



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Posgrado en Recursos Naturales

EVALUACIÓN DE ALIMENTO ENRIQUECIDO CON
Dunaliella sp. PARA INCREMENTAR LA RESISTENCIA DEL
CAMARÓN BLANCO (*Litopenaeus vannamei*) A
INFECCIONES EXPERIMENTALES POR *Vibrio*
parahaemolyticus

TESIS

Que para obtener el grado de:

Doctora en Ciencias

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

Presenta

DIANA MEDINA FÉLIX

La Paz, Baja California Sur, diciembre del 2018

ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 10:00 horas del día 8 del Mes de Noviembre del 2018, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

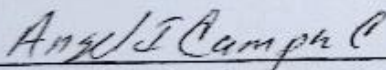
"EVALUACIÓN DE ALIMENTO ENRIQUECIDO CON *Dunaliella* sp. PARA INCREMENTAR LA RESISTENCIA DEL CAMARÓN BLANCO (*Litopenaeus vannamei*) A INFECCIONES EXPERIMENTALES POR *Vibrio parahaemolyticus*"

Presentada por el alumno: Diana Medina Félix

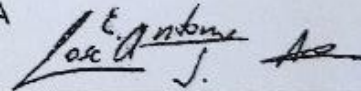
Aspirante al Grado de DOCTOR EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACIÓN EN: Acuacultura

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

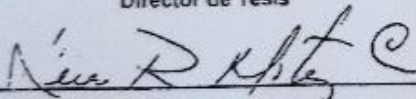
LA COMISIÓN REVISORA



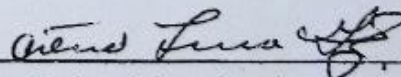
Dr. Ángel I. Campa Córdova
Director de Tesis



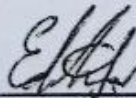
Dr. José A. López Elías
Director de Tesis



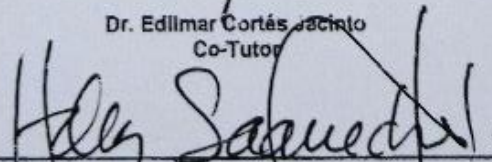
Dr. Luis R. Martínez Córdova
Co-Tutor



Dr. Antonio Luna Gonzales
Co-Tutor



Dr. Edllmar Cortés Jacinto
Co-Tutor



Dra. Norma Yolanda Hernández Saavedra,
Directora de Estudios de Posgrado y
Formación de Recursos Humanos

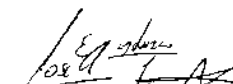
Resumen

Las bacterias del género *Vibrio*, se encuentran normalmente en los cultivos del camarón blanco del Pacífico, *Litopenaeus vannamei*, formando parte del medio natural. Los vibrios son patógenos oportunistas que proliferan de forma negativa en los cultivos cuando el sistema inmune del camarón se encuentra comprometido. En 2013, se presentaron en México pérdidas significativas en los cultivos por la presencia del síndrome de muerte temprana, ocasionado por *Vibrio parahaemolyticus*, haciendo difícil la recuperación para la agroindustria camarónícola. La microalga *Dunaliella* sp. es de importancia económica por la generación de compuestos bioactivos, entre ellos el β -caroteno, con función antioxidante. El objetivo de este trabajo fue evaluar la adición de harina de *Dunaliella* sp. al alimento de *L. vannamei* con el fin de reducir la mortalidad durante una infección con *V. parahaemolyticus*. *Dunaliella* sp. se cultivó en medio f/8 con una deficiencia en nitrógeno por un sistema de cultivo estático escalonado, posteriormente se liofilizó para la elaboración de las dietas. Se realizaron tres bioensayos, en el primer bioensayo se evaluaron las dosis de 1.5, 2, 2.5 y 3% de *Dunaliella* sp. en el alimento de *L. vannamei* con un peso inicial de 2.6 g; después de 20 días de alimentación se infectó con *V. parahaemolyticus* (1×10^6 UFC/mL). La dieta con el 3% *Dunaliella* sp. presentó la mayor supervivencia (30%), debido a la alta mortalidad, los niveles de glucosa, colesterol y triglicéridos, así como propenoxidasa y fenoxidasa no fueron indicadores del estado de salud de los organismos. En el segundo bioensayo, se evaluó la frecuencia de adición de *Dunaliella* sp. en el alimento, y debido a las altas mortalidades registradas en el primer bioensayo, se evaluaron dietas con el 1.5, 2 y 3% de *Dunaliella* sp. a tres frecuencias de administración: diaria, cada tres y siete días en organismos de 3.1 g. Se alimentó por 20 días, previo a la infección con *V. parahaemolyticus* (1×10^6 UFC/mL). Las dietas con 2% *Dunaliella* sp. suministrada cada tres y siete días presentaron mayor supervivencia después de la infección con *V. parahaemolyticus*. La dieta 2% de *Dunaliella* sp. suministrada cada tres y siete días, así como la dieta 3% suministrada cada tres días, mostraron una respuesta fisiológica e inmunológica positiva a la infección, se observó también una disminución en la oxidación de lípidos, ya que los niveles de triglicéridos aumentaron significativamente a las 48 hpi en las dietas con la microalga, debido a la acción antioxidante de *Dunaliella* sp. En el tercer bioensayo se evaluó la dieta con el 2% *Dunaliella* sp. y 1.1% de β -glucano, en camarones adultos (19.2 g), después de 15 días de alimentación, se infectó con *V. parahaemolyticus* (1×10^6 UFC/mL). La talla de los organismos sumado al efecto de *Dunaliella* sp. jugaron un papel importante para disminuir el impacto de *V. parahaemolyticus*, encontramos un incremento gradual en la concentración de colesterol en plasma de organismos alimentados con la microalga, y el efecto contrario en el control positivo. En cuanto a la expresión del gen SOD se reportaron diferencias significativas ($p < 0.05$) al día 7 en organismos alimentados con *Dunaliella* sp. y β -glucano y una expresión cuatro veces mayor que el control positivo a las 48 hpi. La adición de *Dunaliella* sp. en el alimento de *L. vannamei* presentó un efecto positivo en la supervivencia, respuesta fisiológica e inmune durante una infección con *V. parahaemolyticus*.

