fue preparado de acuerdo al método modificado de White *et al.* (2002).

De organismos que habían sido diagnosticado positivos para el virus de la mancha blanca mediante PCR, con el Kit IQ 2000™ WSSV (Farming IntelliGene Tech. Corp), se extrajeron las branquias, tejido cuticular y los pleópodos de 10 organismos, y se homogenizaron en un mortero utilizando agua de mar filtrada (papel filtro de 0.45 micras) y esterilizada en proporción 1:5. El homogenizado se centrifugó a 12,000 rpm, durante 15 min. a temperatura ambiente, luego se separó el sobrenadante, y se procedió a realizar las siguientes diluciones (1:1, 1:10, 1:100 y 1:1000).

**6.6.4 Dosis letal media (DL<sub>50</sub>) en camarón blanco *L. vannamei*.**

Los juveniles de *L. vannamei* con peso promedio de  $8 \pm 0.5$  g, fueron inyectados ( $10 \mu\text{L/g}$  peso del organismo) en el 3er segmento abdominal (Takahashi *et al.*, 1994). Después de iniciada la infección, se procedió a registrar la muerte de organismos cada 6 h de cada dilución, para poder determinar la dosis letal media (DL<sub>50</sub>).

**6.6.5 Exposición de juveniles de *L. vannamei* con tres niveles de inclusión de silicio orgánico por inmersión.** Para realizar este experimento, se utilizó la misma cantidad de organismos, taras de plástico y condiciones de cultivo que se describen en la sección 6.4.2. Los organismos fueron expuestos al silicio orgánico en diferentes tiempos (triplicado): (1 mg/L SiO<sub>2</sub> por 72 h, 10 mg/L por 72 h, y 100mg/L por 48 h).

**6.6.6 Infección con WSSV.** Después que los organismos fueron expuestos al silicio orgánico por inmersión, se procedió a realizar la infección de los mismos con el inóculo de WSSV, para lo cual se utilizó la dilución de 1:100. Posteriormente se registró la mortalidad acumulada para determinar el porcentaje de supervivencia. Se

hizo la extracción de hemolinfa de los organismos para realizar el conteo total de hemocitos, y se fijaron los organismos en una solución de Davidson durante 48 h para evaluar el daño histopatológico.

#### **6.6.7 Análisis histológicos.**

Los cortes histológicos se realizaron a los primeros 5 organismos muertos de cada tratamiento, mismos que fueron fijados en una solución de Davidson. Para realizar el análisis histológico se utilizó la técnica convencional de tinción Hematoxilina-Eosina usada por (Bell and Lightner, 1988). Esta técnica utiliza dos colorantes: en primer lugar los cortes se someten a la acción de la hematoxilina, colorante básico que se une a cualquier sustancia que tenga grupos ácidos, tales como los grupos fosfatos del ADN y a las proteínas nucleares que poseen carga negativa. A continuación, los cortes se someten a la acción de la eosina, colorante débilmente ácido, que colorea las estructuras básicas. Una vez realizados los cortes, se digitalizaron y se analizaron en un analizador de imágenes (Image-Pro Plus versión 4.1 para Windows). Para determinar los grados de lesiones presentados en cada tejido se utilizó la metodología descrita por Maldonado-Villavicencio (2003) (ver anexo I).

**6.7 Experimento 4.** Evaluación del efecto del silicio orgánico tanto por inmersión como por inclusión en la dieta en prevención de infecciones producidas con *V. harveyi*. Este experimento se realizó en el Laboratorio de Ecofisiología de Organismos Acuáticos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C. ubicado en La Paz, B.C.S., México.

**6.7.1 Obtención de los organismos y aclimatación.** Los camarones utilizados en el presente experimento fueron juveniles de *L. vannamei* (Boone, 1931) donados por Acuacultores de La Paz, S. A. (APSA), ubicada en la ciudad de La Paz, B.C.S. Éstos fueron aclimatados en el Laboratorio de Nutrición Experimental del CIBNOR, dentro de tanques de plástico con 1,500 L de capacidad a una temperatura de 27 °C y salinidad de 40 ppm. Los organismos se alimentaron dos veces al día a saciedad aparente con un alimento comercial conteniendo 35% de proteína, durante 10 días.

**6.7.2 Sistema de cultivo.** El sistema de cultivo utilizado para llevar a cabo el tratamiento de los organismos tanto por inmersión como por inclusión en el alimento, y con su posterior desafío con *V. harveyi*, consistió de 18 taras de plástico de 60 L de capacidad, equipadas con sistema de aireación y control de temperatura (calentadores sumergibles de 250W con precisión de  $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ ), iluminación artificial proporcionada por focos fluorescentes a nivel de cámara. El agua de mar filtrada fue filtrada a través de un filtro de arena de 20 $\mu\text{m}$ .

**6.7.3 Preparación del inóculo.** El inóculo fue preparado de acuerdo al método modificado de Saulnier *et al.* (2000a).

La cepa putativa de *Vibrio harveyi* de la colección de microorganismos del “Laboratorio de Ecología Microbiana Molecular” del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C. fue donada por el M.C. César Orozco. Esta fue reactivada, para lo cual fue necesario hacer una siembra en medio de cultivo Difco<sup>MR</sup> 2216, con su posterior incubación a 30°C durante 24 h. Después la cepa fue suspendida en Marine Broth DIFCO<sup>MR</sup> 2216 y se agitó durante 24h/30° C a 180 rpm en una agitador LAB LINE<sup>MR</sup> Mod. No. 4628CCGM. Posteriormente, se hacen tres lavados con agua de mar filtrada y esterilizada, en cada lavado la muestra se centrifugó a 4,000 rpm durante 20 min a temperatura ambiente. Después se hicieron diluciones seriadas, empezando por 10<sup>9</sup> hasta 10<sup>1</sup>, luego se determinó la absorbancia en un colorímetro LINSON<sup>MR</sup> 3 con filtro amarillo, donde el valor 1 de transmitancia corresponde a una concentración de 10<sup>9</sup> UFC/mL<sup>-1</sup>.

#### **6.7.4 Dosis subletal (DSL) en *L. vannamei*.**

Después de 10 días de aclimatación, los juveniles de *L. vannamei* se pesaron individualmente y se seleccionaron 150 organismos con un peso promedio de 10 ± 0.5 g. Se distribuyeron aleatoriamente en 18 acuarios a razón de 10 organismos por acuario. Éstos fueron alimentados diariamente con un alimento comercial para camarón conteniendo 35 % de proteína. Se colocaron 5 organismos por tanque (triplicado), cinco diluciones y un blanco (15 tanques en total). Los alimentos fueron suministrados manualmente a razón del 5 % de la biomasa inicial a cada tanque, y la ración se ajustó diariamente en función del alimento consumido. Se determinó diariamente la temperatura, el oxígeno disuelto, el pH y la salinidad.



**Experimentos de inyección del extracto crudo.** Juveniles de *L. vannamei* de una talla promedio de  $10 \pm 0.5$  g fueron inoculados en el 3er segmento abdominal con una dosis de  $20\mu\text{L/g}$  de peso fresco (Takahashi *et al.*, 1994). Después de haber iniciado la infección, se procedió a registrar la muerte de los organismos para determinar la dosis subletal (DSL).

#### **6.7.5 Exposición de juveniles de *L. vannamei* al silicio orgánico por inmersión y en la dieta, y su posterior desafío con *V. harveyi*.**

**6.7.5.1 Sistema de cultivo.** El sistema de cultivo utilizado para llevar a cabo la exposición de los organismos al silicio orgánico tanto por inmersión como por inclusión en el alimento con su posterior desafío con *V. harveyi*, consistió de 18 taras de plástico de 60 L de capacidad. Cada una equipada con sistema de aireación y control de temperatura (calentadores sumergibles de 250W con precisión de  $\pm 0.5^\circ\text{C}$ ), iluminación artificial proporcionada por focos fluorescentes a nivel de cámara. El agua de mar filtrada fue filtrada con un filtro de arena de  $20\mu\text{m}$ .

La exposición se llevó a cabo con silicio orgánico: dos tratamientos por inmersión: (1 y 10 mg/L por 72 h) y uno por inclusión en el alimento (50mg/Kg por 48 h), un control, un control positivo (con bacteria) y negativos (agua de mar filtrada y esterilizada); tres réplicas por tratamiento.

#### **6.7.6 Infección con *V. harveyi*.**

Después que los organismos fueron tratados con silicio orgánico, se procedió a realizar la infección de los mismos con *V. harveyi*, para lo cual se utilizó la dilución de  $1 \times 10^6$  UFC/mL.

Una vez iniciada la infección se registró el porcentaje de supervivencia de organismos por tratamiento. Se tomaron muestras de hemolinfa de organismos que sobrevivieron a las 24, 72 y 120 h, a la infección con *V. harveyi*, para evaluar los parámetros inmunológicos indicados se siguió la metodología descrita en la sección 6.4.

Para el procesamiento de los resultados se usaron los análisis estadísticos referidos en la sección 6.4.9.

#### **6.7.7 Análisis histológicos.**

Los cortes histológicos se realizaron en organismos que sobrevivieron a la infección de *V. harveyi*, después de 10 días post infección; éstos fueron fijados en una solución de Davidson. El método utilizado fue el de inclusión en parafina, y tinción con hematoxilina-eosina (Sheehan y Hrapchak 1973; Humason, 1979;). Una vez realizados los cortes se analizaron mediante microscopía óptica (Junqueira, 1988). Para determinar los grados de lesiones presentados en cada tejido se utilizó la metodología descrita por Maldonado-Villavicencio, (2003) (ver anexo I).

## 7. RESULTADOS.

**7.1 Efecto del silicio orgánico aplicado por inmersión o inclusión en la dieta sobre la respuesta inmune en juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*).**

### 7.1.1 Conteo Total de Hemocitos Circulantes.

Después de las 6 y 24 h de aplicados los tratamientos vía inmersión, el conteo total de hemocitos disminuyó significativamente ( $P<0.05$ ) en los tratamientos respecto al control, mientras que a las 48 h después de aplicados los tratamientos, el conteo total de hemocitos se incrementó significativamente ( $P<0.05$ ) en el tratamiento de 1 mg/L respecto al grupo control (Fig. 2A).

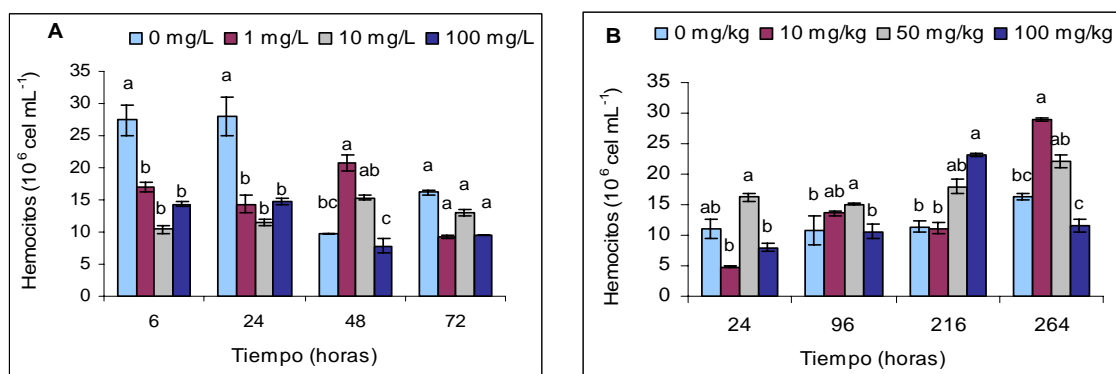


Fig. 2 Conteo Total de Hemocitos Circulantes de camarones expuestos a silicio orgánico por inmersión (A); así como alimentados con dietas suplementadas con silicio orgánico (B). Letras diferentes muestran diferencia significativa ( $P<0.05$ ).

Cuando el silicio orgánico fue incluido en la dieta, a las 24 h posterior a la aplicación de los tratamientos, se observó una disminución significativa ( $P<0.05$ ) del número de hemocitos en los tratamientos de 1 y 100 mg/kg silicio orgánico con respecto al grupo control. Sin embargo, a las 96 y 264 h posterior a la aplicación de los tratamientos, el número de hemocitos aumentó significativamente ( $P<0.05$ ) en el tratamiento con 1 mg/kg silicio orgánico con respecto al control, mientras que a las 96, 216 y 264 h dicho aumento se observó en el tratamiento de 10 mg/kg silicio orgánico con respecto al

control, y a las 216 h día posterior a la aplicación de los tratamientos, se observó un incremento significativo ( $P<0.05$ ) del CTH en el tratamiento de 100mg/kg silicio orgánico con respecto al grupo control (Fig. 2B).

### 7.1.2 Generación de radicales libres ( $O_2^-$ ) en hemocitos.

La producción de anión superóxido en hemocitos no presentó un patrón que indique la influencia del silicio orgánico sobre este parámetro cuando el silicio fue aplicado vía inmersión (Fig. 3A). Cuando el silicio orgánico fue incluido en el alimento, la producción de anión superóxido disminuyó significativamente ( $P<0.05$ ) en el tratamiento de 10 mg/kg silicio orgánico con respecto al grupo control, a las 24, 96 y 264 h posterior a la aplicación del silicio orgánico, mientras que la producción de  $O_2^-$  en el tratamiento de 100 mg/kg silicio orgánico disminuyó significativamente ( $P<0.05$ ) con respecto al control, a las 216 h posterior a la aplicación del silicio orgánico (Fig. 3B).

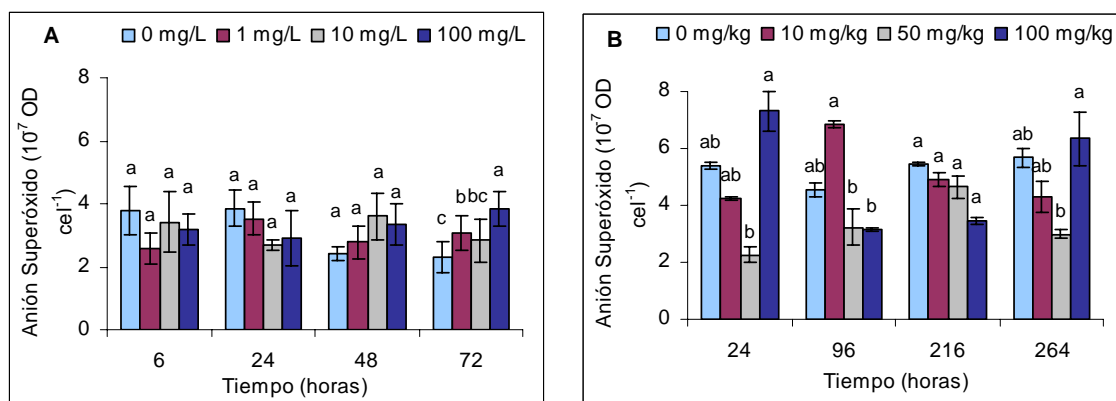


Fig. 3 Producción de  $O_2^-$  en hemocitos en camarones expuestos a silicio orgánico por inmersión (A); así como en alimentados con dietas suplementadas con silicio orgánico (B). Letras diferentes muestran diferencia significativa ( $P<0.05$ ).

### 7.1.3 Actividad superóxido dismutasa en hemocitos.

La actividad enzimática de la SOD en hemocitos disminuyó significativamente ( $P<0.05$ ) en los tratamientos de 10 y 100 mg/L con respecto al control a las 6 h después de la aplicación del silicio orgánico vía inmersión. No obstante, los valores de la actividad SOD del tratamiento de 1 mg/L silicio orgánico fueron similares a los del grupo control (Fig. 4).

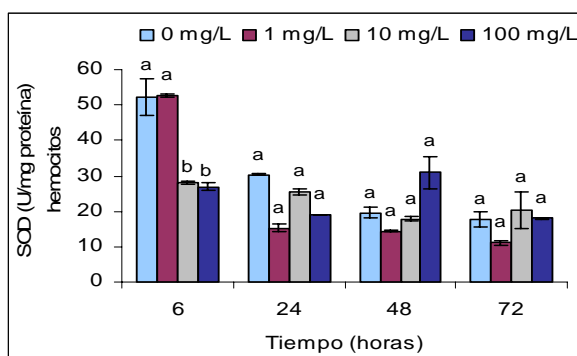


Fig. 4 Actividad enzimática de SOD en hemocitos de camarones expuestos a silicio orgánico por inmersión. Letras diferentes muestran diferencia significativa ( $P<0.05$ ).

### 7.1.4 Actividad superóxido dismutasa músculo y hepatopáncreas.

La actividad SOD en músculo disminuyó significativamente ( $P<0.05$ ) en el tratamiento con 1 mg/L silicio orgánico a las 6, 24 y 72 h posterior a la aplicación del silicio orgánico vía inmersión con respecto al control, mientras que en los tratamientos con 10 y 100 mg/L silicio orgánico se observó una disminución significativa ( $P<0.05$ ) a las 24 y 48 h posterior a la aplicación del silicio orgánico con respecto al control (Fig. 5A). La actividad de SOD en hepatopáncreas disminuyó significativamente ( $P<0.05$ ) a las 24 h posteriores a la aplicación del silicio orgánico en todos los tratamientos con respecto al grupo control, mientras que a las 48 h esta actividad disminuyó significativamente ( $P<0.05$ ) en los tratamientos con 1 y 100 mg/L silicio orgánico respecto al control (Fig. 5B). Cuando el silicio orgánico fue incluido en la dieta, la SOD en músculo disminuyó

significativamente ( $P < 0.05$ ) a las 24 h posterior a la aplicación del silicio orgánico en el tratamiento de 10 mg/kg silicio orgánico, con respecto al control. Sin embargo, a las 216 h después de la aplicación del silicio orgánico, la actividad de la SOD incrementó significativamente ( $P < 0.05$ ) en el tratamiento con 10 mg/kg silicio orgánico con respecto al control (Fig. 5C). La actividad de la SOD en hepatopáncreas disminuyó significativamente ( $P < 0.05$ ) a las 96 h posterior a la aplicación del silicio orgánico en todos los tratamientos, mientras que a las 216 h posterior a la aplicación del silicio orgánico se observó una disminución significativa ( $P < 0.05$ ) de la SOD en los tratamientos de 10 y 100 mg/kg silicio orgánico con respecto al control, y a las 216 h, se observó que la actividad SOD disminuyó significativamente ( $P < 0.05$ ) en el tratamiento con 10 mg/kg silicio orgánico con respecto al grupo control (Fig. 5D).

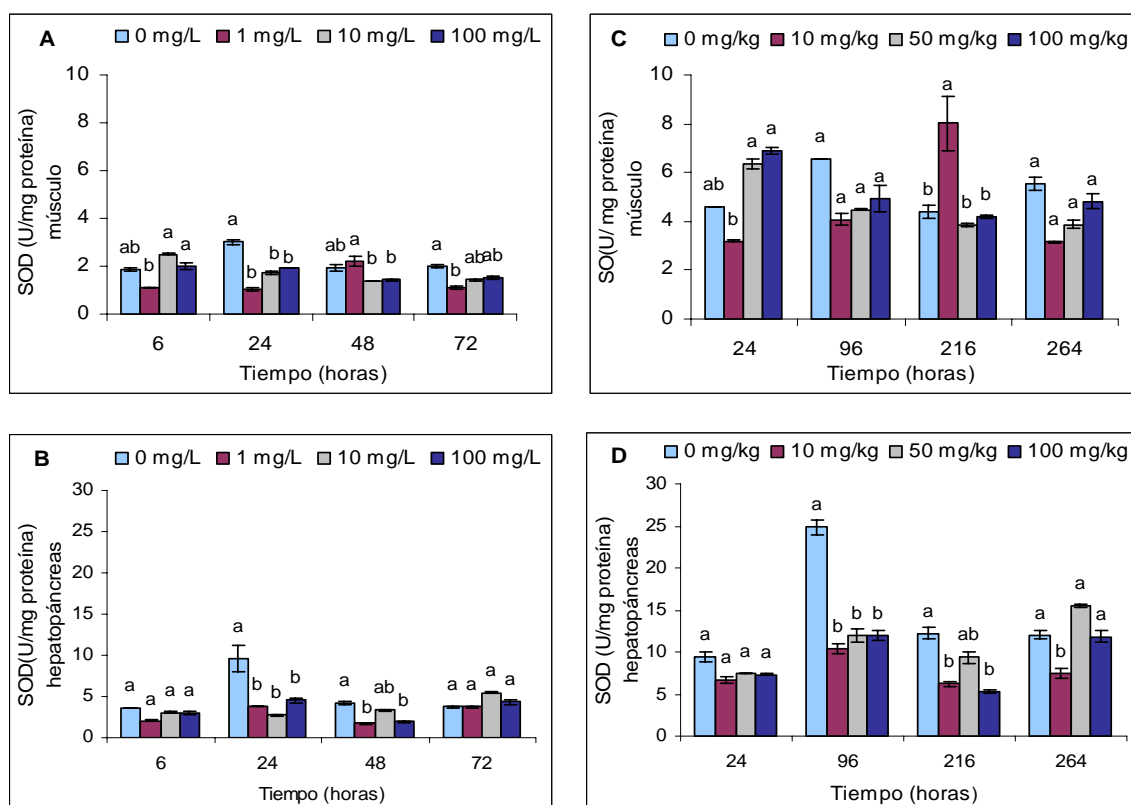


Fig. 5. Actividad de SOD de camarones expuestos a silicio orgánico por inmersión, en músculo (A) y en hepatopáncreas (B); así como alimentados con dietas suplementadas con silicio orgánico, en músculo (C) y en hepatopáncreas (D). Letras diferentes muestran diferencia significativa ( $P < 0.05$ ).

### 7.1.5 Actividad catalasa en músculo y hepatopáncreas.

La actividad CAT en músculo disminuyó significativamente ( $P<0.05$ ) en el tratamiento con 10 mg/L silicio orgánico a las 6 h posteriores a la aplicación del tratamiento vía inmersión, mientras que esta actividad aumentó significativamente ( $P<0.05$ ) en el tratamiento con 1 mg/L silicio orgánico a las 24 h y el tratamiento con 10 mg/L silicio orgánico a las 72 h posterior a la aplicación del silicio orgánico (Fig. 6A). En hepatopáncreas, se observó una disminución significativa ( $P<0.05$ ) de la actividad CAT en el tratamiento con 10 mg/L silicio orgánico a las 48 h y con 100 mg/L silicio orgánico a las 6 y 48 h posterior a la aplicación del silicio orgánico (Fig. 6B). Cuando el silicio orgánico fue incluido en la dieta, la actividad CAT en músculo disminuyó significativamente ( $P<0.05$ ) a las 24 y 216 h posteriores a la aplicación del silicio orgánico en el tratamiento con 100 mg/kg silicio orgánico con respecto al control, un comportamiento similar se observó a las 216 h posterior a la aplicación del silicio orgánico, en los tratamientos con 10 y 50 mg/kg silicio orgánico, mientras que a las 96 y 264 h posterior a la aplicación del silicio orgánico, la actividad CAT se incrementó significativamente ( $P<0.05$ ) en el tratamiento con 10 mg/kg silicio orgánico observándose un efecto similar en el tratamiento con 50 mg/kg silicio orgánico a las 264 h después de la aplicación del silicio orgánico (Fig. 6C). En hepatopáncreas, se observó una disminución significativa ( $P<0.05$ ) de la actividad CAT, a las 24 y 96 h después de la aplicación del silicio orgánico en el tratamiento con 10 mg/kg silicio orgánico con respecto al control, sin embargo, a las 264 h dicha actividad aumentó significativamente ( $P<0.05$ ). Por otra parte, se observó que en el tratamiento con 100 mg/kg silicio orgánico, la actividad CAT disminuyó significativamente ( $P<0.05$ ) a las

24, 96 y 264 h posteriores a la aplicación del silicio orgánico con respecto al control (Fig. 6D).

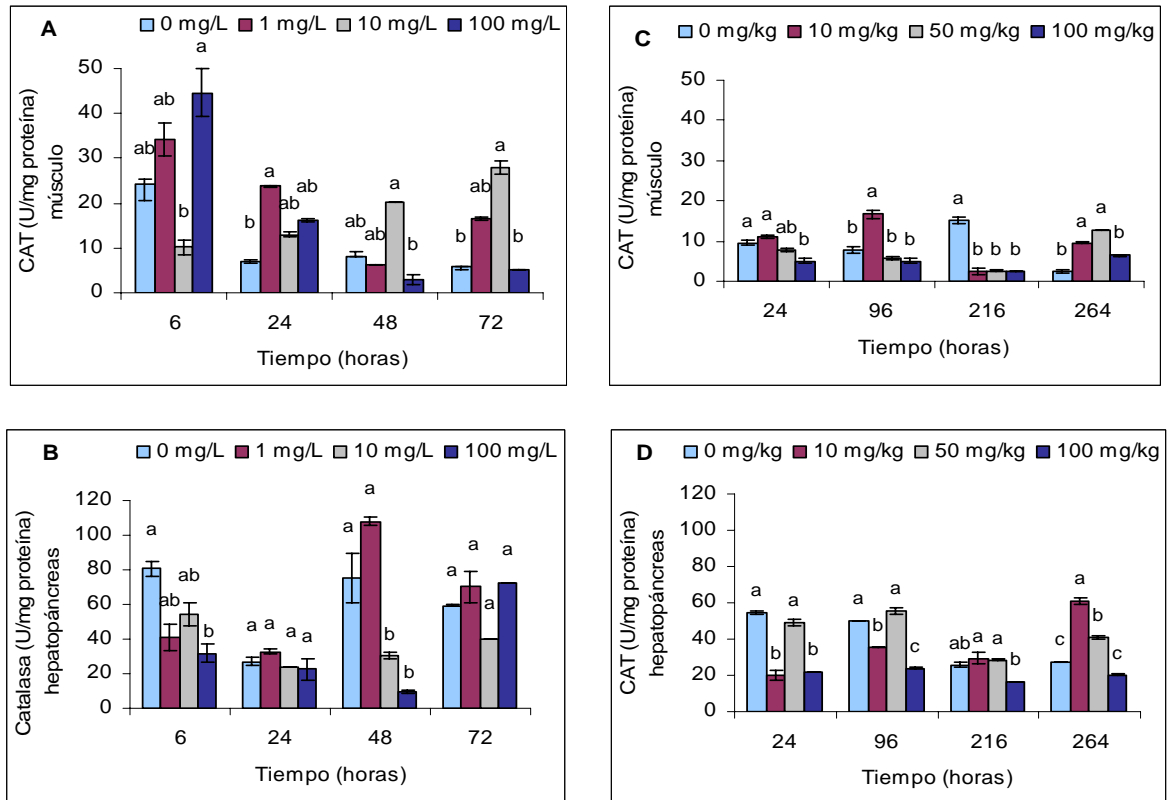


Fig. 6 Actividad CAT de camarones expuestos a silicio orgánico por inmersión, CAT en músculo (A) y CAT en hepatopáncreas (B); así como alimentados con dietas suplementadas con silicio orgánico, CAT en músculo (C) y CAT en hepatopáncreas (D). Letras diferentes muestran diferencia significativa ( $P < 0.05$ ).



## **7.2 Efectos de silicio orgánico en la prevención de la infección del Virus del Síndrome de la Mancha Blanca (WSSV).**

Para evaluar los efectos del silicio orgánico ante una infección con WSSV en *L. vannamei*, los organismos fueron expuestos a diferentes concentraciones de silicio orgánico por inmersión y posteriormente expuestos al virus para después determinar los siguientes parámetros: CTH, tiempo de coagulación y aspecto físico de la hemolinfa, porcentaje de supervivencia y daño histopatológico.

### **7.2.1 Dosis Letal Media (DL<sub>50</sub>) del WSSV.**

La DL<sub>50</sub> se obtuvo al inyectar en el 3er segmento abdominal los camarones varias diluciones del extracto crudo de WSSV, durante 168 h. La dilución que se eligió fue la que presentó una mortalidad del 50 % al segundo día post-infección (Fig. 7).

Se inyectaron 20 µL/g de peso de los organismos, utilizando diferentes diluciones (1:1, 1:10, 1:100 y 1:1000) del extracto crudo del virus, utilizando como blanco agua de mar filtrada estéril (no se observaron efectos adversos al inyectar esta solución como blanco).

La Fig. 7 muestra que en el transcurso de la infección, se observó mayor susceptibilidad de los juveniles *L. vannamei* a la infección con WSSV utilizando la dilución de 1:1 y 1:10, donde la LD<sub>50</sub> de la primer dilución se presentó a las 36 h y la segunda a las 24 h post-infección, mientras que en la dilución 1:100 se presentó a las 48 h post-infección, observándose además un 100% de mortalidad al final del experimento con esta dilución.

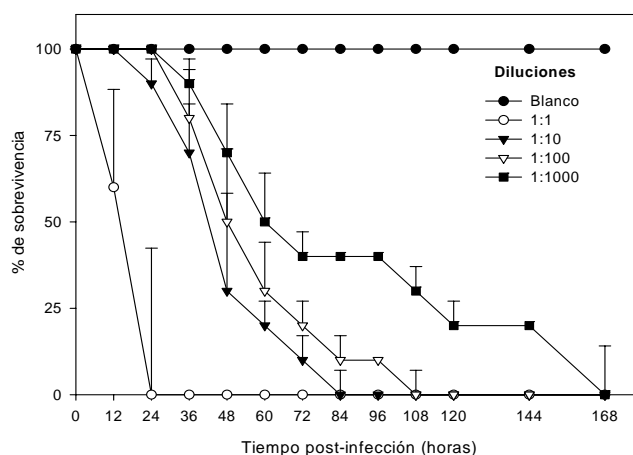


Fig. 7. Dosis Letal Media ( $LD_{50}$ ) de organismos *L. vannamei* inyectados con diferentes diluciones de WSSV.

### 7.2.2 Porcentaje de supervivencia de *L. vannamei*.

La fig. 8 muestra el porcentaje de supervivencia de *L. vannamei* después de haber sido expuesto a diferentes concentraciones de silicio orgánico por inmersión y desafiados con el virus de la mancha blanca.

En el transcurso de las primeras 42 horas post-infección, los organismos tanto de los tratamientos como del control (+) presentaron los signos clínicos típicos del WSSV, siendo los principales síntomas aletargamiento, nado errático, anorexia, opacidad muscular, aumento en la frecuencia de muda y coloración rojiza en todo el cuerpo, especialmente: pleópodos, pereiópodos, urópodos y telson por expansión de los cromatóforos. También en este período aparecieron las primeras mortalidades, siendo los organismos expuestos a 1 y 10 mg/L silicio orgánico los que mostraron inicialmente ser más susceptibles al virus, siguiendo el control (+) a las 55 h y por último los de 100 mg/L a las 66 h. Sin embargo, los organismos que no sobrevivieron al final del experimento fueron los del tratamiento con 100 mg/L, mientras que el de 10 mg/L silicio orgánico y el control (+) presentaron 25% de supervivencia, el de 1 mg/L silicio



### 7.2.3 Conteo Total de hemocitos circulantes.

El conteo total de hemocitos circulantes a lo largo del experimento de organismos que estaban en fase terminal, disminuyeron significativamente ( $P < 0.05$ ) en los tratamientos con silicio orgánico con respecto al control (+) y el blanco, observándose un patrón similar entre el control (+) y el blanco. Sin embargo, no hubo diferencias significativas entre tratamientos (Fig. 9).

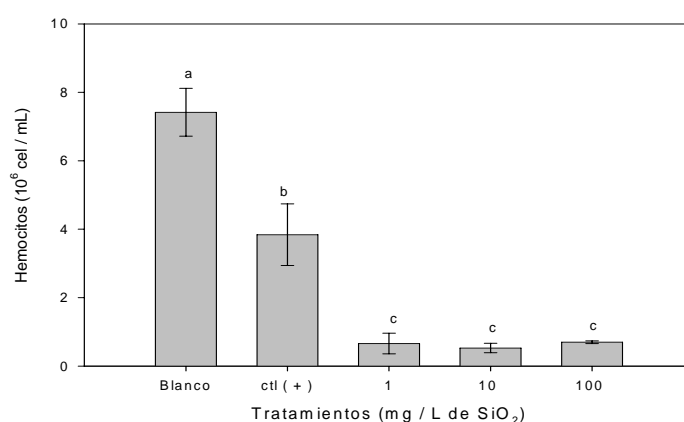


Fig. 9. Conteo Total de Hemocitos Circulantes en organismos desafiados con WSSV.

### 7.2.4 Tiempo de coagulación y parámetros físicos de hemolinfa.

Los valores de T.C. en hemolinfa de organismos infectados con WSSV, fueron superiores a los rangos normales establecidos en hemolinfa de crustáceos, en los tratamientos con 10 y 100 mg/L silicio orgánico. Sin embargo, los T.C. del blanco y el tratamiento de 1 mg/L silicio orgánico se mantuvieron dentro de los rangos normales. Con lo que respecta a la coloración de la hemolinfa, se observó que los organismos que presentaron una afección más aguda mostraron el color típico rosado, siendo éstos los expuestos a 10 y 100 mg/L silicio orgánico comparados con el control (+) y el blanco, donde el color de la hemolinfa se observó entre azul verdoso y azul claro (Tabla IV).

TABLA V. Valores de tiempo de coagulación, coloración de hemolinfa y características de los hemocitos de organismos expuestos a diferentes concentraciones de silicio orgánico, después de haber sido retados con WSSV.

Tratamiento	Post-infección (h)	Aspecto hemocitos	Aspecto hemolinfa	Tiempo de coagulación (seg.)
Control (-)	66 y 126	Normales	Azul verdoso	18
Control (+)	54, 60 y 66	Normales	Azul verdoso	>90
1 mg/L CH <sub>3</sub> Si(OH) <sub>3</sub>	96 y 102	Núcleos picnóticos	Rosada	10
10 mg/L CH <sub>3</sub> Si(OH) <sub>3</sub>	42, 48 y 90	Núcleos picnóticos	Rosada	>90
100 mg/L CH <sub>3</sub> Si(OH) <sub>3</sub>	60, 66, 78 y 84	Núcleos picnóticos	Rosada	>90

### 7.2.5 Diagnóstico confirmativo de infección por WSSV.

Por medio de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), se observó el fragmento de 296 pb del genoma viral correspondiente al WSSV, con lo cual se revela y confirma la presencia de infección aguda en organismos juveniles de *L. vannamei* después del proceso post-infección en los diferentes tratamientos y el control (+). La presencia del WSSV en el control (+) se confirmó a las 54 y 60 h; en el tratamiento con 1 mg/L silicio orgánico a las 96 y 102 h; con 10 mg/L silicio orgánico a las 42 y 48 h y con 100 mg/L silicio orgánico a las 60 y 66 h post-infección. Por otra parte, se confirmó la ausencia del virus en el blanco (Fig. 10).

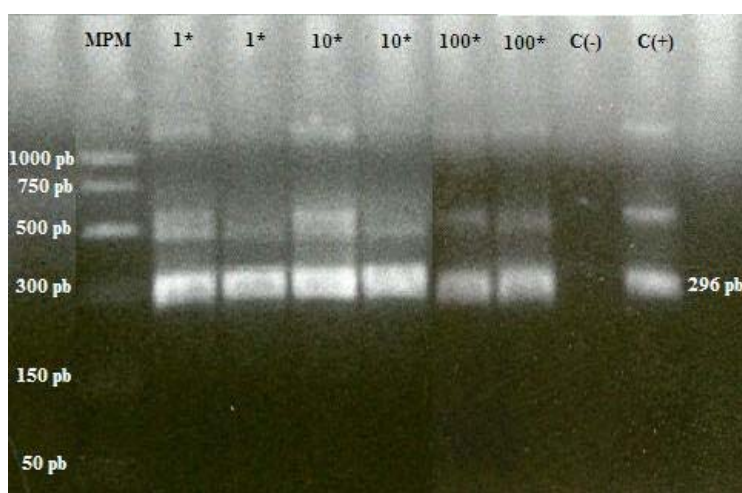


Fig. 10. Electroforesis sobre el gel de agarosa al 2%, de los productos de PCR para el diagnóstico confirmativo de WSSV. La banda de 296 pb indica la presencia del WSSV, \* silicio orgánico mg/L.

### **7.2.6 Daños histológicos.**

Las características histopatológicas de la fase aguda del WSSV en animales moribundos de los tratamientos y el control (+), presentaron dos patologías (ver tabla III), siendo una de estas la hipertrofia nuclear caracterizadas por cuerpos de inclusión eosinófilos (Cowdry A) y cuerpos de inclusión citoplasmáticos intranucleares basofílicos de origen ectodérmico y mesodérmico, que se pueden considerar patognomónicos del síndrome de la macha blanca y una necrosis difusa caracterizada por la presencia de núcleos picnóticos, cariorrexis y cariólisis. Diversos tejidos presentaron estas dos patologías, principalmente el epitelio cuticular, órgano linfoide (O.L.), tejido hematopoyético, branquias, glándula antenal, ceca, corazón y hepatopáncreas (Figs. 11-17).

#### **a) Cuerpos de inclusión.**

Esta lesión se presentó de manera generalizada en todos los tratamientos inoculados con el virus incluyendo el control positivo (+). Aún así, la diferencia fue que la presencia de los cuerpos de inclusión se detectó en tejidos de importancia como: tejido hematopoyético, tejido nervioso, epitelio cuticular, branquias, glándula antenal, órgano linfoide (O.L.), utilizando el tratamiento con 1 mg/L silicio orgánico y en el control (+). Sin embargo, esta lesión se detectó en pocos tejidos y órganos de organismos expuestos a 10 y 100 mg/L de silicio orgánico (Tabla VI).

Por otra parte, se mostró una gran diferencia en el grado de lesión de cada tejido y órgano dependiendo del tratamiento, siendo el epitelio cuticular el tejido que resultó más afectado en todos los tratamientos y en el control (+), presentando un grado de lesión G4 en 1 mg/L silicio orgánico, G3 en de 10 mg/L silicio orgánico y el control

(+), mientras que en el 100 mg/L silicio orgánico presentó un grado G2. El tejido hematopoyético, presentó un grado de lesión grado G4 en el control (+) y 1 mg/L silicio orgánico y G3 en 100 mg/L silicio orgánico. El tejido nervioso solamente presenta lesión cuando se utilizó 1 mg/L silicio orgánico siendo esta de grado G4. Mientras que la glándula antenal presentó un grado G3 en 1 mg/L silicio orgánico, G2 en 10 mg/L y G1 en el control (+). Las branquias presentaron un grado de lesión G2 en todos los tratamientos y el control (+) (Tabla VI).

#### **b) Necrosis difusa.**

Esta patología es el conjunto de alteraciones morfológicas principalmente de cambios intracelulares como picnosis (condensación del núcleo), cariólisis (disolución de la cromatina) y cariorrexis (fragmentación de la cromatina), esta patología estuvo presente en todos los tratamientos y control (+), siendo el tratamiento con 100 mg/L silicio orgánico donde se observaron las lesiones más graves, tanto en tejido hematopoyético, nervioso, epitelio cuticular y el corazón presentando un grado G3, un grado G2 en branquias, caeca y hepatopáncreas, y un grado G1 en glándula antenal. Mientras que el tratamiento con 10 mg/L silicio orgánico presentó un grado G3 en branquias, un grado G2 en tejido nervioso y glándula antenal, y un grado G1 en epitelio cuticular. En el tratamiento con 1 mg/L silicio orgánico se observó un grado G2 en branquias, tejido nervioso y tejido hematopoyético, y un G1 en epitelio cuticular. El control (+) solamente presentó un grado G2 en branquias (Tabla VI).

**Tabla VI.** Distribución y grado de daño histopatológico en *Litopenaeus vannamei* expuestos a tratamientos con silicio orgánico por inmersión 1, 10 y 100 mg/L con su posterior infección con WSSV Tratamientos (mg/L silicio orgánico)\*; G0, ---; G1, +; G2, ++; G3, +++; G4, ++++.

Órgano/Tejido	Daños histopatológicos									
	Cuerpos de inclusión					Picosis y cariorexis				
	Blanco	Control (+)	1*	10*	100*	Blanco	Control (+)	1*	10*	100*
Branquias	---	++	+	++	+	---	++	+	++	++
Epitelio cuticular	---	++++	++++	++	++	---	---	+	+++	+++
Glándula antenal	---	+	++	+	---	---	---	---	+	+
Tejido nervioso	---	---	---	+++	---	---	---	+++	++	+++
Órgano linfoide	---	++++	++	---	---	---	---	---	---	+++
Tejido hematopoyético	---	++	++++	---	++	---	---	++	---	+++
Corazón	---	---	---	---	---	---	---	---	---	++
Hepatopáncreas	---	---	---	---	---	---	---	---	---	++
Ceca	---	+	---	---	+	---	---	---	---	++



Las lesiones características del WSSV se pueden observar en los tejidos y órganos analizados histológicamente (Fig. 11-17). Los cuerpos de inclusión presentan diferentes morfologías y tonos de coloración con tinción de hematoxilina de Harris- eosina Floxin durante el desarrollo de la enfermedad.

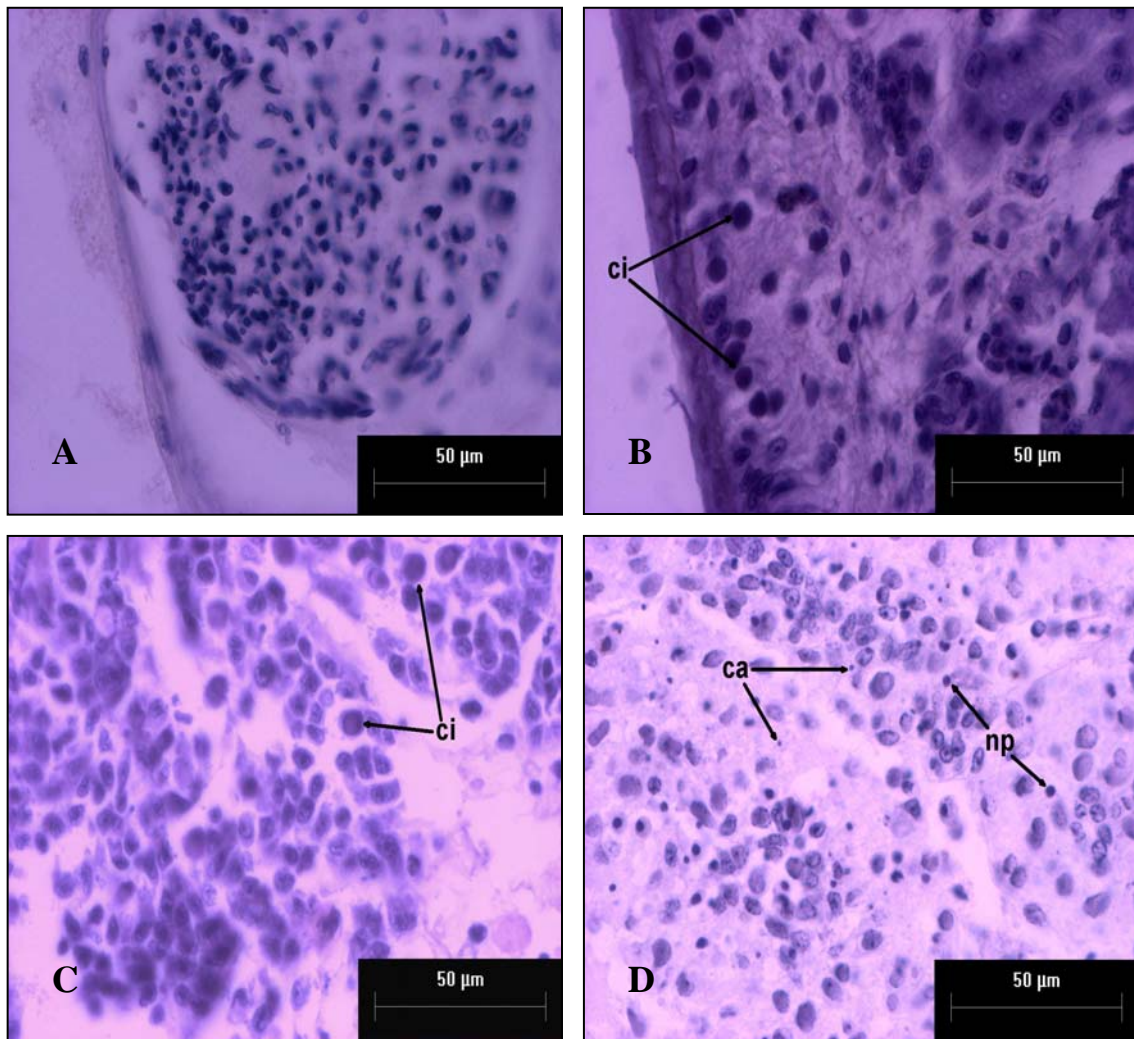


Fig. 11. Sección histológica del órgano linfoide de juveniles de *L. vannamei*, infectados experimentalmente con WSSV. Organismos: (A) blanco no se observa anomalía alguna en sus células; (B) control (+) obsérvese C.I.; (C) con 1 mg/L silicio orgánico nótese C. I. y (D) con 100 mg/L silicio orgánico se observa cariorrexis (ca) y núcleos picnóticos (np). Aumento 40X. Tinción hematoxilina-eosina (H&E).