Palabras clave: *Dunaliella* sp., *Vibrio parahaemolyticus*, *Litopenaeus vannamei*, respuesta fisiológica, respuesta inmune.



Vo. Bo. Dr. Ángel Isidro Campa Córdova
Co-Director de Tesis

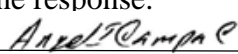


Vo. Bo. Dr. José Antonio López Elías
Co-Director de Tesis

Summary

Bacteria of the genus *Vibrio* are normally found in production of the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* cultures, a natural part of the environment since they are opportunistic pathogens, they proliferate negatively when the immune system of organisms is compromised. In the year 2013, there were significant shrimp crop losses in Mexico, due to the presence of early mortality syndrome caused by *Vibrio parahaemolyticus*, making it very difficult for the shrimp industry to recover. The microalgae *Dunaliella* sp. has economic importance for the production of bioactive compounds, including β -carotene, which has an antioxidant function. The aim of this work was to evaluate the addition of *Dunaliella* sp. flour in the feed of *L. vannamei* in order to reduce mortality during a *V. parahaemolyticus* infection. *Dunaliella* sp. was cultivated in f/8 medium with a deficiency in nitrogen levels in a staggered static culture system, then it was lyophilized for the preparation of diets. Three bioassays were carried out, in the first bioassay the doses of 1.5, 2, 2.5 and 3% of *Dunaliella* sp. were tested in the *L. vannamei* food with an initial weight of 2.6 g; after 20 days of feeding, organisms were infected with *V. parahaemolyticus* (1×10^6 CFU/mL). Diet with 3% *Dunaliella* sp. presented the highest survival (30%). Due to the high mortality, levels of glucose, cholesterol, and triglycerides, as well as prophenoloxidase and phenoloxidase were not good indicators of the physiologic and immune state of the organisms. In the second bioassay, it was sought to evaluate the frequency of administration of *Dunaliella* sp. in food, and due to the high mortalities recorded in the first bioassay, the diets were tested with 1.5, 2 and 3% of *Dunaliella* sp. with three administration frequencies: daily, every three and seven days in organisms with an initial weight of 3.1 g. Diets were administered 20 days prior to infection with *V. parahaemolyticus* (1×10^6 CFU/mL). Shrimp fed the 2% *Dunaliella* sp. diet every three and seven days showed increased survival after infection with *V. parahaemolyticus*. Diet with 2% *Dunaliella* sp. administered every three and seven days, as well as 3% *Dunaliella* sp. administered every three days, showed a positive physiological and immunological response to infection, a decrease in lipid oxidation was also observed, as triglyceride levels increased significantly at 48 hpi in all microalgae diets, due to the antioxidant action of *Dunaliella* sp. In the third bioassay, a diet with 2% *Dunaliella* sp. and diet with 1.1% β -glucan were evaluated, in adult organisms (19.2 g), after 15 days of feeding, treatments were infected with *V. parahaemolyticus* (1×10^6 CFU/mL). The size of the organisms added to the effect of *Dunaliella* sp. played an important role to diminish the impact of *V. parahaemolyticus*, we found a gradual increase in the concentration of cholesterol in plasma of organisms fed with the microalgae and the opposite effect in the positive control. Regarding the expression of the SOD gene, significant differences ($p < 0.05$) were reported at day 7 in organisms fed with *Dunaliella* sp. and β -glucan, as well as an expression four times greater than the positive control treatment at 48 hpi. The addition of *Dunaliella* sp. in the diet of *L. vannamei* had a positive effect on survival, physiological and immune response during infection with *V. parahaemolyticus*.

Key words: *Dunaliella* sp., *Vibrio parahaemolyticus*, *Litopenaeus vannamei*, physiological response, immune response.


Vo. Bo. Dr. Angel Isidro Campa Córdova
Co-Director de Tesis


Vo. Bo. Dr. José Antonio López Elías
Co-Director de Tesis

Dedicatoria

A mis padres, por su apoyo incondicional, este logro también es de ustedes.

A mis hijos Diego y Adrián, por motivarme a ser mejor cada día.