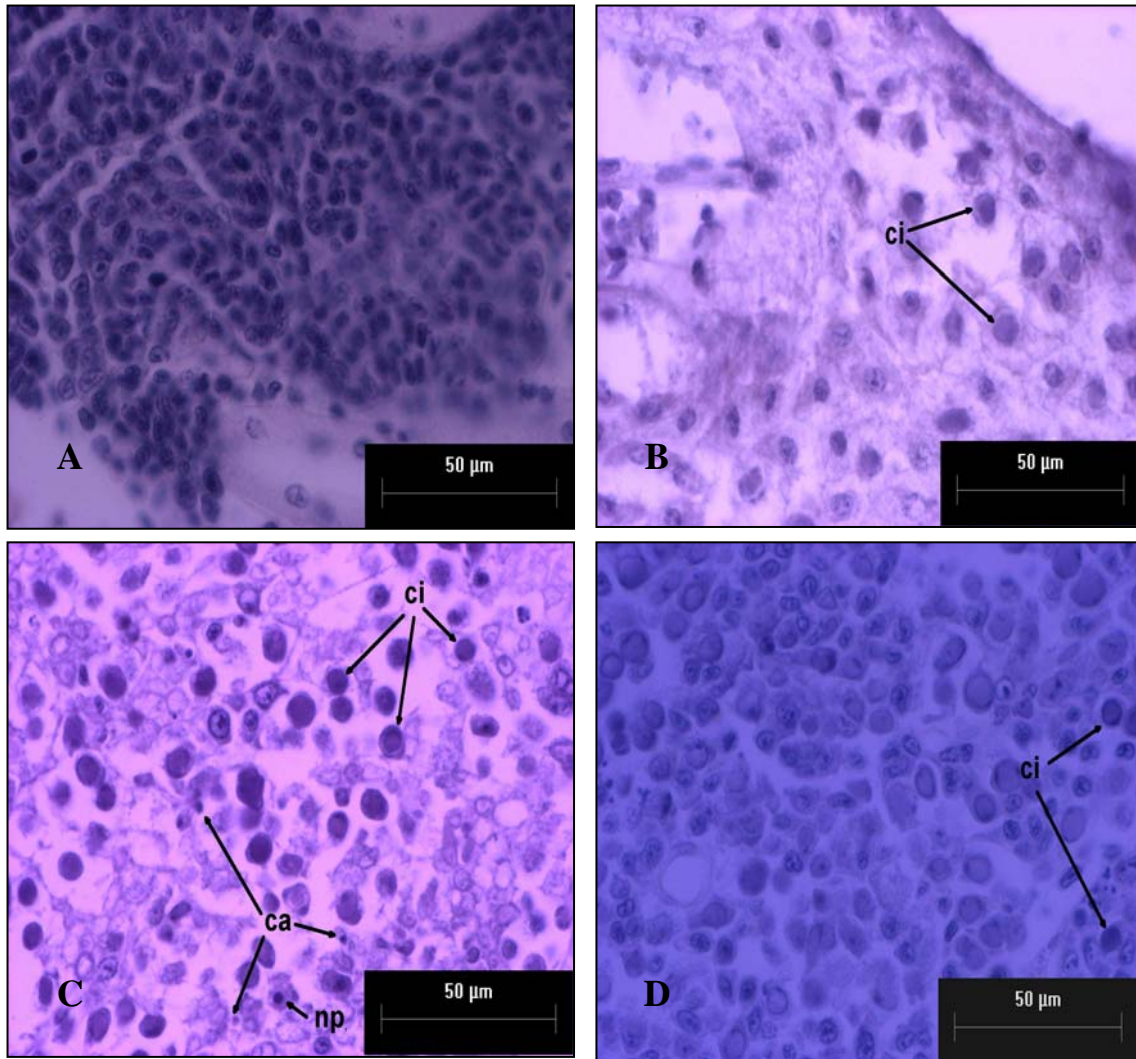


Fig. 12. Lesiones características de WSSV en tejido hematopoyético de juveniles de *L. vannamei*, infectados experimentalmente con WSSV. Organismos: (A) blanco no se observa anomalía alguna en sus células; (B) control (+) obsérvese C.I.; (C) con 1 mg/L silicio orgánico nótese C. I., cariorexis y núcleos picnóticos y (D) con 100 mg/L silicio orgánico se observa C.I. Aumento 40X. Tinción hematoxilina-eosina (H&E).

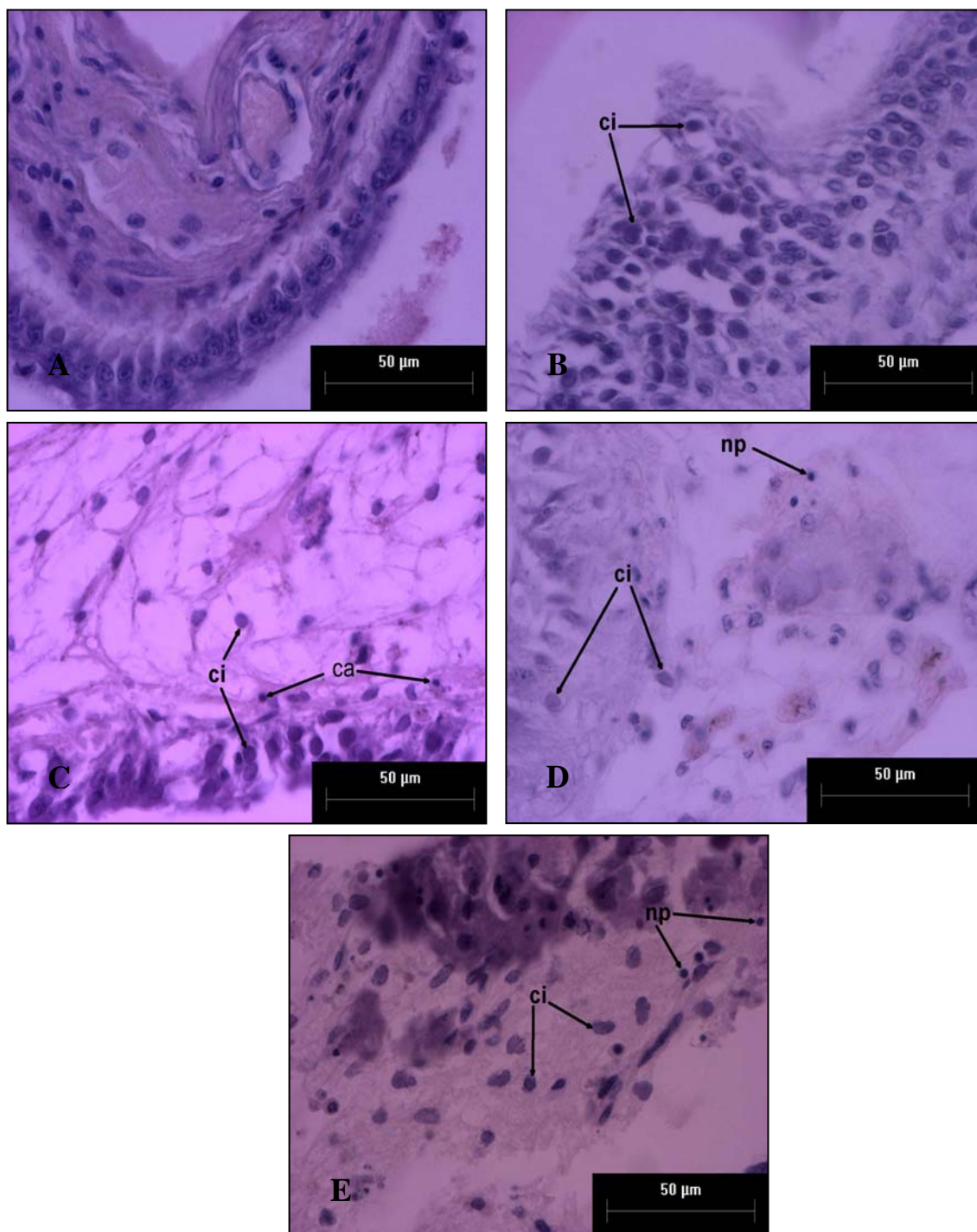


Fig. 13. Corte longitudinal de una sección de epitelio cuticular de juveniles de *L. vannamei* infectados experimentalmente con WSSV. Organismos: (A) blanco no se observa anomalía alguna en sus células; (B) control (+) obsérvese C.I.; (C) con 1 mg/L silicio orgánico nótese C. I. y núcleos picnóticos (np), y (D) con 10 mg/L silicio orgánico se observa C.I. y núcleos picnóticos (np); (E) con 100 mg/L silicio orgánico se observa C.I. y núcleos picnóticos (np). Aumento 40X. Tinción hematoxilina-eosina (H&E).



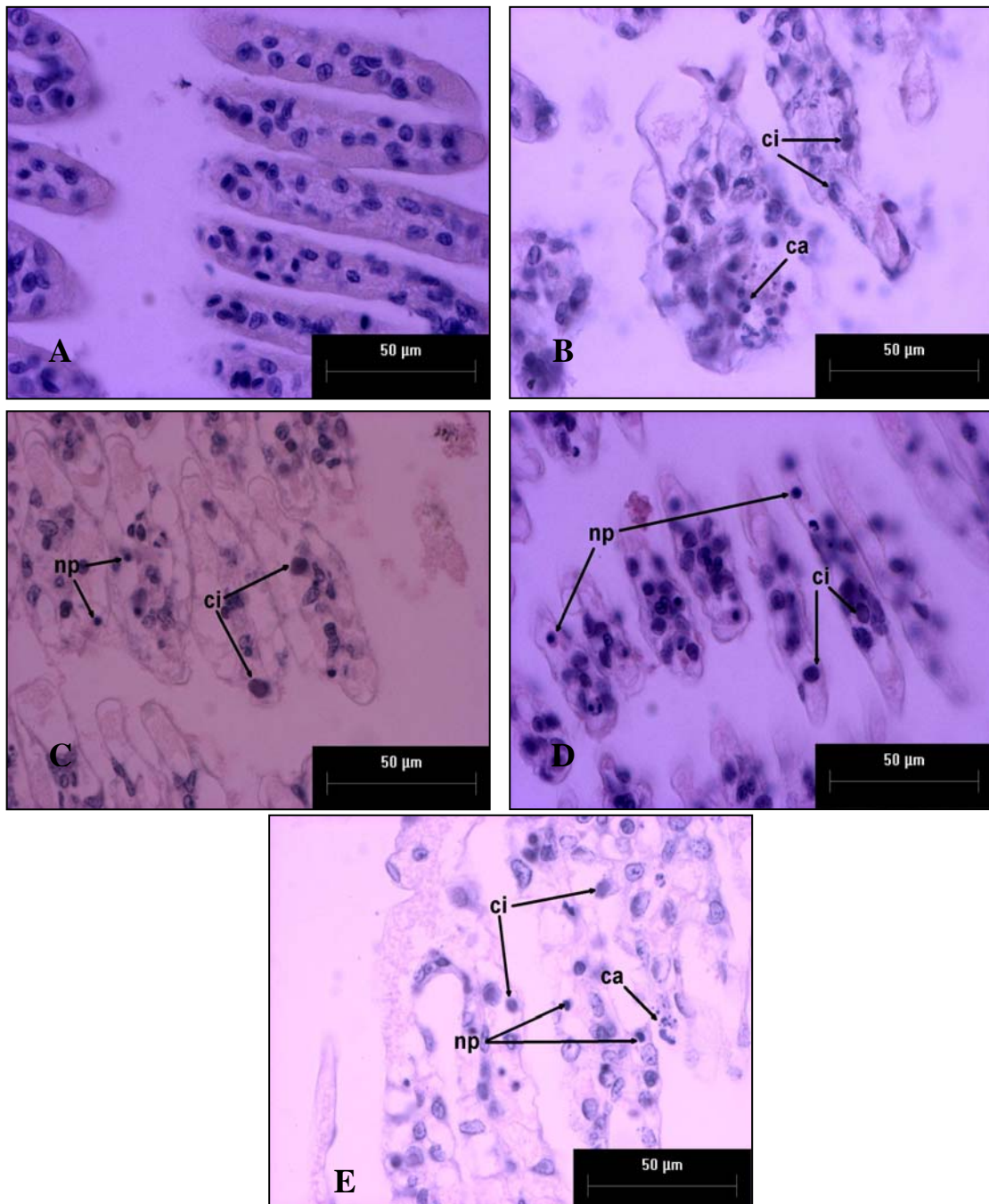


Fig. 14. Sección longitudinal de branquias de juveniles de *L. vannamei* infectados experimentalmente con WSSV. Organismos: (A) blanco no se observa anomalía alguna en sus células; (B) control (+) obsérvese C.I. y cariorrexis (ca); (C) con 1 mg/L silicio orgánico nótese C. I. y núcleos picnóticos (np) y (D) con 10 mg/L silicio orgánico se observa C.I. y núcleos picnóticos (np); (E) con 100 mg/L silicio orgánico se observa C.I., cariorrexis (ca) y núcleos picnóticos (np). Aumento 40X. Tinción hematoxilina-eosina (H&E).

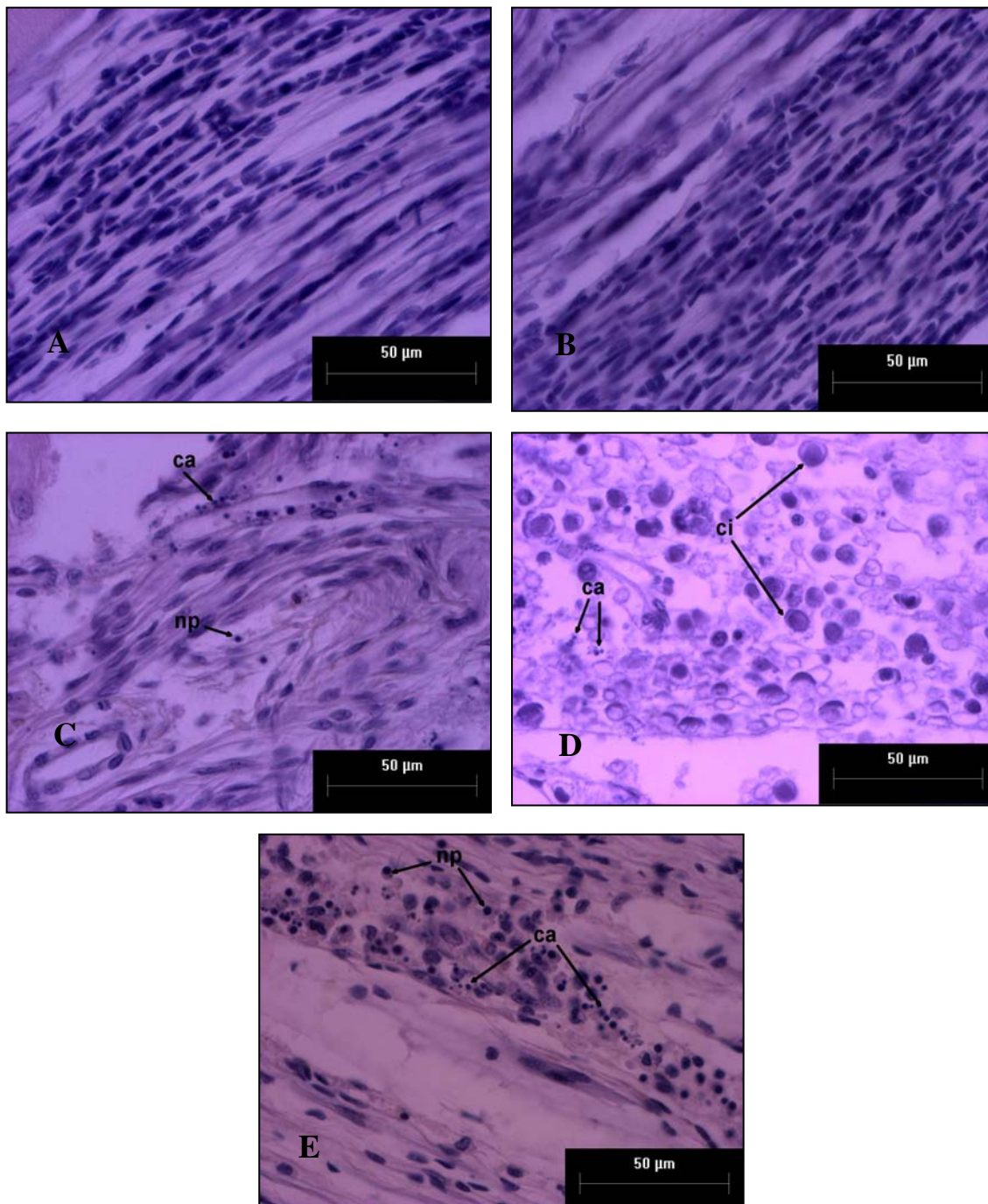


Fig. 15. Sección histológica del tejido nervioso de juveniles de *L. vannamei* infectados experimentalmente con WSSV. Organismos: (A) blanco y (B) control (+) no se observa anomalía alguna en sus células; (C) con 1 mg/L silicio orgánico nótese C. I., cariorrexis (ca) y núcleos picnóticos (np) y (D) con 10 mg/L silicio orgánico se observa cariorrexis (ca) y núcleos picnóticos (np); (E) con 100 mg/L silicio orgánico se observa cariorrexis (ca) y núcleos picnóticos (np). Aumento 40X. Tinción hematoxilina-eosina (H&E).

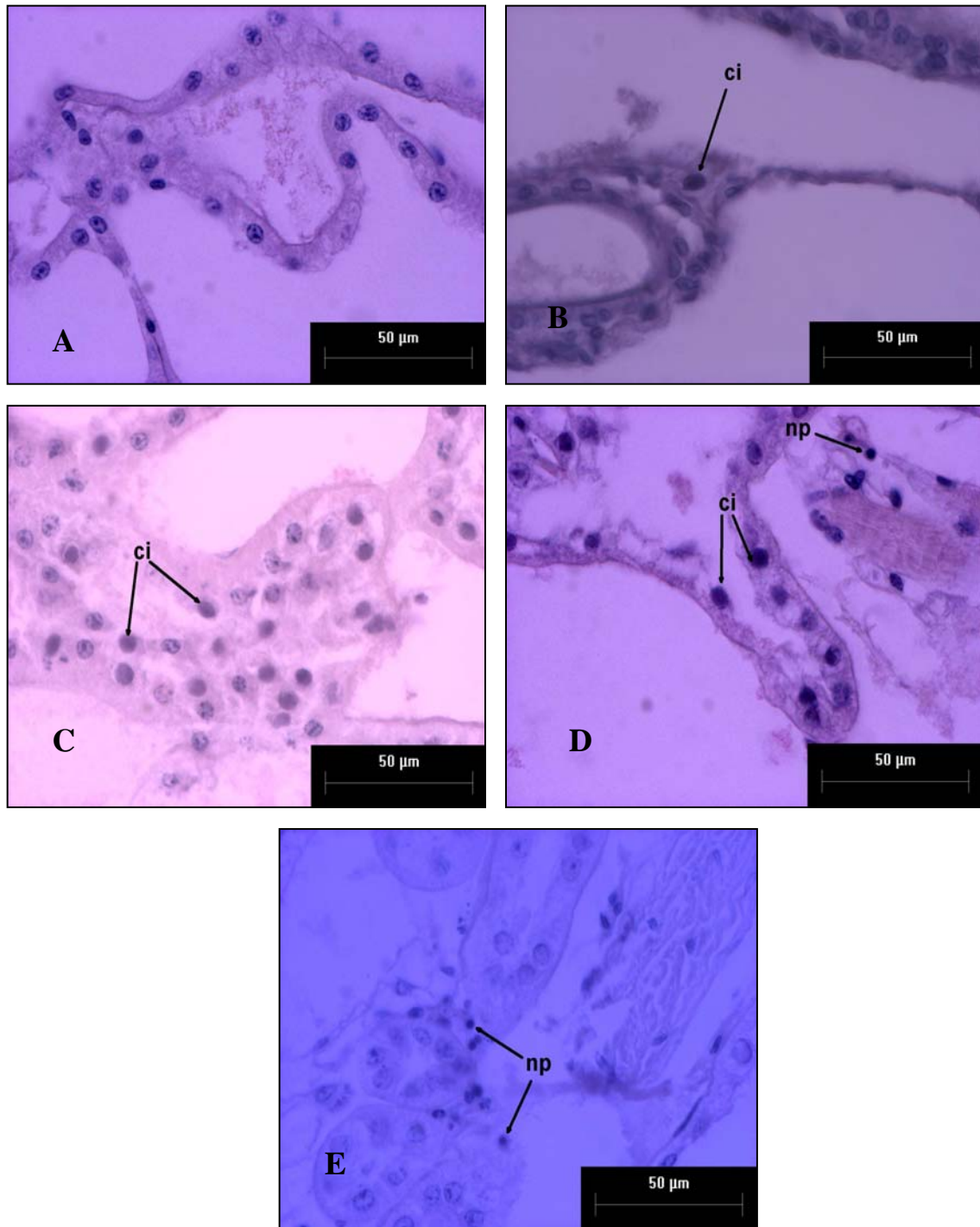


Fig. 16. Sección histológica de glándula antenal de juveniles de *L. vannamei* infectados experimentalmente con WSSV. Organismos: (A) blanco, no se observa anomalía alguna en sus células; (B) control (+) obsérvese C.I.; (C) con 1 mg/L silicio orgánico nótese C. I.; (D) con 10 mg/L silicio orgánico se observa C.I. y núcleos picnóticos (np); (E) con 100 mg/L silicio orgánico se observa núcleos picnóticos (np). Aumento 40X. Tinción hematoxilina-eosina (H&E).



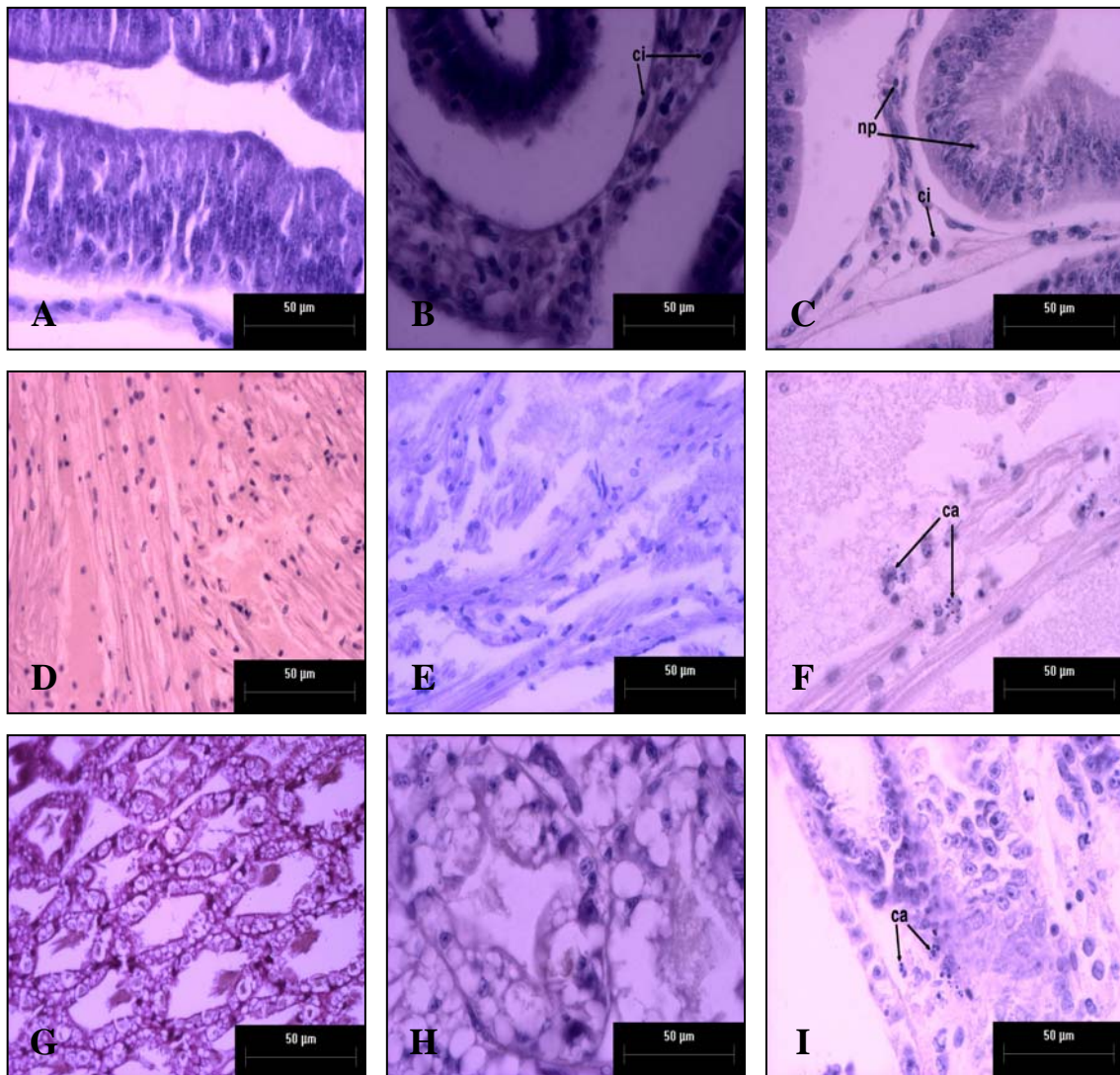


Fig. 17. Sección histológica de caeca (A, B y C), corazón (D, E y F) de hepatopáncreas (G, H e I) de juveniles de *L. vannamei* infectados experimentalmente con WSSV. Organismo: (A, D y G) Blanco no se observó ninguna lesión; (B, E y H) Control (+) presencia de C. I.; en caeca (B); (C, F y I) con 100 mg/L silicio orgánico se observan, C.I. y núcleos picnóticos (np) en caeca (C), cariorrexis (ca) en corazón (F) en hepatopáncreas (I). Aumento 40X. Tinción hematoxilina-eosina (H&E).

### **7.3 Efectos de silicio orgánico en la prevención de la infección de *V. harveyi*.**

Para determinar el efecto del silicio orgánico sobre el estado inmunológico y prevención de *L. vannamei* ante una infección con *V. harveyi*, se determinaron los siguientes parámetros: porcentaje de supervivencia, CTH, SOD, producción de  $O_2^-$  y daño histopatológico.

#### **7.3.1 Dosis Subletal (DSL) con *V. harveyi*.**

La DSL se obtuvo al inyectar en el 3er segmento abdominal de camarones varias dosis UFC/mL de *V. harveyi* durante 144 h. La dosis UFC/mL que se eligió fue la de  $1 \times 10^6$  (Fig. 18).

Se inyectaron 20  $\mu$ L de las diferentes dosis ( $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $4 \times 10^6$ ,  $8 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ) UFC/mL de *V. harveyi*/g del peso de organismo, utilizando como blanco agua de mar filtrada estéril (no se observaron efectos adversos al inyectar esta solución como blanco).

En la Fig. 18 se muestra el porcentaje de supervivencia de *L. vannamei* inyectados con diferentes dosis de UFC/mL de *V. harveyi*. De acuerdo a las necesidades del experimento, el inóculo que se eligió fue aquel con una concentración bacteriana incapaz de causar la totalidad de la mortalidad a los organismos por un período mínimo de 6 días. Por lo tanto, la dosis escogida fue aquella inmediatamente menor a la que sí causó mortalidad, misma que se denomina Dosis Subletal, siendo la dosis  $1 \times 10^6$  UFC/mL de *V. harveyi* la que se eligió para realizar la infección.



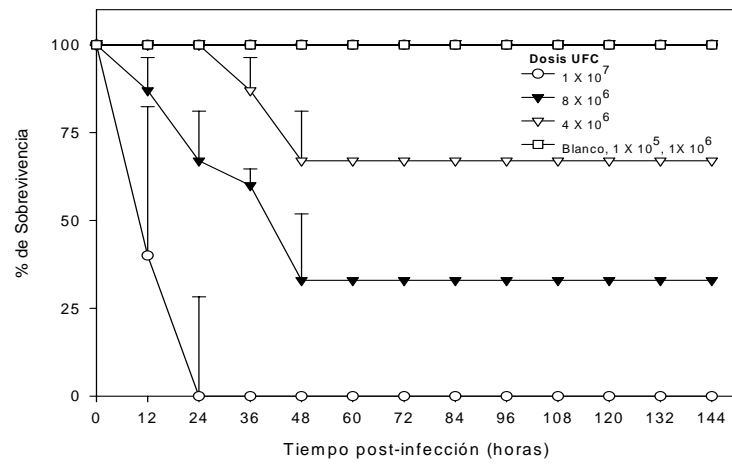


Fig. 18. Dosis Subletal (DSL) de organismos *L. vannamei* inyectados con varias dosis de UFC/mL de *V. harveyi*.

### 7.3.2 Supervivencia de *L. vannamei* expuestos a *V. harveyi*.

La Fig. 19 muestra el porcentaje de supervivencia de organismos *L. vannamei* después de haber sido expuestos a silicio orgánico por inmersión con concentraciones de 1 y 10 mg/L o por inclusión en la dieta con 50 mg/kg e infectados con una dosis de  $1 \times 10^6$  UFC/mL de *V. harveyi*. Las primeras mortalidades se presentaron dentro de las 24 y 72 h post-infección en todos los tratamientos y el control (+), siendo el tratamiento de 50 mg/kg de silicio orgánico el que siempre mantuvo un porcentaje más bajo de supervivencia en el transcurso del experimento comparado con otros tratamientos y el control (+), presentando además un 50% de supervivencia después de las 24 h post-infección y el único que tuvo el 100% de mortalidad al final del experimento. El tratamiento con 10 mg/L tuvo un 18 % de supervivencia, con 1 mg/L y el control (+) un 35 %.

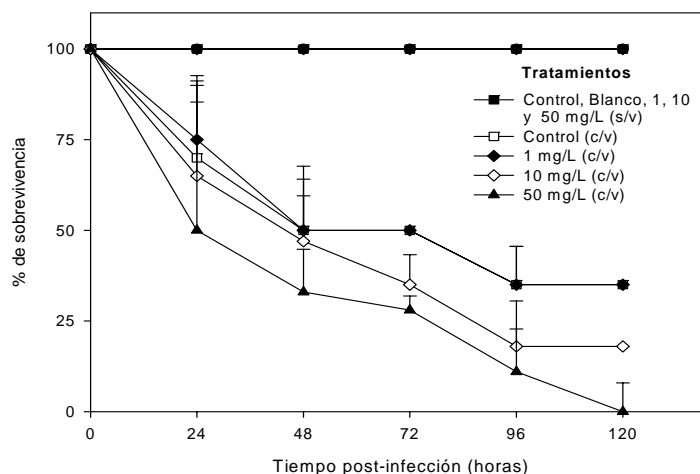


Fig. 19. Porcentaje (%) de supervivencia de *L. vannamei* infectados con *V. harveyi* después de haber sido expuestos a silicio orgánico por inmersión 1 y 10 mg/L o inclusión en la dieta 50 mg/kg silicio orgánico. Sin *V. harveyi* (s/v) y con *V. harveyi* (c/v).

### 7.3.3 Conteo Total de Hemocitos Circulantes.

El conteo total de hemocitos presenta un aumento significativo ( $P<0.05$ ) a las 24 h posterior a la suspensión del silicio orgánico en el tratamiento 10 mg/L silicio orgánico vía inmersión con respecto al grupo control, observándose el mismo efecto a las 72 y 120 h posterior a la suspensión del silicio orgánico en el tratamiento con 50 mg/kg de silicio orgánico por inclusión en la dieta con respecto al control (Fig. 20A). Cuando los organismos fueron infectados con *V. harveyi*, el CTH disminuyó significativamente ( $P<0.05$ ) a las 24 h posterior a la suspensión del silicio orgánico en el tratamiento con 1 mg/L silicio orgánico vía inmersión, con respecto al control, mientras que a las 72 h el CTH aumentó significativamente ( $P<0.05$ ) en el tratamiento con 50 mg/kg silicio orgánico vía inclusión en la dieta con respecto al control (Fig. 20B).

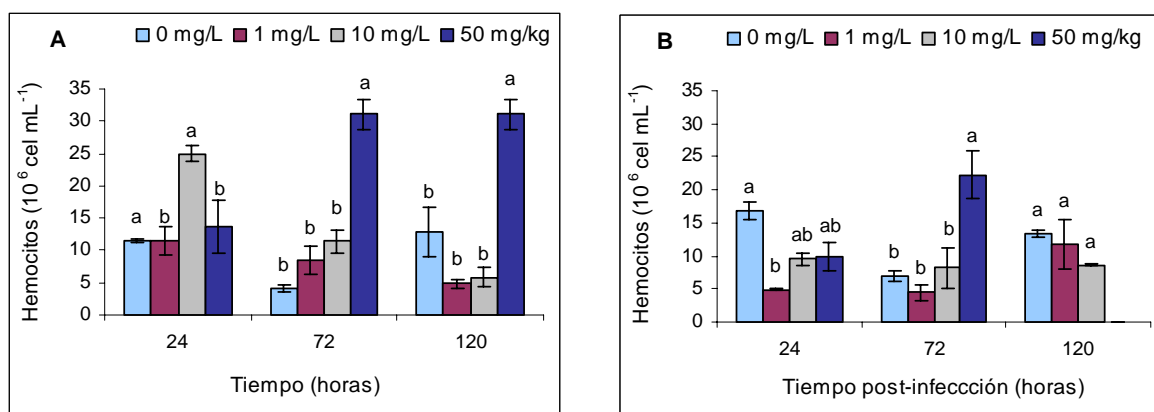


Fig. 20. Conteo Total de hemocitos Circulantes en hemolinfa de organismos expuestos a silicio orgánico por inmersión (1 y 10 mg/L) o inclusión en la dieta (50 mg/kg). No infectados (A) e infectados (B) con una dosis de  $1 \times 10^6$  UFC/mL de *V. harveyi*. Letras diferentes muestran diferencia significativa ( $P<0.05$ ).

### 7.3.4 Producción de anión superóxido en hemocitos.

La producción de anión superóxido disminuyó significativamente ( $P<0.05$ ) a las 72 h posterior a la suspensión del silicio orgánico en el tratamiento de 50 mg/kg silicio orgánico por inclusión en la dieta con respecto al control, mientras que a las 120 h posterior a la suspensión del silicio orgánico, la producción de anión superóxido se incrementó significativamente ( $P<0.05$ ) en el tratamiento con 1 mg/L silicio orgánico con respecto al grupo control (Fig. 21 A). En el transcurso del experimento de infección con *V. harveyi* se observó una disminución significativa ( $P<0.05$ ) de la producción de anión superóxido en el tratamiento con 50 mg/kg silicio orgánico a las 72 h posterior a la suspensión del silicio orgánico (Fig. 21 B).

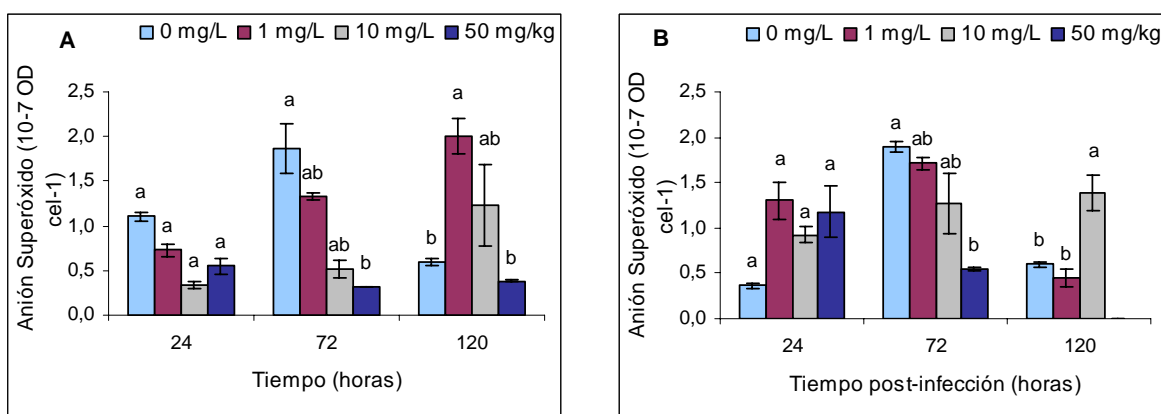


Fig. 21. Producción de anión superóxido en hemolinfa de organismos expuestos a silicio orgánico por inmersión (1 y 10 mg/L) o inclusión en la dieta (50 mg/kg). No infectados (A) e infectados (B) con una dosis de  $1 \times 10^6$  UFC/mL de *V. harveyi*. Letras diferentes muestran diferencia significativa ( $P<0.05$ ).

### 7.3.5 Actividad enzimática SOD en hemocitos.

La actividad de la SOD aumentó significativamente ( $P<0.05$ ) a las 24 h posterior a la suspensión del silicio orgánico en el tratamiento con 1 mg/L con respecto al control, mientras que en el tratamiento con 10 mg/L se observó una disminución significativa ( $P<0.05$ ) con respecto al control. Sin embargo, a las 72 h posterior a la suspensión del silicio orgánico, la actividad SOD disminuyó significativamente ( $P<0.05$ ) en el tratamiento con 10 y 50 mg/kg silicio orgánico con respecto al control (Fig. 22A). En el transcurso de la infección con *V. harveyi*, se observó que a las 24 h post-infección, la actividad SOD se incrementó significativamente ( $P<0.05$ ) en todos los tratamientos con respecto al control, observándose el mismo comportamiento a las 72 y 120 h post-infección en los tratamientos con 1 y 10 mg/L silicio orgánico (Fig. 22 B).

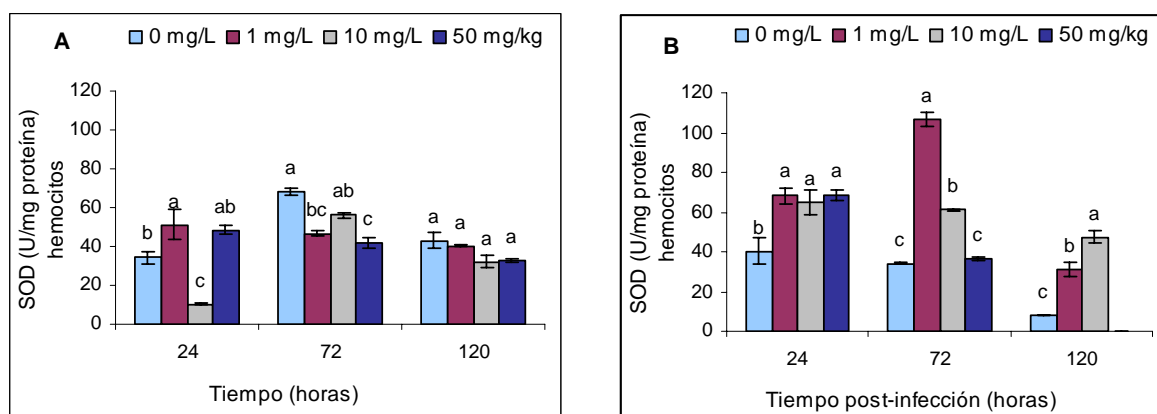


Fig. 22. Actividad enzimática SOD en hemocitos de organismos expuestos a silicio orgánico por inmersión (1 y 10 mg/L) o inclusión en la dieta (50 mg/kg). No infectados (A) e infectados (B) con una dosis de  $1 \times 10^6$  UFC/mL de *V. harveyi*. Letras diferentes muestran diferencia significativa ( $P<0.05$ ).

### **7.3.6 Daños histológicos.**

Las lesiones encontradas en los organismo que sobrevivieron a la infección de *Vibrio harveyi* después de 240 h post-infección, fueron observadas en tejido conjuntivo, branquias, O.L., hepatopáncreas y caeca de organismos expuestos a silicio orgánico y el control (+). (Figs. 23-26).

Los organismos que no presentaron lesiones fueron los expuestos a 1 mg/L silicio orgánico, ya que solo se observó una masa de bacterias en el hepatopáncreas, lo cual también se detectó en el tratamiento con 10 mg/L silicio orgánico y el control (+). En organismos expuestos a 10 m/L de silicio orgánico, se observó una masa de bacterias en tejido conjuntivo, necrosis difusa en branquias grado G3 y en O.L. con un grado G2, mientras que en el control (+), se detectó necrosis difusa en branquias con un grado G3 y en O.L., tejido conjuntivo y caeca con un grado G2. Tabla VII.

**Tabla VII.** Daño histopatológico en *L. vannamei* expuestos a tratamientos con silicio orgánico por inmersión 1, 10 y 100 mg/L y por inclusión en la dieta (50 mg/kg) con su posterior infección con *V. harveyi*. Tratamientos (mg/L silicio orgánico)\*: G0, ---; G1, +; G2, ++; G3, +++; G4, ++++. N/D No determinado.

Órgano/Tejido	Daños histopatológicos									
	Necrosis difusa					Masa de bacteria				
	Blanco	Control (+)	1*	10*	50*	Blanco	Control (+)	1*	10*	50*
Branquias	---	+++	---	+++	N/D	---	---	---	---	N/D
Órgano linfóide	---	++	---	++	N/D	---	---	---	---	N/D
Tejido conjuntivo	---	++	---	---	N/D	---	---	---	+++	N/D
Hepatopáncreas	---	---	---	---	N/D	---	+++	+++	+++	N/D
Ceca	---	++	---	---	N/D	---	---	---	---	N/D

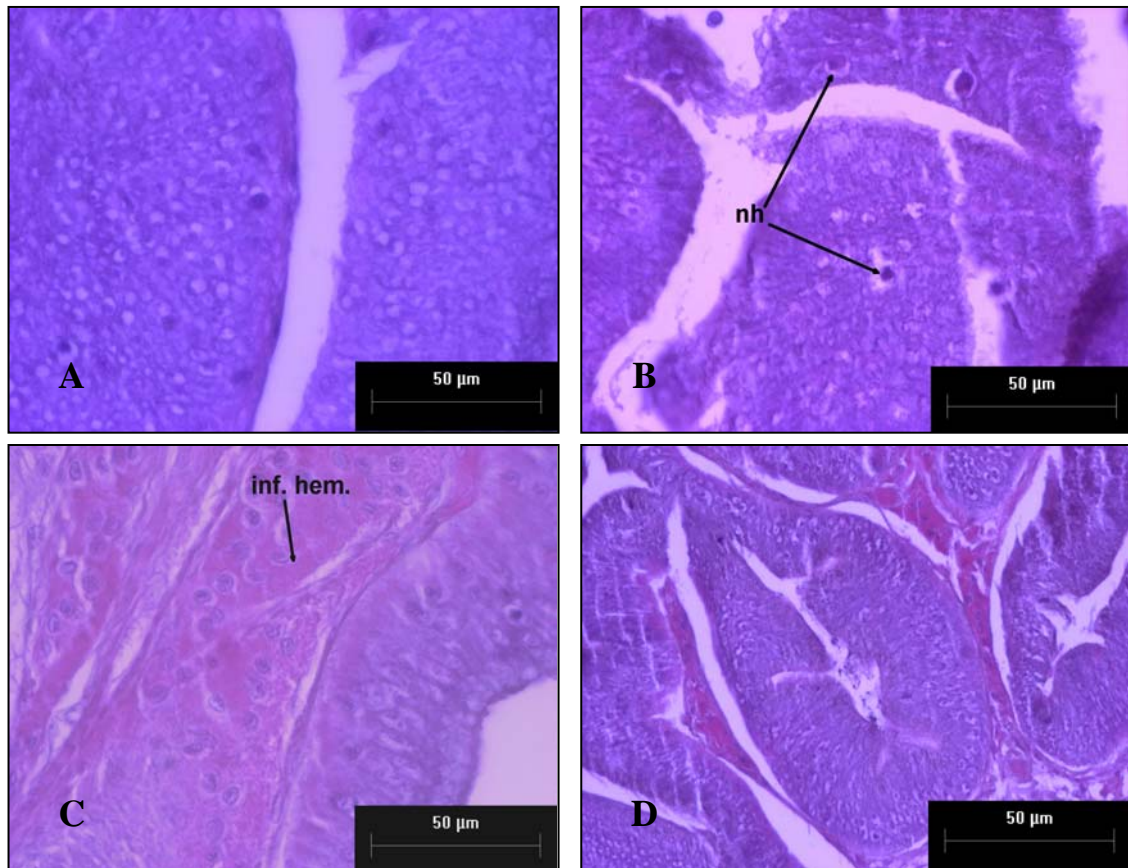


Fig. 23. Sección histológica de caeca de juveniles de *L. vannamei* infectados experimentalmente con *V. harveyi*. Organismos: (A) Blanco, no se observa lesión alguna; (B) control (+) presencia de núcleos hipertrofiados; (C) con 1 mg/L silicio orgánico se observa infiltración hemocítica y (D) con 10 mg/L silicio orgánico no se observa daño histopatológico. Aumento 40X. Tinción hematoxilina-eosina (H&E).



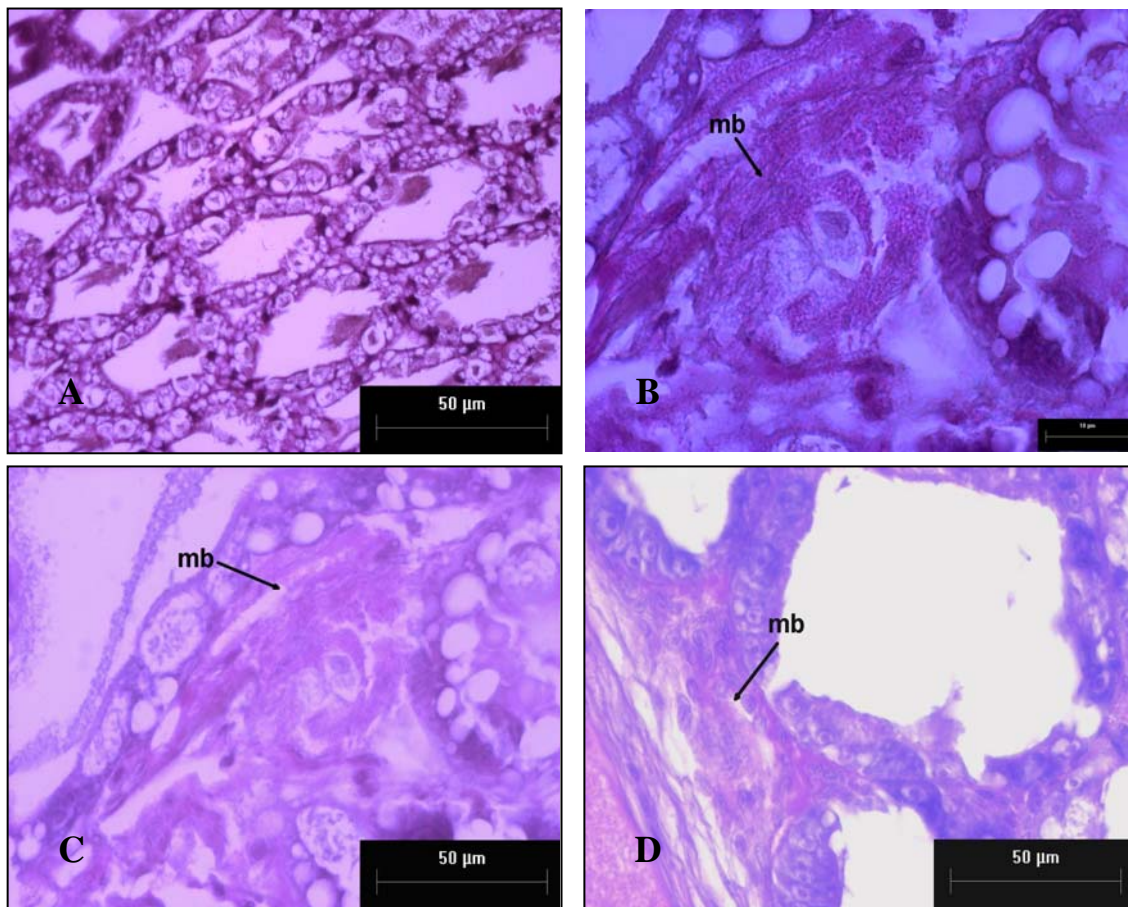


Fig. 24. Sección histológica de hepatopáncreas de juveniles de *L. vannamei* infectados experimentalmente con *V. harveyi*. Organismos: (A) Blanco no se observa lesión alguna; (B) control (+), (C) con 1 mg/L silicio orgánico y (D) con 10 mg/L silicio orgánico presencia de masa bacteriana (mb). Aumento 40X. Tinción hematoxilina-eosina (H&E).

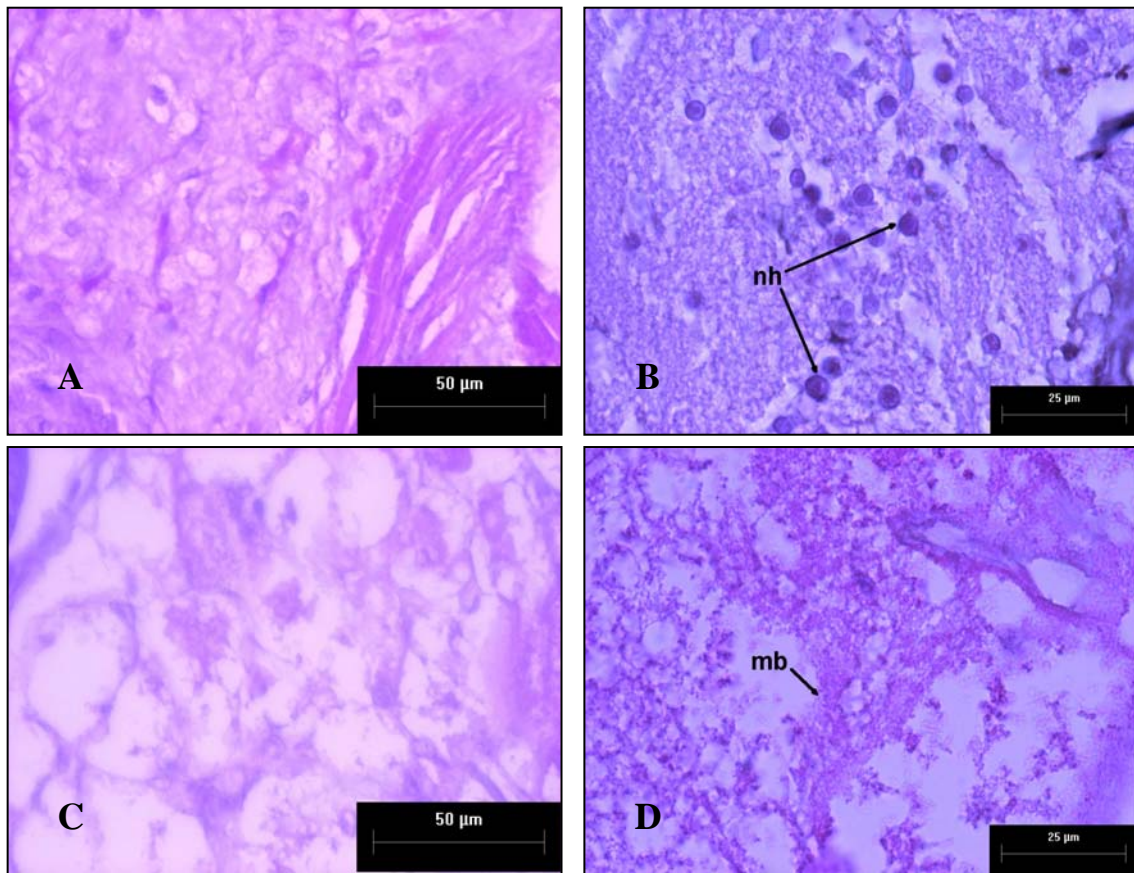


Fig. 25. Sección histológica de tejido conectivo de juveniles de *L. vannamei* infectados experimentalmente con *V. harveyi*. Organismos: (A) Blanco, no se observa lesión alguna; (B) control (+) núcleos hipertrofiados (nh); (C) con 1 mg/L silicio orgánico no se observa lesión alguna y (D) con 10 mg/L silicio orgánico presencia de masa bacteriana (mb). Aumento 40X. Tinción hematoxilina-eosina (H&E).



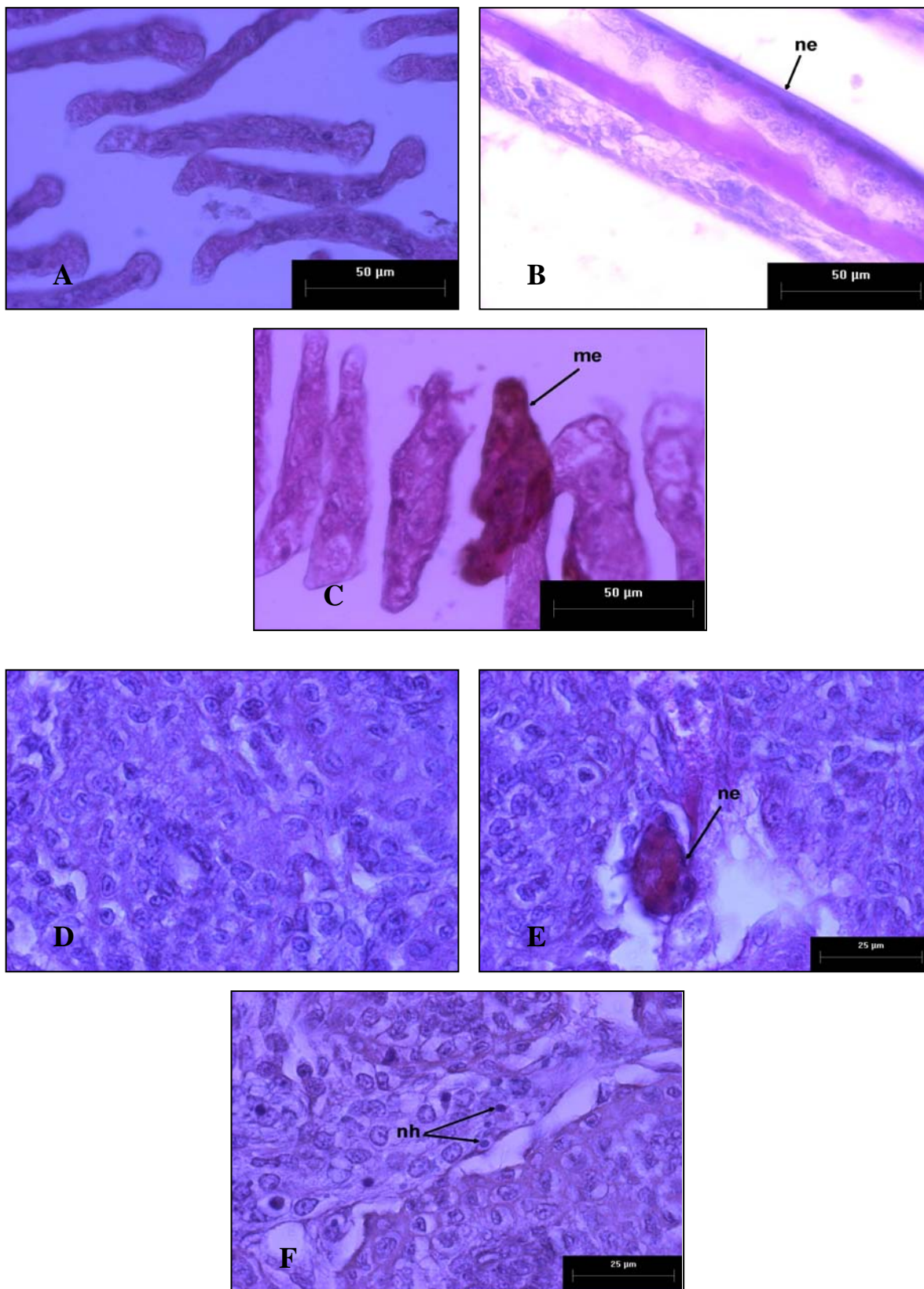


Fig. 26. Sección histológica de branquias (A, B y C) de juveniles de *L. vannamei* infectados experimentalmente con *V. harveyi*. Organismos: (A) Blanco, no se observa lesión alguna; (B) control (+) necrosis (ne); (C) con 10 mg/L silicio orgánico melanización (me). Sección de órgano linfoide (D, E y F); organismos: (D) Blanco, no se observa lesión alguna; (B) control (+) necrosis (ne) y (C) con 10 mg/L silicio orgánico núcleos hipertrofiados (nh). Aumento 40X. Tinción hematoxilina-eosina (H&E).



## 8. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se evaluó el valor nutracéutico (inmunomodulador-antioxidante) del silicio orgánico, y su efecto sobre el estado inmunológico del camarón *L. vannamei*, tras haber aplicado el silicio orgánico por inmersión o inclusión en la dieta, como una alternativa para reforzar el sistema inmune del organismo, y a su vez prevenir o contrarrestar los efectos ocasionados por infecciones de tipo bacteriana y viral. En realidad, no existen estudios sobre la utilización del silicio orgánico en especies marinas. Sin embargo, la realización de este trabajo se sustentó tomando en cuenta los efectos benéficos, especialmente por las propiedades antioxidantes que el silicio orgánico ha generado en la salud humana (Carlisle, 1974; Aubert y Magdon, 1993; Ribault-Le, 2005) y en la agricultura (Gillman *et al.*, 2002; Rodrigues, *et al.*, 2003). En ambos casos cuando los organismos están bajo condiciones de estrés ambiental.

Como se observó en los experimentos realizados a lo largo de este estudio, los parámetros inmunológicos evaluados en *L. vannamei* presentaron una gran variabilidad cuando los organismos fueron expuestos al silicio orgánico por inmersión o por inclusión en la dieta, así como después de suspender el tratamiento de silicio orgánico, y ante infecciones con WSSV y *V. harveyi*.

### 8.1 Conteo Total de Hemocitos.

Varios mecanismos de defensa en crustáceos se encuentran en la hemolinfa, siendo los hemocitos una parte fundamental de la misma, los cuales juegan un papel importante en las reacciones de defensa como fagocitosis, coagulación, encapsulación y formación de nódulo y producción de especies reactivas de oxígeno (Söderhäll y Cerenius, 1992;

Johansson *et al.*, 2000; Le Moullac y Haffner, 2000; Muñoz *et al.*, 2000). Existen varios factores que modifican el conteo total de hemocitos en crustáceos, siendo la propia naturaleza de estas especies un factor limitante para definir con exactitud este parámetro, ya que la variabilidad del CTH, está en función de cambios bioquímicos, biológicos, modificaciones morfológicas y fisiológicas de los crustáceos (Tsing *et al.*, 1989; Hose-Ellen *et al.*, 1992; Le Moullac *et al.*, 1997; Echeverría, 2002 y Chen-Chu *et al.*, 2004), así como a condiciones del medio ambiente (Sánchez *et al.*, 2001; Rodríguez 2001; Perazzolo *et al.*, 2002; Pascual *et al.*, 2003 y Malham *et al.*, 2003; Jiravanichpaisal, *et al.*, 2004; Magallon-Servín, 2004) y a la presencia de material extraño ó patógeno (Molina *et al.*, 2002; Montesdeoca *et al.*, 2002; Maldonado-Villavicencio, 2003).

Según Muñoz *et al.* (2002) la variabilidad en el número de hemocitos es regulada por la liberación de células por el tejido hematopoyético y por la migración de hemocitos a diferentes tejido. Por otra parte, Jiravanichpaisal *et al.* (2001), mencionan que la variación en el CTH puede estar en función de la presencia de algún patógeno o partícula extraña reconocida por el hospedero como no propia. En el 1<sup>er</sup> y 2<sup>do</sup> experimentos de este trabajo, no hubo presencia de algún patógeno, pero sí la del silicio orgánico, lo cual pudo haber ocasionado que el CTH disminuyera significativamente ( $P < 0.05$ ) en todos los tratamientos a las 6 y 24 h posterior a la aplicación del silicio orgánico por inmersión con respecto al control (Fig. 2A). Un efecto similar es reportado en *L. vannamei* inmunoestimulados con  $\beta$ -glucanos y polisacáridos sulfatados por inmersión (Henning *et al.*, 1998, Lorenzon *et al.*, 1999; Goarant *et al.*, 2000 y Campa-Córdova *et al.*, 2002;). Dicha disminución puede deberse a que, la presencia de éste

compuesto provoque que los hemocitos abandonen la circulación e infiltren los tejidos, observándose una caída de la población de los hemocitos circulantes. Es decir el silicio orgánico genera una respuesta en los organismos que es reconocida como no propia, como lo mencionan Ryan y Karp (1993), lo que implica que los hemocitos entren en acción mediante mecanismos de defensa como la infiltración, acompañada de los procesos de eliminación del silicio orgánico (fagocitosis o nodulación). Por otra parte, a las 48 h posteriores a la aplicación del silicio orgánico, se observa que el CTH aumenta significativamente ( $P < 0.05$ ) en el tratamiento con 1 mg/L silicio orgánico con respecto al control. Algunos autores mencionan que una disminución del CTH en respuesta a una bacteria o material extraño, más tarde es compensado con un incremento (Sequeira *et al.*, 1996 y Henning *et al.* 1998). Sin embargo, los niveles del CTH vuelven a los estados basales a las 72 h posteriores a la exposición del silicio orgánico.

El hecho de que en el exp. 2 el CTH aumentara significativamente ( $P < 0.05$ ) en varios tratamientos con respecto al control a partir de las 96 h posterior a la exposición al silicio orgánico, puede ser una consecuencia de que la presencia del silicio orgánico haya ocasionado una migración de los mismos a diferentes tejidos, lo cual induciría a una mayor proliferación de hemocitos a partir del tejido hematopoyético, como ha sido mencionado por Molina *et al.* (2002). En este caso es importante señalar que los valores del CTH en el tratamiento con 10 mg/kg de silicio orgánico siempre se mantuvieron cerca a los del control, observándose que el CTH aumentó significativamente ( $P < 0.05$ ) a las 264 h después de la aplicación del silicio orgánico en este tratamiento con respecto al control, lo cual puede ser un indicativo de que la aplicación del silicio orgánico a esa concentración, y por ese método, puede favorecer la proliferación de hemocitos.

Molina *et al.*, (2002) señalan que la proliferación de hemocitos es evidente cuando el inmunoestimulante es eliminado y la producción de nuevos hemocitos supera la infiltración ocasionada por el mismo inmunoestimulante. Esto podría ser lo que ocurrió en el caso observado en la Fig. 9A, a las 24 h posterior a la suspensión del silicio orgánico en el tratamiento con 10 mg/L, y a las 72 y 120 h en el tratamiento con 50 mg/kg. Sin embargo, cuando los organismos fueron infectados se observó una disminución en el CTH en todos los tratamientos comparados con los estados basales, excepto en el control (+), lo cual pudiera deberse a que el número de hemocitos libres fue influenciado por la capacidad de hospedero a reaccionar en contra de materiales extraños (silicio orgánico) así como ante infecciones (*V. harveyi*) ocasionando la infiltración de los mismos a los tejidos donde se presenta la infección (Persson *et al.*, 1987; Johansson and Soderhall, 1992; Lorenzon *et al.*, 1999).

Los resultados del hemograma obtenidos en el experimento de infectividad con WSSV del blanco (hemolinfa azul) concuerdan con los reportados por la literatura. Sin embargo, Montesdeoca *et al.* (2002), reportaron que ante una infección con WSSV, *L. vannamei*, responde generando hemocitos después de los 7 días post-infección, siendo dicho aumento más elevado entre más aguda fue la infección. Esta respuesta sugiere la capacidad en el camarón de reconocer al WSSV como no propio y de reaccionar de manera análoga a lo observado en otros artrópodos desafiados con otros microbios. En *Penaeus japonicus* la infección con *Fusarium solani* provocó el incremento de hasta 6 veces los hemocitos circulantes (Sequeira *et al.*, 1996). En la cucaracha *Periplaneta americana*, el descenso provocado por la inyección de *Enterobacter cloacae*, es seguido de la proliferación de hemocitos (Ryan y Karp 1993). No obstante, los resultados



obtenidos para *L. vannamei* en este trabajo ante una infección con WSSV, mostraron una disminución significativa ( $P < 0.05$ ) del CTH en los tratamientos con respecto al control (+) y al blanco (Fig. 9B); lo cual pudiera estar asociado a que el silicio orgánico ocasionara una infiltración de hemocitos a los diferentes tejidos, dejando de cierta manera al organismo en desventaja ante la agresión viral y permitiendo que el WSSV invadiera e infectara el tejido hematopoyético afectando la capacidad de respuesta del organismo, aprovechándose éste para entrar a otros tejidos (Chang-Fang *et al.*, 1996). De esta manera, el virus ganaría terreno, en tanto que se acumularían en circulación hemocitos desgastados, mismos que al liberar su peligroso contenido en la hemolinfa, melanizaría el plasma tornándolo rosado (Montesdeoca *et al.*, 2002).

Aún con la gran diversidad de trabajos realizados enfocados a definir este parámetro en organismos infectados con WSSV, todavía no se ha podido elucidar del todo la causa que ocasiona un descenso en el número de hemocitos. Según Henning *et al.* (1998), el virus es el responsable de la disminución de los hemocitos, posiblemente debido a la exposición de las células por apoptosis inducida por el virus, dando como resultado un rebrote del virus. Otros autores como Montesdeoca (2001) también reportan apoptosis en los hemocitos de camarón infectado con WSSV. Sin embargo, Sonnenholzner y *et al.*, (2002) observaron en hemogramas seriados de una población de animales infectados con WSSV a 33° C (sin mortalidad), una disminución de hemocitos semigranulares al tercer día después de la infección. Esta disminución fue relacionada con una migración de los hemocitos a los tejidos y a la presencia de cápsulas en los tejidos blancos del WSSV.

Es importante señalar que el conteo total de hemocitos (CTH) han sido utilizados como un indicador del estado inmune en crustáceos y otros invertebrados, sin embargo, de acuerdo a la gran variabilidad que existe en los resultados reportados por varios autores (Chang-Fang *et al.*, 2003; Cheng, W *et al.* 2005, Jiravanichpaisal *et al.*, 2004; Liu-Hung *et al.*, 2004; Cheng, W. *et al.*, 2004; Yen-Tuen *et al.*, 2004 y Hou-Ying y Chen-Chu, 2005), queda claro que para determinar este parámetro se requiere de una identificación y control total de los factores que pudiesen ocasionar una disminución o aumento del CTH, para poder definir con exactitud el papel que juega un inmunoestimulante o bien el efecto de la presencia de algún patógeno en este parámetro. Gracias a los avances científicos con lo que respecta al sistema inmune de *L. vannamei*, se conocen ciertos factores extrínsecos e intrínsecos que pueden modificar el conteo total de hemocitos.

## **8.2 Especies Reactivas de Oxígeno y enzimas antioxidantes.**

Muchos mecanismos de defensa celular en crustáceos dependen de la producción controlada de radicales libres durante la fagocitosis (Muñoz *et al.*, 2000; Rodríguez y Le Moullac 2000). Sin embargo, es importante señalar que una producción excesiva de radicales libres, conduce a una peroxidación lipídica en cadena, capaz de modificar la estructura y alterar las funciones de las membranas lisosomal, mitocondrial, endoplasmática o celular, modificando y conduciendo eventualmente a la lisis y muerte celular (Wu, 1999). De acuerdo a las características de las especies reactivas de oxígeno, éstas tienen un período de vida muy corto, lo cual es consecuencia del ataque al elemento próximo, demostrando especial avidez por los ácidos grasos poliinsaturados constituyentes de las membranas biológicas. Por lo tanto, para la evaluación del  $O_2^-$  es importante tomar en consideración las características del mismo, así como los factores

que pudiesen estar implícitos en su eliminación, con la finalidad de que los resultados obtenidos correspondan exactamente a la producción de  $O_2^-$  ocasionado por un determinado patógeno o compuesto.

En términos generales, la capacidad respiratoria se incrementa significativamente ( $P<0.05$ ) a las 72 h posterior a la aplicación del silicio orgánico por inmersión en el tratamiento con 100 mg/L con respecto al control (Fig. 3A). Sin embargo, cuando el silicio orgánico fue incluido en la dieta, la producción de  $O_2^-$  disminuyó significativamente ( $P<0.05$ ) a las 24, 96 y 264 h posteriores a la aplicación del silicio orgánico en el tratamiento de 50 mg/kg con respecto al control (Fig. 3B). Por otro lado, a las 120 h posterior a la suspensión del silicio orgánico, el anión superóxido se incrementó significativamente ( $P<0.05$ ) en el tratamiento con 10 mg/L de silicio orgánico respecto al control, mientras que a las 72 y 120 h después de suspender el tratamiento de 50 mg/kg silicio orgánico la producción disminuyó significativamente ( $P<0.05$ ) con respecto al control (Fig. 21 A). Con estos resultados, y de acuerdo a las propiedades antioxidantes del silicio orgánico, se puede pensar que el silicio orgánico actúa removiendo los radicales libres, confiriendo mayor protección a la membrana celular.

La superóxido dismutasa es una de las principales rutas de defensa antioxidante en respuesta a estrés oxidativo, ya que es la que cataliza la reacción de anión superóxido a peróxido de hidrógeno (Fridovich, 1995). Por lo tanto, para la existencia de la enzima implica la presencia del radical superóxido como elemento formado durante el metabolismo oxidativo celular, ocasionando a su vez la formación de diversos

elementos reactivos derivados del oxígeno durante el metabolismo oxidativo y su participación en procesos fisiológicos y fisiopatológicos (Rodríguez *et al.*, 2001).

Hou-Ying y Chen-Chu (2005), reportaron un incremento de la actividad SOD en hemocitos al primer día después de que se inyectaron juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) con extracto de alga roja *Gracilaria tenuistipitata*. Sin embargo, a los dos días posteriores a la aplicación del tratamiento, los niveles de la actividad SOD regresaron a su estado basal. Campa-Córdova *et al.* (2005) reportan que después de un incremento en la actividad de la Mn-SOD, se registró una disminución de la actividad antioxidante a las 72 y 96 h, después de la inmunoestimulación del camarón blanco (*L. vannamei*) con  $\beta$ -glucano, lipopolisacárido (LPS), fucoidán, y *V. penaeicida* muerto por calor. Un comportamiento similar se observa en el presente estudio con respecto a la actividad SOD en hemocitos de organismos expuestos a silicio orgánico por inmersión en condiciones basales (Fig. 4). Campa-Córdova *et al.* (2002) relacionaron la disminución de la actividad SOD en adultos de *L. vannamei* con el estrés ocasionado por activadores del sistema inmune. Los niveles más bajos de la actividad SOD en hemocitos, se observaron en el transcurso de la aplicación de silicio orgánico por inmersión, incrementándose estos niveles después de suspender el silicio orgánico, y en algunos tratamientos con la presencia del *V. harveyi*. Es importante señalar que hubo una relación entre la producción de anión superóxido y la actividad SOD en hemocitos, ya que entre menor fue la producción de anión superóxido, los niveles de la actividad SOD disminuyeron; con estos resultados se demuestra una vez más que a una excesiva producción de  $O_2^-$  implica una mayor activación de SOD en organismos sanos.

En el presente estudio, se observó que la actividad SOD y CAT en músculo disminuyó significativamente ( $P < 0.05$ ) con respecto a la de hepatopáncreas en ambos métodos de aplicación, siendo lo anterior consecuencia de la propia funcionalidad del hepatopáncreas ya que es una glándula con alta actividad metabólica (Mourete, 1996), que está implicada en la transportación, acumulación, excreción y eliminación de material extraño (Alday-Sanz *et al.*, 2002), por lo que se espera que haya una gran cantidad de producción de especies reactivas de oxígeno ROS (Arun y Subramantian, 1998), lo cual conlleva a la activación del sistema antioxidante donde están implicadas la enzima SOD y CAT (Fridovic, 1989, Rodríguez *et al.*, 2001).

Los análisis de SOD en organismo expuestos a SiO<sub>2</sub> por inmersión e inclusión en la dieta, indican que la actividad SOD disminuye significativamente ( $P < 0.05$ ) en algunos tratamientos y puntos de muestreo con respecto al control, tanto en músculo como en hepatopáncreas (Figs.5A, B, C y D). De acuerdo a los resultados obtenidos con este parámetro, y a la poca información que existe sobre cuáles son los niveles ideales de la actividad SOD en músculo y hepatopáncreas que pudieran favorecer en un determinado momento el sistema inmune de camarón, no se puede utilizar por ahora este parámetro como un indicativo del estatus de salud del organismo.

Los resultados de la actividad CAT en músculo y en hepatopáncreas presentaron una gran variabilidad con ambos métodos de aplicación del silicio orgánico, y no muestran ser un indicador que favorezca el estatus de salud del organismo. Aún así, es importante señalar que dicha actividad en músculo aumentó significativamente ( $P < 0.05$ ) después de la aplicación de silicio orgánico a las 24 h en el tratamiento de 1 mg/L de silicio orgánico, y a las 72 h en el tratamiento de 10 mg/L silicio orgánico con respecto al

control. Cuando el silicio orgánico fue suplementado en la dieta, la actividad CAT en músculo aumentó significativamente ( $P < 0.05$ ) a las 96 h después de la aplicación del silicio orgánico en el tratamiento con 10 mg/kg, y a las 264 h en los tratamientos de 10 y 50 mg/kg silicio orgánico con respecto al control. Por otra parte, se observó que la actividad CAT en hepatopáncreas aumentó significativamente ( $P < 0.05$ ) a las 264 h después de la aplicación del silicio orgánico en el tratamiento de 10 mg/kg silicio orgánico con respecto al control. En realidad, existen pocos estudios relacionados con lo que respecta a la actividad CAT en músculo y hepatopáncreas en invertebrados. Sin embargo, Dandapat *et al.* (2000) mencionan que el suplemento de la vitamina E en la dieta disminuye la peroxidación de lípidos y modula la actividad CAT en tejidos específicos. Estos autores reportan una disminución en branquias, mientras que dicha actividad se mantiene sin cambio en el hepatopáncreas de *Macrobrachium rosenbergii*. Un efecto similar podría atribuirse al silicio orgánico en el presente estudio ya que la actividad CAT tiende a disminuir tanto en músculo como en hepatopáncreas en todos los tratamientos con respecto al control. Sin embargo, es importante realizar otros análisis que nos permitan sustentar de manera más clara y contundente el efecto del silicio orgánico sobre este parámetro.

### **8.3 Efecto del silicio orgánico en camarones infectados con WSSV y *V. harveyi*.**

Desde que se presentaron las primeras mortalidades en el cultivo de camarón, a consecuencia de la gran diversidad de enfermedades que se presentan en el medio ambiente marino, ocasionadas por agentes virales y bacterianos, varios autores (Hameed-Sahul *et al.*, 2000; Rodríguez, 2001; Granja, *et al.*, 2003; Chang-Fang *et al.*, 2003; Jiravanichpaisal *et al.*, 2004) se han enfocado a realizar estudios que definan los

factores extrínsecos e intrínsecos que están implicados para que se lleve a cabo la interacción entre patógeno y hospedero, así como las vías de propagación y los tejidos u órganos blancos preferidos del patógeno, con la finalidad de poder tomar medidas profilácticas que conlleven a disminuir altas mortalidades en cultivos de camarón.

Actualmente existen varios estudios enfocados en determinar los factores que están implicados en las mortalidades masivas en organismos de *L. vannamei* ocasionadas por WSSV y *V. harveyi*, así como de compuestos que puedan servir como inmunoestimulantes y contrarrestar dichas enfermedades. Aún así, los resultados reportados todavía dejan algunos puntos inconclusos que no permiten concluir con claridad en qué tiempo y qué dosis de un determinado compuesto utilizado como inmunoestimulante, puede ser confiable y eficaz para disminuir o anular los efectos de esta clase de patógenos en el cultivo de camarón. Sin embargo, dichos resultados nos sirven como guía para definir en un determinado momento qué factores se deben tomar en consideración para continuar realizando estudios enfocados a mejorar el sistema inmune del camarón, y poder con ello disminuir las mortalidades en los cultivos del mismo.

Los resultados de supervivencia obtenidos en los bioensayos de infección con WSSV y *V. harveyi* mostraron un comportamiento similar en los diferentes tratamientos y el control (+), siendo en las concentraciones más altas (50 mg/kg y 100 mg/L) donde se observó un alto porcentaje de mortalidades en períodos cortos de exposición a los patógenos (Figs 8 y 19), aún cuando ambos microorganismos difieren en cuanto a su biología, y manera de propagarse en los tejidos y órganos.

El bajo porcentaje de sobrevivencia de *L. vannamei* observado en el experimento de infección con WSSV, pudo ser consecuencia de la poca presencia de hemocitos en los organismos. Sin embargo, es importante señalar que existen varios factores que pueden ocasionar una gran variabilidad en el CTH (Henning *et al.*, 1998; Ryan y Karp 1993; Sonnenholzner *et al.* 2002; Molina *et al.*, 2002). Por otra parte, si se toman en cuenta los resultados histopatológicos muestran que el WSSV se esparció rápidamente en los principales órganos y tejidos, siendo uno de éstos el tejido hematopoyético, lo cual imposibilitaría o dificultaría cualquier oportunidad de recuperación inmunitaria del huésped como lo mencionan Chang-Fang *et al.*(1996) y Peng-En, *et al.* (1998). Algunos autores (Tapay *et al.*, 1997; Lightner *et al.*, 1998; Nunan *et al.*, 1998; Rodríguez, *et al.*, 2003), reportan que las células presentan núcleos hipertrofiados con cuerpos de inclusión eosinófilos, basófilos; esferoides, núcleos picnóticos y cariorrexis en órgano linfoide, tejido hematopoyético, tejido conectivo, corazón y glándula antenal, en organismos infectados con WSSV. En las Figs.11 a 17 se puede observar la severidad del daño que el WSSV ocasionó en los diferentes tejidos y órganos, siendo el tejido epitelial, el tejido hematopoyético y el órgano linfoide, los más afectados por el WSSV en los diferentes tratamientos con silicio orgánico y el control (+), con lo cual queda claro que la presencia del silicio orgánico utilizado en las diferentes concentraciones y tiempos de exposición no favoreció el sistema inmune del organismo, sobre todo cuando fue utilizado en altas concentraciones.

A pesar de que existe una amplia diversidad de trabajos relacionados con WSSV, aún quedan muchas incógnitas por resolver con respecto a la forma en que este patógeno



interacciona con su huésped (camarón) y qué mecanismos de defensa podría utilizar el camarón para defenderse de la agresión. Por otra parte, varios autores (Song-Ling *et al.*, 1997; Chang-Fang *et al.* 1999; Itami, *et al.* 1999; Chang-Fang *et al.*, 2003) han reportado un alto porcentaje de sobrevivencia de *L. vannamei* ante la infección cuando han sido inmunoestimulados, mientras que otros autores (Chou-Ying *et al.*, 1995; Chou-Hsiung *et al.*, 1998; Kanchamaphum *et al.*, 1998; Lin-Nan *et al.*, 1998) no han podido obtener resultados favorables en este aspecto, como fue el presente estudio. Sin embargo, por ser éste uno de los primeros estudios realizados donde se aplicó silicio orgánico con la finalidad de aumentar el porcentaje de supervivencia en *L. vannamei* ante una infección por WSSV, todavía quedan varios puntos que hay que tomar en consideración, como cuales serían los mecanismos de adhesión de este virus a las células del hospedero y cuales factores favorecerían su propagación a los tejidos preferidos del mismo, dado que existe el interés de continuar trabajando con este compuesto.

Jiravanichpaisal y Miyazaki, (1994), han reportado que el hepatopáncreas, las branquias, el corazón y el órgano linfoides, son sitios activos en la remoción de bacterias patógenas en *L. vannamei*, ya que éstos contienen células capaces de fagocitar dichas bacterias. La contribución de cada tejido u órgano para la remoción de bacterias depende de la cepa, dosis y ruta de entrada del patógeno. Por otra parte, Burgents *et al.* (2005), mencionan que el hepatopáncreas y branquias son un sitio importante para la acumulación de bacterias, siendo las branquias el primer sitio infectado por bacterias y más tarde los hemocitos atacan las bacterias con la posibilidad de formar nódulos y fagocitarlas. Los resultados histopatológicos obtenidos en el presente estudio, revelan

masas de bacterias en hepatopáncreas, tejido conectivo y necrosis en branquias (Figs. 23-26); estos datos coinciden con los observados por varios autores (Jiravanichpaisal y Miyazaki, 1994; Lavilla *et al.*, 1998; Ruangpan *et al.*, 1999; Burgents *et al.*, 2005). Sin embargo, hay que mencionar que el hecho de que no se hayan encontrado lesiones graves en las muestras puede ser consecuencia de que los organismos presentaban un estatus de salud favorable cuando fueron infectados, debido a que sobrevivieron a la infección del *V. harveyi*.

Varios autores (Chen-Chu *et al.*, 2004; Yeh-Tuen *et al.*, 2004; Hou-Ying y Chen-Chu, 2005) correlacionan la resistencia de *L. vannamei* ante vibriosis cuando los niveles de  $O_2^-$ , actividad fagocítica y CTH, son altos. Hou-Ying y Chen-Chu (2005) mencionan que un incremento de CTH, actividad fagocítica y producción de anión superóxido mejoró la inmunidad en *L. vannamei* y la resistencia ante *V. alginolyticus*, cuando éstos fueron inyectados con extracto de alga roja *Gracilaria tenuistipitada*; mientras que Cheng *et al.*, (2004) reportaron que una dosis con  $10 \mu\text{g g}^{-1}$ ,  $20 \mu\text{g g}^{-1}$  ó  $50 \mu\text{g g}^{-1}$  de alginato de sodio incrementan el CTH, actividad fagocítica y la producción de anión superóxido en *L. vannamei* y la resistencia ante *V. alginolyticus*. Por otra parte, Yeh-Tuen *et al.* (2004), reportaron una disminución en el CTH, actividad fagocítica y producción anión superóxido cuando *L. vananmei* fue expuesto a una concentración de  $\text{Cu}^{2+}$  de  $1 \text{ mg L}^{-1}$ , lo cual los hizo más susceptibles a la infección con *V. alginolyticus*. Ahora, tomando en cuenta la biología de la especie, Liu-Hung *et al.* (2005) reportaron que en estadio de intermuda *L. vannamei* presentó un incremento en el CTH, actividad fagocítica y anión superóxido, presentando además alta resistencia ante una infección con *V. alginolyticus*. Por lo tanto, es importante señalar que la evaluación de estos tres

parámetros inmunológicos: actividad fagocítica, CTH y producción de anión, pueden ser utilizados como un indicadores del estatus de salud de *L. vannamei*. Sin embargo, hay que mencionar que éstos organismos responden de diferente manera ante diferentes patógenos, y que dependiendo de las características de las células efectoras es que van a responder de manera favorable ante una agresión viral o vibriosis, ya que cada una de ellas cumple con una función específica, así como los tejidos y órganos de los cuales están compuestos.

El comportamiento de dos parámetros inmunológicos evaluados en el bioensayo de infección con *V. harveyi* del presente estudio coinciden con los reportados por Yeh-Tuen *et al.* (2004), por lo tanto, un bajo porcentaje de sobrevivencia en organismos de *L. vannamei* en este experimento, puede ser consecuencia de una disminución en el CTH y en la producción de anión superóxido, aún cuando en algunos tratamientos (10 y 50 mg/kg silicio orgánico) se haya observado un incremento en el CTH. Para comprender mejor este fenómeno, habría que hacer una diferenciación de hemocitos, debido a que cada uno de ellos juega un papel diferente ante la presencia de un patógeno (Montesdeoca *et al.* 2002; Molina *et al.* 2002; Maldonado-Villacencio, 2003).

## 9. CONCLUSIONES.

De acuerdo a los resultados del presente estudio, el silicio orgánico aplicado por inmersión o por inclusión en la dieta mostró un efecto inmunomodulador sobre la respuesta inmune en juveniles de *Litopenaeus vannamei* en términos del CTH, actividad SOD de músculo y hepatopáncreas; así como actividad SOD en músculo y actividad CAT en músculo y hepatopáncreas respectivamente, ya que estos indicadores se vieron modificados de manera importante. En base a lo anterior la primera hipótesis planteada se acepta.

Considerando que después de suspender la aplicación del silicio orgánico por inclusión en la dieta aumenta el CTH respecto al control y la actividad SOD en hemocitos de juveniles tratados con silicio orgánico por inmersión e infectados con *V. harveyi*, presentó un incremento a las 24, 72 y 120 h, los resultados nos sugieren que el silicio orgánico puede estar actuando como un agente inmunosupresor en juveniles de *L. vannamei*.

La aplicación de silicio orgánico a concentraciones de 1, 10 y 100 mg/L por inmersión no disminuyó significativamente la mortalidad de organismos infectados con WSSV, ni cuando fue aplicado a concentraciones de 1 y 10 mg/L por inmersión ó 50 mg/kg en la dieta ante infecciones con *V. harveyi*. Por lo tanto, la segunda hipótesis se rechaza ya que a estas concentraciones el silicio orgánico no puede ser utilizado como medida profiláctica ante este tipo de infecciones. Aún, cuando el silicio orgánico aplicado por inmersión a 1 mg/L disminuyó en un 10% la mortalidad de juveniles *L. vannamei* infectados experimentalmente con WSSV.

## 10. RECOMENDACIONES.

Por ser éste uno de los primeros estudios realizados en especies marinas arroja datos interesantes, y de acuerdo a éstos se sugiere que se sigan realizando más bioensayos modificando las concentraciones y tiempo exposición al silicio orgánico y determinar otros parámetros inmunológicos, además de los determinados en el presente trabajo, con la finalidad de poder sustentar la efectividad de dicho compuesto para mejorar el sistema inmune del camarón.

1. Se recomienda la aplicación del silicio orgánico por inmersión a concentraciones  $\leq 1$  mg/L.
2. Hacer estudios que nos permitan definir cuales son las vías de transporte del silicio orgánico a nivel celular, realizar expresión diferencial de genes y verificar si éste es asimilado por el organismos y si es retenido en algún órgano o tejido.
3. Realizar bioensayos empleando diferentes concentraciones de silicio orgánico y tiempo de exposición por inmersión con su posterior reto con WSSV por ingestión y monitorear la carga viral de los organismos.
4. Hacer estudios encaminados a determinar cuál es el efecto del silicio orgánico sobre los mecanismos de infestación y replicación viral.
5. Evaluar los parámetros inmunológicos donde se confirmó el efecto del silicio orgánico y otros que no se determinaron que pudieran dar un indicativo del statu de salud del organismo.
6. Hacer un análisis histológico profundo en tejidos y órganos de organismos expuesto a silicio orgánico.

7. Establecer los valores (rangos) normales de los diversos indicadores de la respuesta inmune (CTH, SOD, CAT, etc.) en poblaciones sanas del camarón *L. vannamei*, a fin de poder identificar cuando se presentan anomalías en el sistema inmune del organismo.
8. Realizar los retos microbianos con un mayor número de réplicas y con organismos en diferentes estadios de desarrollo (peso).

## 11. BIBLIOGRAFÍA.

- Aebi, H. E. 1985. Catalase. In: Bergmeyer H. U (ed.). *Methods of Enzymatic Analysis*, Vol. VII. Weinheim: Verlag Chemie. p.p. 273-286.
- Aguirre-Guzmán, G. y Ascencio-Valle, F. 1999. Probióticos. Una herramienta alternativa para los acuicultores. *Enfoque Acuícola*. p.p. 1-6.
- 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.
- Alday-Sanz V., Roque A. & Turnbull J. F. 2002. Clearance mechanisms of *Vibrio vulnificus* biotype I in the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Dis. of Aquat. Org.* 48, 91-99.
- AOAC 1995. *Official Methods of Analysis of the Association of Analytical Chemist*. 16 Edition. Arlington, Virginia, USA. p.p.935.
- Arun, S., Subramanian, P., 1998. Antioxidant enzymes in freshwater prawn *Macrobrachium malcolmsonii* during embryonic and larval development. *Comp. Biochem. Physiol.* B121, 273– 277.
- Arun, S., Thirumurugan, R., Visakan, R., Balamurugan, S., Arunachalam, V., Subramanian, P., 2003. Optimal analytical conditions for catalase in fresh water prawn, *Macrobrachium malcolmsonii*. *Biotech. Histochem.* 78, 1 – 4.
- Asahi, M., J. Fuji, K. Suzuki, H. Gruk Seo, T. Kuzuya, M. Hori, M. Tada, S. Fujii & N. Taniguchi. 1995. Inactivation of Glutathione Peroxidase by Nitric Oxide. *J. Biol. Chem.* 270(4): 21035-21039.
- Aubert, J.P. y Magolon, G.J. *Chir.* 1993. Gel elástico y elastómero en la cicatrización de heridas en conejos. *París.* 130(12): 533-8.
- Audelo, J., Montiel, F., 2005. Impacto económico de la presencia de TSV y WSSV en los cultivos de camarón del norte del estado de Sinaloa, México. Programa Nacional de Sanidad Acuícola y la Red de Diagnóstico. Vol. III No. 31. pp.12.
- Audelo, J. Díaz, M. G., Peinado, M. I. y Montiel, F. 2006. Programa de “Supervisión sanitaria en sistemas de producción de camarones pendidos en el municipio de Ahome, Sinaloa”. Programa Nacional de Sanidad Acuícola y la Red de Diagnóstico. Vol. 1 No. 33.
- Bachére, E. 2000. Shrimp immunity and disease control. *Aquaculture*: 191, 3-11.
- Baticados M.C.L., Lavilla-Pitogo C.R., Cruz-Lacierda E.R., de la Pena L.D., Sunaz NA 1990. Studies on the chemical control of luminous *bacteria V. harveyi and V.*

*splendidus* isolated from diseased *P. monodon* larvae and rearing water. *Dis Aquat Org* 9:133–139.

Baumann P, Baumann L, Mandel M. 1971. Taxonomy of marine bacteria: the genus *Beneckeia*. *J Bacteriol.* 107:268–294.

Bayne, Ch. J. 2003. Origins and Evolutionary Relationships Between the innate and Adaptative Arms of Immune Systems. *Integrative Comparative Biology.* 43: 293-299.

Beauchamp, C. and Fridovich, I. 1971. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.* 44:276-286.

Becker, J.C., Jinossy, A.G.S., 1979. Silicon in the blood vessel wall: a biological entity? *Micron.* 10: 267-72.

Berger, C. 2000. Aportes de la Bio-tecnología a la alimentación y a la inmunoestimulación de camarones penaeidos. Asociación Langostina Peruana (ALPE). p.p. 102-110.

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.* 72:248-254.

Brito P.R. 2001. Fisiología y bioquímica de la nutrición de postlarvas tempranas de los camarones blancos (*Litopenaeus setiferus* (Linnaeus,1767) y *Litopenaeus vannamei* Boone, 1931. Tesis Doctor en Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. 57p.

Burgents, E. J., Burnett, E. L., Stabb, V.E., y Burnett, K.G. 2005. Localization and bacteriostasis of *Vibrio* introduced into the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Dev. Comp. Immunol.* 29. 681-691.

Campa-Córdova, A. I., Hernández-Saavedra, N. Y., De Philippis, R., and Ascencio-Valle, 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 sulphated polysaccharide. *Fish & Shellfish Immunol.* 12, 353-366.

Campa-Córdova, A.I. 2002. Determinación de moléculas que intervienen en el sistema inmune del camarón blanco (*Penaeus vannamei*) en respuesta al uso de inmunoestimulantes. Tesis Doctorado. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR). México. 45 pp.

Campa-Córdova, A.I., Hernández-Saavedra, N., Aguirre-Guzmán, G., Ascencio-Valle, F., 2005. Immunomodulatory response of superoxide dismutase in juveniles American white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) exposed to immunostimulants. *Ciencias Marinas*, 31(4): 661-669.



Carlisle, E.M., Curran M.J., 1987. Effect of interrelationships between silicon, aluminium, levels in rat brain. *Alzheimer Dis. Assoc. Disorders*. 1: 83-9.

Carlisle, Edith M. 1974. El silicio es un elemento esencial. *Ciencia medioambiental y nutricional, escuela de salud pública, Universidad de California, Los Angeles* Nuevo Candidatos a la lista de elementos esenciales. *Federación proceeding*. Volumen 33. Número 6.

Chang C.F., Chen-Yung, H., Su-Se, M. & Liao-Chiu, C. 2003. Dietary  $\beta$ -1,3- glucan effectively improves immunity and survival of *Penaeus monodon* challenged with white spot syndrome virus. *Fish & Immunol*. 15 (297-310).

Chang-Fang, C., Su-Se, M., Chen-Chu, F. Lo-Fang, C. and Liao-Chiu, I. 1999. Effect of dietary  $\beta$ - 1,3-glucan on resistance to white spot syndrome virus (WSSV) in postlarval and juvenil *Penaeus monodon*. *Dis of Aquat Org*. 36,163-168.

Chang-Shiang, P., Lo-Fang, C., Wang, Y. C. and Kou-Hsiung, G. 1996. Identification of white spot associated baculovirus (WSBV) target organs in the shrimp *Penaeus monodon* by *in situ* hybridization. *Dis. Aquat. Org*. 27: 131- 139.

Chen, D. and Ainsworth A.J. 1992. Glucan administration potentiates immune defence mechanisms of channel catfish, *Ictalurus punctatus* Rafinesque. *J. Fish Dis*. 15:295-304.

Cheng, W., Chen-Chu, J., Liu-Hung, C., Kuo-Ming, C. 2005. Dietary administration of sodium alginate enhances the immune ability of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. *Fish & Immunol*. 18 (1-12).

Cheng, W., Liu-Hung, C., Yeh-Tuen, S., Chen-Chu, J. 2004. The immune stimulatory effect of sodium alginate on the white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. *Fish & Immunol*. 17 (41-51).

Chew, B. P. 1995. Antioxidant vitamin affect food animal immunity and health. *J. Nutr*. 125: 1804S-1808S.

Chou-Hsiung, G., Y., Huang, C. Y., Lo-Fang, C. and Kou-Hsiung, G. 1998. Studies on transmission of white spot syndrome associated baculovirus (WSBV) en *Penaeus monodon* and *P. japonicus* via waterborne contact and oral ingestion. *Aquaculture*. 164: 263-276.

Chou-Ying, H., Huang CY, Wang-Hsiung, C., Chiang HC, Lo-Fang, C. 1995. Pathogenicity of a baculovirus infection causing white spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Taiwan. *Dis. Aquat. Org*. 23: 165-173.

Clark, S.G., Holt, F.P. y Went, C.W. 1975. *Trans. Faraday Soc*. 53, 1500.

Corbel, V., Z. Zuprizal, C. Shi, H. Sumartono, J. M. Arcier, and J.R. Bonami. 2001. Experimental infection European crustaceans with white spot syndrome virus (WSSV). *J. Fish Dis*. 24:377-382.

- Dandapat, J., Chainy, G.B.N. y Rao, K.J. 2000. Dietary vitamin-E modulates antioxidant defence system in giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. Comp. Biochem. Physiol. 127C: 101-115.
- Das, S., Yadav, D., Narang, R. and Das, N. 2002. Interrelationship between lipid peroxidation, ascorbic acid and superoxide dismutase in coronary artery disease. Current Science 83, 488-491.
- De la Rosa-Vélez, J. 2001. Virus de la mancha blanca (WSSV) y cabeza amarilla (YHV), dos amenazas potenciales a los cultivos camaronícolas en México. Panorama Acuícola 6, 18-19.
- Destomieux, D., M., Muñoz, C., Cosseau, J., Rodriguez, P., Bulet, M. Penaeidins, antimicrobial peptides with chitin-binding activity, are produced and stored in shrimp granulocytes and released after microbial challenge. J Cell Sci. 113, 461-469.
- 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.
- Durand, S., D. Lightner, R.M. Redman, and J.R. Bonami. 1997. Ultrastructure and morphogenesis of White Spot Syndrome Baculovirus (WSSV). Dis Aquat Org. 29,205-211.
- Echeverría, F., V. Otero, F. Cornejo, and J. Rodríguez. 2002. WSSV y ciclo de muda en el camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. El Mundo Acuícola. 8 (1), 43-46.
- Ellis, R. J. 1996. Stress proteins as molecular chaperones. In: *Stress Proteins in Medicine*, Van Eden, W., and D. B. Young (eds.) New York, N. Y.: Marcel Dekker, Inc. New York.
- Flegel, T.W. 1997. Special topic review, major viral diseases of the black tiger prawn *Penaeus monodon* in Thailand. World J Microb Biot. 13, 433- 442.
- Fridovich I. 1989. Superoxide dismutase an adaptation to a paramagnetic gas. J. Biol Chem; 264: 7761-4.
- Fridovich, I. 1995. Superoxide radical and superoxide dismutases. Annual Review of Biochemistry. 64, 97-112.
- Fujita, T., Endo, Y., Nonaka, M. 2004. Primitive complement system: recognition and activation. Mol. Immunol. 41: 103-111.
- García, M.X., Foote, C., Van, S.E., Devreotes, P., Alexander, S., Alexander, H., 2000. Differential development expression and cell type specificity of *Dictyostelium catalases* and their response to oxidative stress and UV-light. Biochim. Biophys. Acta 1492, 295-310.

- Garrigues, D. and Arevalo, G. 1995. An evaluation of the production and use of a live bacterial isolate to manipulate the microbial flora in the commercial production of *Penaeus vannamei* postlarvae in Ecuador. J. world Aquacult Soc. p.p 53-59.
- Gatesoupe, F.J. 2000. Uso de Probióticos en Acuicultura. Avances en Nutrición Acuícola IV. Memorias del IV Simposium Internacional de Nutrición Acuícola, México. P.p. 463-472.
- Gillman, G.P., Burkett, D.D., y Coventry, R.J. 2002. Amending highly weathered soils with finely ground basalt rock. Appl Geochem. 17. 987-1001.
- Goarant, C., Herlin, J., Brizard, R., Marteau-Laure, A., Martin, C. & Martin, B. 2000. Toxic factors of *Vibrio* strains pathogenic to shrimp. Dis Aquat Org 40, 101–107.
- Gómez-Anduro, G. A., Yepiz-Plascencia, G., Barillas-Mury, C.V., Peregrino-Urriarte, A. B., Gupta, L., Gollán-Galván, T. y Hernández-López, J. 2006. The cytosolic manganese superoxide dismutase from the shrimp *Litopenaeus vannamei*: Molecular cloning and expression. Dev. Comp. Immunol.
- Goytortúa-Bores, E. 2000. Evaluación del valor nutricional de un extracto lipídico y un concentrado proteico de langostilla (*Pleuroncodes planipes*) para camarón blanco *L. vannamei*. Tesis Maestría en Ciencias Pecuarias, Universidad de Colima. P.p. 3-88.
- Granja, B. C., Aranguren, F.L., Vidal, M.O., Aragón, L. and Salazar, M. 2003. Does hyperthermia increase apoptosis in white spot syndrome virus (WSSV)-infected *Litopenaeus vannamei*. Dis Aquat Org. 54, 73-78.
- Griswold, C., Mathews, A.L., Bewly, K.E., Mahaffey, J.M., 1993. Molecular characterization and rescue of acatalasemic mutants of *Drosophila melanogaster*. Genetics. 134, 781– 788.
- Gross, P.S., Bartlett, T.C., Browdy, C.L., Chapman, R.W., Warr, G.W. 2001. Immune gene discovery by expressed sequence tag analysis of hemocytes and hepatopancreas in the Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*, and the Atlantic White Shrimp, *L. setiferus*. Dev. Comp. Immunol. 25: 565-577.
- Guillan-Klanian, M. 2001. Estudios de las cualidades inmunoestimulantes de nuevas bacterias prebióticas asociadas al cultivo de *Penaeus vannamei*. Tesis de Maestría. Escuela Superior Politécnica Del Litoral. Guayaquil, Ecuador. P.p. 69.
- Hameed-Sahual, A.S. Yogandhan, K., Sathish, S. Rasheed, M., Murugan, V. and Jayaman, K. 2001. White spot syndrome virus (WSSV) in two species of freshwater crabs (*Paratelphusa hydrodomous* and *P. pulvinata*). Aquaculture 201, 179-186.
- Hameed-Sahul, A.S., Charles MX, Anilkumar M 2000. Tolerance of *Macrobrachium rosenbergii* to white spot syndrome virus. Aquaculture 183.

Henning O, Itami T., Maeda M., Kondo M., Natsukari Y., Takahashi Y. 1998. Analyses of hemolymph immunoparameters in kuruma shrimp infected with penaeid rod-shaped DNA virus. *Fish Pathol.* 33 (4): 389-393.

Hoffman, J. y Hikima, J., Rojtinnakorn, J., Hirono, I., Auki, T. 2002. *Drosophila* innate immunity: an evolutionary perspective. *Nature.* 5(2): 121-126.

Holmblad, T., and K. Söderhäll. 1999. Cell adhesion molecules and antioxidative enzymes in a crustacean, possible role in immunity. *Aquaculture* 172, 111-123.

Hose-Ellen, J., Martín-Gary, G., Tiu-Sam y McKrell, N., 1992. Patterns of Hemocyte Production and Release Throughout the Molt Cycle in the Penaeid Shrimp *Sicyona ingentis*. *Bioll. Bull.* 183: 185-199.

Hou-Ying, W. y Chen-Chu, J. 2005. The immunostimulatory effect of hos-water extract of *Gracilaria tenuistipitata* on the white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. *Fish & Shellfish Immunol.* 19. 127-138.

Howard, D. W. y Smith, C. S. 1983. Histological techniques for marine bivalve mollusks. National Oceanic and Atmospheric Administration. Technical Memorandum NMFS-F/NEC-25. U.S. Department of Commerce. 95 pp.

Humason, L. G. 1979. *Animal Tissue Techniques*. San Francisco: W.H. Freeman and Company (ed.). Cuarta Edición Edición. 661 pp.

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.

Jiravanichpaisal P., Miyazaki T., Limsuwan C. 1994. Histopathology, Biochemistry, and Pathogenicity of *Vibrio harveyi* Infecting Black Tiger Prawn *Penaeus monodon*. *J. Aquat. Anim. Health* 6:27–35.

Jiravanichpaisal, P. Söderhäll, K., y Söderhäll I. 2004. Effect of water temperature on the immune response and infectivity pattern of white spot syndrome virus (WSSV) in freshwater crayfish. *Fish & Shellfish Immunol.* 17 265-275.

Jiravanichpaisal, P., E. Bangyeekhun, K. Söderhäll, y I. Söderhäll. 2001. Experimental infection of white spot syndrome virus in freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *Dis. Aquat. Org.* 47:151-157.

Johansson, M. y K. Söderhäll 1989 Cellular Immunity in Crustaceans and the proPO System. Reprinted from *Parasitology Today.* 5(6): 171-176 11.

Johansson, M., Keyser, P., Sritunyalucksana, K & Söderhäll, K. 2000. Crustacean haemocytes and haematopoiesis. *Aquaculture,* 191: 45-52.

Johansson, M.W., Holmblad, T., Thörnqvist, P.O., Cammarata, M., Parrinello, N., Söderhäll, K., 1999. A cell-surface superoxide dismutase is a binding protein for peroxinectin, a cell-adhesive peroxidase in crayfish. *J. Cell. Sci.* 112, 917–925.

Jorgensen, J.B., Lunde, H. and Robertsen, B. 1993. Peritoneal and head kidney cell response to intraperitoneally injected levadura glucan in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *J. Fish Dis.*, 16:313-325.

Jory D.E., and Dixon H.M. 1999. Shrimp White Spot Virus in the Western Hemisphere. *Aquaculture Magazine* 25, 83-91.

Junqueira, L.C. 1988. *Histología básica*. Salvat. 3ª Edición. México, 3-6 pp.

Kanchanaphum, P., C. Wongteerasupaya, N. Sitidilokratana, V. Boonsaeng, S. Panyim, A. Tassanakajon, B. Withyachumnarnkul, and T.W. Flegel. 1998. Experimental transmission of white Spot Syndrome Virus WSSV from crabs to shrimp *Penaeus monodon*. *Dis. Aquat. Org.*, 34:1-7.

Karunasagar I., Pai R., Malathi G.R., Karunasagar I. 1994. Mass mortality of *Penaeus monodon* larvae due to antibiotic-resistant *Vibrio harveyi* infection. *Aquaculture* 128:203–209.

Kashiwagi, A., Kashiwagi, K., Takase, M., Hanada, H. Y Nukamura, M. 1997. Comparison of catalase in diploid and haploid *Rana rugosa* using heat and chemical inactivation techniques. *Comp Biochem Physiol. B:* 118(3):499-503.

Kimbrell, D. A. and, B. Beutler. 2001. The evolution and genetics of innate immunity. *Nat. Rev. Gen.* 2:256–267.

Kinnula, V. L., Crapo, J. D. and Raivio, K.O. 1995. Generation and disposal of reactive oxygen metabolites in the lung. *Laboratory Investment*. 73, 3-19.

Klotz, M.G., Klassen, G.R., Lowen, P.C., 1997. Phylogenetic relationships among prokaryotic and eukaryotic catalases. *Mol. Biol. Evol.* 14, 951–958.

Lavilla-Pitogo C.R., Baticados M.C.L., Cruz-Lacierda E.R., de la Pena EL 1990. Occurrence of luminous bacterial disease of *Penaeus monodon* larvae in the Philippines. *Aquaculture* 91:1–13.

Lavilla-Pitogo C.R., Leano E.M., Paner M.G. 1998. Mortalities of pond-cultured juvenile shrimp, *Penaeus monodon*, associated with dominance of luminescent vibrios in the rearing environment. *Aquaculture*; 164: 337-49.

Le Moullac, G. M., Le Groumellec, M., Ansquer, D., Froissard, S., Levy, P., y Aquacop. 1997. Hematological and phenoloxidas activity changes in the shrimp *Penaeus stylirostris* in relation with the moult cycle: protection against vibriosis. *Fish and Shellfish Immunol.*, 7: 227-234.

Le Moullac, G. y Haffner, P. 2000. Environmental factors affecting immune response in Crustacea. *Aquaculture*. 191: 121-131.

Lee-Kau, K., Chen-Ling Y., y Liu-Ping, C.1999. Hemostasis of Tiger *Penaeus monodon* Affected by *Vibrio harveyi*, Extracellular Products and a Toxic Cysteine Protease. *Blood Cell, Mol Dis*. 15:180-192.

Lee-Kau, K., Yu-Shiang, R., Chen, F.R., Yang, T.I. and Liu-Ping, C. 1996. Virulence of *Vibrio alginolyticus* isolated from diseased tiger prawn, *Penaeus monodon*. *Curr Microbiol*. 33: 229–232.

Leonard, K., Söderhäll, K. and Ratcliffe, N.A. 1985. Studies on prophenoloxidase and protease activity of *Blamerus craniifer* haemocytes. *Insect Biochem.*, 15: 803–810.

Lewin, J.C. (1962). *In* “Physiology and Biochemistry of Algae” (R.A. Lewin, ed.) Academia Pres, New York.

Lightner DV. 1996b. A Handbook of Shrimp Pathology and Diagnostics Procedure for Diseases of Cultured Penaeid Shrimp. Section 3: Viruses. J. World Aquaculture Soc. Baton Rouge, LA.

Lightner, D. V., Hasson, K.W., White, B. L. and Redman R. M. 1998. Experimental Infection of Western Hemisphere Penaeid Shrimp with Asian White Spot Syndrome Virus and Asian Yellow Head Virus. *Aquat. Anim. Health* 10, 271-281.

Lightner, D.V. 1996a. Handbook of Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Penaeid Shrimp. World Aquaculture Society, Baton Rouge, L.A. EE.UU.

Lightner, D.V. 1996b. Handbook of Shrimp Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Cultured Penaeid shrimp. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana. A.

Lightner, D.V. 1999. The penaeid shrimp viruses TSV, IHHNV, WSSV, and YHV: Current Status in the Americas, Available Diagnostic Methods, and Management Strategies. *Journal of Applied Aquaculture*. 9, no. 2. 27-52.

Lightner, D.V., Hasson, K.W., Redman, M. R., White, B.L. 1998. Experimental Infection of Western Hemisphere Penaeid Shrimp with Asian White Spot Syndrome Virus and Asian Yellow Head Virus. *Aquat. Anim. Health* 10, 271-281.

Lin-Nan, W. 1998. Studies on superoxide dismutasa from grass shrimp (*Penaeus monodon*): virus infected, purification and characterization. Master thesis. Institute of Marine Biotechnology, National Taiwan Ocean University, Keelung; (In Chinese with English).

Liu P-C, Lee-Kou, K., Yii K-C, Kou-Hsiung, G., Chen S-N 1996a. Isolation of *Vibrio harveyi* from diseased kuruma prawns *Penaeus japonicus*. *Current Microbiology* 33:129– 132.

- Liu-Chung, P., Lee-Kau, K., Chen S-N. 1996b. Pathogenicity of different isolates of *Vibrio harveyi* in tiger prawn, *Penaeus monodon*. Lett Appl Microbiol. 22:413–416.
- Liu-Chung, P., Lee-Kau, K. y Tu C-C, Chen S-N 1997. Purification and characterization of a cysteine protease produced by pathogenic luminous *Vibrio harveyi*. Curr Microbiol. 35:32–39.
- Liu-Hung, C., Chen-Chu, C., Yeh-Tuen, S., y Cheng-Yen, S. y 2004. The immune response of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio* infection in relation with the moult cycle. Fish & Shellfish Immunol. 16. 151-161.
- López, N., Cuzon, G., Gaxiola, G., Tabeada, G., Valenzuela, M., Pascual, C., Sánchez, A. y Rosas, C. 2003. Physiological, nutritional and immunological role of dietary  $\beta$ -1-3 glucan and ascorbic acid 2-monophosphate in *Litopenaeus vannamei* juveniles. Aquaculture 224:223-243.
- Lorenzon, S., Guarrini, S., Smith, V.J., Ferrero, E.A., 1999. Effect of LPS injection on circulating haemocytes in crustaceans in vivo. Fish Shellfish Immunol. 9, 31–50.
- Luna-González, A. 2003. Susceptibilidad de *Vibrio alginolyticus* y mecanismos de defensa de bivalvos. Tesis Doctorado. CIBNOR. México. 107 pp.
- Mackay, M., Bewley, G.C., 1989. The genetics of catalase in *Drosophila melanogaster*. Isolation and characterization of acatalasemic mutants. Genetics 122, 643– 652.
- Magallón-Servín, P. 2004. Evaluación de moléculas asociadas al sistema inmune, bajo condiciones agudas de hipoxia en camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, BOONE, 1931. Tesis Maestría. CIBNOR. México. 28 pp.
- Maldonado-Villavicencio, M. 2003. Respuesta inmunitaria de familias de *Litopenaeus vannamei* bajo condiciones de infección con WSSV y su efecto a la inmunoestimulación con  $\beta$  1,3 glucanos. Tesis de Maestría. Escuela Superior Politécnica del Litoral, Guayaquil. Ecuador. 122 pp.
- Malham, Sh., Lacoste, A., Gélébart, F., Cueff, A., Poulet, S. 2003. Evidence for a Direct link between stress and immunity in the Mollusc *Haliotis tuberculata*. J Exp Zool. 295A: 136-144.
- Mallon, E. B., Loosli, R., Schmid-Hempel, P. 2003. Specific versus non-specific immune defense in the bumblebee *Bombus terrestris* L. Evolution. 57: 1444-1447.
- Martin, G.G., J. Kay, D. Poole, and C. Poole. 1998. In vitro nodule formation in the ridgeback prawn, *Syciona ingentis*, and the american lobster, *Homarus americanus*. Invertebrate Zoology 117, 155-168.
- Molina, C., J. Rodríguez, J.I., Arango, F. Echeverría y Sotomayor, M. 2002. Efectos combinados de las vitaminas C y E dietéticas en la inmunorespuesta del juvenil

*Litopenaeus vannamei* antes y después de la suplementación con glucanos. El Mundo Acuícola 8(1), 29-33.

Momoyama K. H., Hiraoka, H., Nakano, K., Koube, K., Inouye and Oseko N. 1994. Mass mortalities of cultured kuruma shrimp, *Penaeus japonicus* in Japan in 1993: Histopathological study. Fish Pathol., 19:141-148.

Montesdeoca, M. 2001. Parámetros inmunitarios en camarones juveniles *Litopenaeus vannamei*, en piscinas camaroneras infectadas con White Spot Syndrome Virus 92 (WSSV). Tesis de grado, Universidad Técnica de Manabí, Escuela de Acuicultura, Puerto viejo, Ecuador.

Montesdeoca, M., Amano, Y., Echeverría, F., Betancour, I., Panchana, F., Sotomayor, M., Rodríguez, J. 2002. La respuesta inmunitaria celular del camarón *Litopenaeus vannamei* al WSSV y su utilizada en el control de la enfermedad en los estanques. El Mundo Acuícola. 8. 38-42.

Morales-Covarrubias, S. 2004. Enfermedades del camarón. Editorial Trillas S. A. de C.V. 1<sup>ra</sup> edición. México D.F. pp. 122.

Moss, S. M. (2002). Marine Shrimp Farming in the Western Hemisphere: Past Problems, Present Solutions, and Future Visions. *Reviews in Fisheries Science*. 10(3:4): 601-620.

Moss, S.M., Argue, B.J., Castille, F.L., Arce, S.M. and Lotz, J.M. 2001. Family survival of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* to Taura syndrome virus in field and laboratories challenges. Proceedings of the World Aquaculture 2001 Conference, Orlando, J. Word Aquacult. Soc. Baton Rouge, LA, USA.

Mourente, G., 1996. In vitro metabolism of 14C-polyunsaturated fatty acids in midgut gland and ovary cells from *Penaeus kerathurus* forskal at the beginning of sexual maturation. Comp. Biochem. Physiol. B115, 255–266.

Mourente, G., Díaz-Salvago, E., 1999. Characterization of antioxidant systems, oxidation status and lipids in brain of wild-caught size-class distributed *Aristeus antennatus* (Risso, 1816) Crustacea, Decapoda. Comp. Biochem. Physiol. B124, 405–416.

Muñoz, M., Cedeño, R., Rodríguez, J., Wil P.W. van der Knaap, Mialhe, E. y Bacheré, E. 2000. Measurement of reactive oxygen intermediate production in haemocytes of the penaeid shrimp, *Penaeus vannamei*. Aquaculture. 191: 89-107.

Muñoz, M., F. Vandenbulcke, D. Saulnier, E. and Bachère. 2002. Expression and distribution of penaeidin antimicrobial peptides are regulated by haemocyte reactions in microbial challenge shrimp. Eur J Biochem. 269, 2678- 2689.

Nacional Research Council (NRC). 1993. Nutrient Requirements of domestic animals, Nutrient Requirements of fish. National. Academic Press, Washington DC., 114pp.



Nappi, A. J., and Ottaviani, E. 2000. Cytotoxicity and cytotoxic molecules in invertebrates. *BioEssays* 22, 469-480.

Neves, C. A., Santos, E. A. & Bainy, A. C. D. 2000. Reduced superoxide dismutase activity in *Palaemonetes argentinus* (Decapoda, Palaemonidae), infected by *Probopyrus ringueleti* (Isopoda, Bopyridae). *Dis. Aquat. Org.* 39, 155–158.

Niyogi, S., Biswas, S., Sarker, S., Datta, A.G., 2001. Seasonal variation of antioxidant and biotransformation enzymes in barnacle, *Balanus balanoides*, and their relation with polyaromatic hydrocarbons. *Mar. Environ. Res.* 52, 13–26.

O'Brien CH, Sizemore RK. 1979. Distribution of the luminous bacterium *Beneckeia harveyi* in a semitropical estuarine environment. *Appl Environ Microb.* 38:928–933.

Orbea, A., Fahimi, H.D., Cajaraville, M.P., 2000. Immunolocalization of four antioxidant enzymes in digestive glands of mollusks and crustaceans and fish liver. *Histochem. Cell Biol.* 114, 393–404.

Otero, V. 2001. Evaluación de los  $\beta$ -glucanos como inmunoestimulantes del sistema de defensa del camarón blanco *Penaeus vannamei* (Boone,1931). Tesis de grado, Universidad Laica “Eloy Alfaro”, Manta, Ecuador.103 p.p.

Pacheco-Marges, M. 2004. Procesamiento de imágenes policromáticas como método de diagnóstico del virus del síndrome de la mancha blanca en camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*). Tesis de Maestría. CIAD. México. pp. 120.

Páez-Osuna F. Gracia, A., Flores –Verduzco, F., Lyle-Fritch, L.P., Alonso-Rodríguez, R., Roque, a., Ruiz Fernández, A. 2003. Shrimp aquaculture development and the environment in the Gulf of California ecoregion. *Mar Pollut Bull.* 46:806-815.

Parkes, T., Hilliker, A., Phillips, J., 1993. Genetic and biochemical analysis of glutathione-S-transferase in oxygen defense system of *Drosophila melanogaster*. *Genome* 36, 1007– 1014.

Parra-Terrazas S., G. A., Baca-Castillo, R., Carrillo-González, J., Kohashi-Shibata, A., Martínez-Garza y Trejo C. 2003. Comparación de tres métodos de análisis de silicio en el tejido foliar de pepino. TERRA.

Pascual, C., Suárez, A., Vargas-Albores, F., LeMoullac, G., Rosas, C. 2003. Haemolymph metabolic variable and immune response in *Litopenaeus setiferus* adult males: the effect of an extreme temperature. *Aquaculture.* 236: 431-450.

Peng-En, S., Lo-Fang C., Liu-Fu, K., Kou-Hsiung, G. 1998. The Transition from Pre-Patent to Patent Infection of White Spot Syndrome Virus (WSSV) in *Penaeus monodon* Triggered by Pereiopod Excision, *Fish Pathol.* 33:395-400.

- Perazzollo, L., Gargioni, R., Ogliari, P., Barraco, M. 2002. Evaluation of some hematoimmunological parameter in the shrimp *Farfantepenaeus paulensis* submitted to environmental and physiological stress. *Aquaculture*. 214: 19-33.
- Persson M., Cerenius L. & Söderhäll K. 1987. The influence of hemocyte number on the disease resistance of the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus* Dana, to the parasitic fungus *Aphanomyces astaci*, *J Fish Dis*. 10. 471-477.
- Pipe R.K., Porte C y Livingstone D.R. 1993. Antioxidant Enzymes Associated with the Blood Cells and Haemolymph of the Mussel *Mytilus edulis*. *Fish y Shellfish Immunol*. 3: 221.
- Pizzutto M, Hirst R.G. 1995. Classification of isolates of *Vibrio harveyi* virulent to *Penaeus monodon* larvae by protein profile analysis and M13 DNA fingerprinting. *Dis. Aquat. Org.* 21:61–68.
- Promwikorn, W., Kirirat, P., and Thaweethamseewee, P. 2004. Index of molt staging in the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 26 (5): 765-772.
- Radi R, Turrens J. F., Chang L. Y., Bush K. M., Crapo J. D. and Freeman, B. A. 1991. Detection of catalase in rat heart mitochondria. *J Biol Chem.* 266, 22028-22034.
- Ramesh A, Nandakumar R, Venugopalan VK 1986. Enteric luminous microflora of the pond- cultured milk fish *Chanos chanos* (Forskål). *Microbial Ecol.* 12:231–235.
- Rendón, L., Balcázar, J. 2003. Inmunología de camarones: Conceptos básicos y recientes avances. *Revista AquaTIC*, nº 19.
- Ribault-Le, 2004. La salud y el silicio orgánico Gráficas Calvo, Avilés (Asturias).
- Ribault-Le, L. 2005. Silicio Orgánico de 5ª Generación. Francisco San Martín, Discovery De Salud nº 74, Madrid.
- Riley, J., y Chester, R., 1989. Introducción a la Química Marina. 1ª Edición. Editorial AGT EDITOR, S.A. México, D.F.
- Roch, P. 1999. Defense mechanisms and disease prevention in farmed marine invertebrates. *Aquaculture* 172, 125-145.
- Rodríguez, J. 2004. Inmunoestimulación temprana de camarón *Litopenaeus vannamei* para inducir un mejor desarrollo del sistema inmune y resistencia al (WSSV). *Boletín Informativo No. 99. CENAIM*.
- Rodríguez, J. y Le Moullac, G. 2000. State of art f immunological tools and health control of penaeid shrimp. *Aquaculture* 191: 109-119.

Rodríguez, J., 2004. Determinación del comportamiento hemocitario en los tejidos de *Litopenaeus vannamei*, inmunoestimulados desde la fase larvaria y desafiados con WSSV. Boletín Informativo No. 102. CENAIME.

Rodríguez, J., Bayo, B., Amano Y., Panchana F., Blas I., Alday, V., and Calderón, J. 2003. White spot syndrome virus infection in cultured *Penaeus vannamei* (Boone) in Ecuador with emphasis on histopathology and ultrastructure. Journal of Fish Diseases. 26: 439-450.

Rodríguez, J., V. Boulo, E. Mialhe, and E. Bachere. 1995. Characterisation of shrimp haemocytes and plasma components by monoclonal antibodies. Journal of Cell Science 108.

Rodríguez, F.Á., Benhamou, N., Datnoff, L.E., Jones, J.B., and Bélanger, R.R. 2003. Ultrastructural and Cytichemical Aspects of Silicon-Mediated Rice Blast Resistance. Biochem Cell Biol. 93. 535-545.

Rorstad, G., Aasjord, P.M. and Robertsen, B. 1993. Adjuvant effect of a levadura glucan in vaccines against furunculosis in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Fish & Shellfish Immunol., 3: 179-190.

Rosenberry, B. 2005. Article: Shrimp Farming in Mexico. World Shrimp Farming. Pág. 15-20.

Ruby EG, Morin J.G. 1979. Luminous enteric bacteria of marine fish: a study of their distribution, densities and dispersion. Appl Environ Microb 38:406-411.

Ryan, N.A., y Karp, R.D. 1993. Stimulation of hemocyte proliferation in the american cockroach (*Periplaneta americana*) by injection of *Enterobacter cloacae*. J. Insect Physiol. 39(7): 601-608.

Salinas, A. (1999). Instituto Nacional de la Pesca y de Acuicultura. Panorama Acuícola 4, 26 p.

Salinas, A. (2001). Camaronicultura en México, una industria de fuerzas opuestas. Panorama Acuícola 6, 18 p.

Salinas, A. (2002). Curso de comercialización de camarón. Panorama Acuícola 7, 32-34.

Salt, G. (1963). The defense reactions of insects of metazoan parasites. Parasitology 53, 527-642.

Sánchez, A., Pascual, C., Sánchez, A., Vargas-Albores, F., LeMoullac, C. 2001. Hemolymph metabolic variables and immune response in *Litopenaeus setiferus* adult males: the effect of acclimation. Aquaculture. 198: 13-28.

Scholz, U., García-Díaz, G., Ricque, D., Cruz Suarez, L.E., Vargas –Albores, F. y Latchford, J. 1999. Enhancement of vibriosis resistance in juvenile *Penaeus vannamei* (Boone) by supplementation of diets with different yeas products. *Aquaculture*. 176: 271-283.

Sequeira, T., Tavarest, D., y Arala-Chaves, M. 1996. Evidence for circulating hemocyte proliferation in the shrimp *Penaeus japonicus*. *Dev. Comp. Immunol.* 20 (2): 97-104.

Sheehan, D. y Hrapchak, B. B. 1973. *Theory and practice of Histotechnology*. London: Mosby Company. 481 pp.

Smith, V.J., Söderhäll, J., 1986. Cellular immune mechanisms in the crustacean. In: Lackie, A.M. (Ed), *Immune Mechanisms in Invertebrate Vectors*, Zoological Society of London Symposia, vol. 56. Oxford Science Publications, pp. 59-79.

Söderhäll K, Cerenius L. 1992. Crustacean immunity. *Ann Rev of Fish Diseases*. 1:3-23.

Song-Ling, Y. and Hsieh-Ting, Y. 1994. Immunostimulation of tiger shrimp (*Penaeus monodon*) hemocytes for generation of microbicidal substances: Analysis of reactive oxygen species. *Dev. Comp. Immunol.*, 18: 201–209.

Sotomayor, M.A. y Balcázar, J.L, 2003. Inhibición de vibrios patogenos de camarón por mezcla de cepas probióticas. *Revista AquaTIC No. 19*. P.p. 9-15.

Song-Ling, Y., y Lee SP. 1993. Characterization of ecological implication of luminous *Vibrio harveyi* isolated from tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Bulletin of Institute of Zoology Academia Sinica* 32:217–220.

Sonnenholzner S, Rodríguez J, Pérez F, Betancourt I, Echeverría F, Calderón J. 2002. Supervivencia y respuesta inmune de camarones juveniles *Litopenaeus vannamei* desafiados por vía oral a WSSV a diferentes temperaturas. *El Mundo Acuícola*. 8(1): 50-56.

Sritunyalucksana, K. y Söderhäll K. S. 2000. The proPO and clotting system in crustacean. *Aquaculture*. 191: 53-69.

Sudheesh, P. S. & Xu, H. S. 2001. Pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* in tiger prawn *Penaeus monodon* Fabricus: possible role of extracellular proteases. *Aquaculture* 196, 37–46.

Sugumaran, M. 1996. Roles of insect cuticle in Host Defense Reactions. In: Söderhäll K. Sadaaki, I. Vasta, G. (Eds.), *New Directions in Invertebrate Immunology*. SOS Publications, Fair Haven. pp. 355-374.

Sunaryanto, A. Mariam, A. 1986. Occurrence of a pathogenic bacteria causing luminescence in penaeid larvae in Indonesian hatcheries. *Bulletin of Brackishwater Aquaculture Developmental Center* 8:64–70.

Sung-Hung, H., H. C. Li, Tsai-Feng, M., Ting-Yuan, Y. and W. L. Chao 1999. Changes in the composition of *Vibrio* communities in pond water during tiger shrimp (*Penaeus monodon*) cultivation and in the hepatopancreas of healthy and diseased shrimp. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 236: 261-271.

Sung-Hung, H., Kou, Hsiung, G. and Song-Ling, Y. 1994. Vibriosis resistance induced by glucan treatment in tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Fish Pathol.*, 29: 11–17.

Takahashi, Y., Itami, T., Kondo, M., Maeda, M., Fujii, R., Tomonaga, S., Supamattaya, K. and Boonyaratpalin, S. 1994. Electron microscopic evidence of bacilliform virus infection in kuruma shrimp (*Penaeus japonicus*). *Fish Pathology* 29(2), 121-125.

Tapay L.M., Lu Y., Gose R.B., Brock J.A. & Loh P.C. 1997. Infection of whitw spot baculovirus (WSSV) in two species of penaeid shrimp *Penaeus stylirostris* (Stimpson) and *P. vannamei* (BOONE). In: *Diseases in Asian Aquaculture III* (ed. By T.W. Flegel & I.H. MacRae), pp. 297-302. Asian Fisheries Society, Fish Health Section, Manila, Philippines.

Tavares- Sánchez O. L., Gómez-Anduro, G. A., Felipe-Ortega, X., Islas-Osuna, M. A., Sotelo-Mundo, R. R, Barillas-Mury, C. y Yepiz-Plascencia, G. 2004. Catalase from the white shrimp *Penaeus (Litopenaeus vannamei)*: molecular cloning and protein detection. *Comp Biochem Physiol., Part B* xx.

Tsai-Feng, M., Kou-Hsiung, G., Liu-Chung, H., Liu-Fu, K., Chang-Fang, C., Peng-En, S., Hsu-Chen, H., Wang-Hsiung, C., y Lo-Fang, C. 1999. Long-term presence of white spot syndrome virus (WSSV) in a cultivated shrimp population without disease outbreaks. *Dis. Aquat. Org.* 38: 107-114.

Tsing, A., Arcier, J.M. y Brehelin, M. 1989. Hemocytes of penaeid and Palaemonid shrimps: morphology, cytochemistry, and haemograms. *J. Invert. Pathol.*, 53: 64-77.

Tsukamoto, K. K., Oyaizu, H., Nanba, K., and Simidu, U. 1993. Phylogenic relationship of marine bacteria, mainly members of the family *Vibrionaceae*, determined on the basis of 16S rRNA sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43, 8–19.

Unzueta-Bustamante, M,L. 2001. Distribución, incidencia y transmisión del virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV) en el cultivo de camarón blanco del pacifico (*Litopenaeus vannamei*) cultivado en el noroeste de México. Tesis de Doctorado. CICESE 86 pp.

Vargas-Albores F, Yepiz-Plascencia G 2000. Beta glucan binding protein and its role in shrimp immune response. *Aquaculture*; 191:13-21.

Vargas-Albores, F., Hernandez-Lopez, J., Gollas-Galvan,T., Montano-Perez, K., Jimenez-Vega, F. and Yepiz-Plascencia, G. 1998. Activation of shrimp cellular defense functions by microbial products. In *Flegel TW (ed) Advances in shrimp biotechnology. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology*, Bangkok, 26-30.

Vargas-Albores, F., Higuera-Ciapara, I., Jiménez-Vega, F., Hernández-López, J., Gollas-Galván, G. y Yepiz-Plascencia, G. 1996. Posibilidades de inmunoestimulación del camarón a través del alimento. Avances de Nutrición Acuícola III. Memorias del III Symposium Internacional de Nutrición Acuícola, México. Pp. 433-440.

Vidal, O.M., Granja, B.C. and Aranguren, F.L. 2001. A profound effect of hyperthermia on survival of *Litopenaeus vannamei* juveniles infected with White Spot Syndrome Virus. J World Aquacult Soc. 32(4), 364-372.

Vorbach, C., Harrison, R., Capecchi, M. 2003. Xanthine oxidoreductase is central to the evolution and function of the innate immune system. Trends in Immunology. 24 (2): 512-517.

Wang-Hsiung, C., Lo-Fang, C., Leu-Horng, J., Chou-Ming, C., Yeh P.Y., Chou-Hsiung., G., Tung M.C. Chang-Fang, C., Su-Se, M., Kou-Hsiung, G. 1995. Purification and genomic analysis of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) of *Penaeus monodon*. Dis. Aquat. Org. 3:239-242.

White, B.L., Schofield, P.J., Poulos, B.T., Lightner, D.V., 2002. A laboratory challenge method for estimating Taura syndrome virus resistance in selected lines of pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. J. WAS. 33 (3), 341-348.

Wu, G., Shad, D.M., 1995. Isolation and characterization of potato catalase cDNA. Plant Physiol. 108, 1748.

Wu, J.L., A. Namikoshi, T. Nishizawa, K. Mushiake, K. Teruya, and K. Muroga. 2001. Effects of shrimp density on transmission of penaeid acute viremia in *Penaeus japonicus* by cannibalism and the waterborne route. Dis. Aquat. Org. 47, 129-135.

Wu, L. 1999. Champlain J de Effects of superoxide on signalling pathways in smooth muscle cells from rats. Hypertension. 34. 1247-1253.

Yeh-Tuen, S., Liu-Hung, C., y Chen-Chun, J. 2004. Effect of copper sulphate on the immune response and susceptibility to *Vibrio alginolyticus* in the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Fish & Shellfish Immunol. 17. 437-446.

Yoa-Luan, C., Wang-Li, A. L., Wang-Na, W, y Sun-Yong, R. 2004. Purification and partial characterization of Mn superoxide dismutase from muscle tissue of the shrimp *Macrobrachium nipponense*. Aquaculture 241: 621-631.

Zhang-Feng, Z., Shao-Yu, Y., & Kang-Ho, K. 2005. Changes of enzyme activity and hematopoiesis in Chinese prawn *Fenneropenaeus chinensis* (Osbeck) induced by white spot syndrome virus and zymosan A. Aquac Res. 36. 674-681.

## 12. ANEXOS.

### **I. ELABORACIÓN DE GRADOS: WSSV (C.I), NECROSIS (picnosis y cariorrexis) y MASA DE BACTERIAS.**

Con las observaciones histológicas se elaboraron tres índices: dos índices patológicos (índice de WSSV y necrosis difusa (picnosis y cariorrexis)) y uno de respuesta inmunitaria (índice de infiltración hemocitaria).

Los grados de infección para WSSV (C.I.) fueron determinados según el número de células infectadas al recorrer 5 campos, de la siguiente manera: Grado 0 (0 células infectadas); Grado 1 (1-5 células infectadas); Grado 2 (5-15 células infectadas); Grado 3 (15-30 células infectadas) y grado 4 (>30 células infectadas).

Los grados establecidos para necrosis difusa (picnosis y cariorrexis) se determinaron por la presencia de grupos de células con picnosis-cariorrexis: Grado 0 (0 células con PK); Grado 1 (1-5 células con PK); Grado 2 (5-10 células con PK); Grado 3 (10-15 células con PK) y grado 4 (>15 células con PK).

Los grados de masa de bacterias fueron elaborados sobre la base del porcentaje en que estos procesos comprometieron los que fueron observados. Grado 0 (0% del tejido); Grado 1 (<25% del tejido comprometido); Grado 2 (25-50% del tejido comprometido); Grado 3 (50-75% del tejido comprometido) y Grado 4 (>75% del tejido comprometido).

Los grados establecidos para la infiltración hemocitaria fueron elaborados sobre la base del porcentaje en que estos procesos comprometieron los que fueron observados. Grado 0 (0% del tejido); Grado 1 (<25% del tejido comprometido); Grado 2 (25-50% del

tejido comprometido); Grado3 (50-75% del tejido comprometido) y Grado 4 (>75% del tejido comprometido).