A mi Chávez, por sostenerme siempre.

Esto no sería posible sin ustedes,

Gracias.

Agradecimientos

Al CONACYT por la beca que otorgada para realizar mis estudios (número de beca 258171).

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S. C. por las facilidades otorgadas en la realización de mis estudios.

Al Dr. Ángel I. Campa, gracias por aceptarme como su alumna, por estar siempre en la mejor disposición de ayudar en mi formación y por las palabras de aliento en esos momentos difíciles.

A mi comité de Tesis, el Dr. Antonio Luna por darme un espacio y tiempo en su laboratorio, al Dr. Edilmar Cortes por sus palabras de aliento y tiempo brindado, y especialmente al Dr. Luis Martínez, gracias por el apoyo para la realización de este trabajo, pero sobre todo por la gran disposición y colaboración en mi preparación.

Al Laboratorio de Nutrición Acuícola en especial al M.C. Ernesto Goytortua Bores por su ayuda en la elaboración del alimento utilizado en este trabajo.

Al Laboratorio de Análisis Químico Proximal a María Dolores Rondero Astorga y Sindi Areli Juan Antúnez.

A la M.C. Nolberta Huerta, gracias por todas sus enseñanzas dentro y fuera del laboratorio, por la ayuda técnica fuera de horario y en días de descanso, pero sobre todo, muchas gracias por estar cuando la necesitaba.

A mis Biólogas: Ana, Damaris, Gissel, Karina y Soitza, gracias por estar al pendiente y por esos momentos tan agradables que compartimos, las quiero.

A mis compañeros de laboratorio del DICTUS: Diana F., Ana Lucia, Angélica, Perla, Norma, Carolina M., Jonathan, Emmanuel, Encinas, Iván y Maestro Álvaro por todas las fiestas compartidas y por el apoyo durante la fase experimental.

Un reconocimiento y agradecimiento muy especial a mi muy querido “Profe. Toño” Dr. Antonio López Elías, por haberme adoptado desde la licenciatura en Biología, por su apoyo incondicional dentro y fuera del laboratorio, porque siempre tiene las palabras correctas, por estar siempre pendiente de mí y de mi familia, pero sobre todo gracias por creer en mí.

Contenido

	Página
Resumen	i
Summary	ii
Dedicatoria	iii
Agradecimientos	iv
Lista de figuras	ix
Lista de tablas	xi
Abreviaturas	xii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	2
2.1 Cultivo del camarón blanco, <i>Litopenaeus vannamei</i>	2
2.2 Enfermedades del camarón.....	3
2.3 Síndrome de muerte temprana ocasionada por <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	3
2.4 Sistema inmune en crustáceos.....	6
2.5 Inmunoestimulantes en acuicultura	8
2.6 Antioxidantes en la inmunidad.....	10
2.7 β -caroteno producido por <i>Dunaliella</i> sp.	10
3. JUSTIFICACIÓN	13
4. HIPÓTESIS	14
5. OBJETIVO	14
5.1 Objetivos particulares.....	14
6. METODOLOGÍA	15
6.1 Diseño experimental	15
6.1.1 Bioensayo 1: Determinación de la dosis de <i>Dunaliella</i> sp. en la dieta, según respuesta fisiológica, inmune y supervivencia de <i>L. vannamei</i> durante una infección con <i>V. parahaemolyticus</i>	15
6.1.2 Bioensayo 2: Determinación de la frecuencia de administración de <i>Dunaliella</i> sp. en la dieta, según respuesta fisiológica, inmune y supervivencia de <i>L. vannamei</i> durante una infección con <i>V. parahaemolyticus</i>	16
6.1.3 Bioensayo 3: Evaluación de la respuesta fisiológica y expresión del gen Mn-SOD en <i>L. vannamei</i> alimentado con <i>Dunaliella</i> sp. y β -glucano durante una infección con <i>V. parahaemolyticus</i>	16
6.2 Cultivo de <i>Dunaliella</i> sp.	17
6.3 Determinación de β -carotenos en <i>Dunaliella</i> sp.....	20
6.4 Elaboración del alimento.....	20
6.5 Análisis proximal del alimento.....	24
6.5.1 Determinación de humedad.....	24
6.5.2 Determinación ceniza.....	24
6.5.3 Determinación de energía bruta.....	24
6.5.4 Determinación de proteína cruda.....	25
6.5.5 Determinación de lípidos.....	25

6.5.6	Determinación de fibra.....	25
6.6	Preparación del inóculo de <i>V. parahaemolyticus</i>	26
6.7	Anticoagulante de citrato trisódico.....	26
6.8	Obtención de hemolinfa.....	27
6.9	Conteo total de hemocitos.....	27
6.10	Análisis de parámetros plasmáticos en hemolinfa de <i>Litopenaeus vannamei</i> ...	28
6.11	Respuesta del sistema inmune.....	28
6.11.1	Actividad específica de Fenoloxidasa.....	28
6.11.2	Actividad específica de Profenoloxidasa.....	29
6.11.3	Actividad de superóxido dismutasa.....	29
6.12	Expresión de genes en PCR tiempo real (qPCR).....	30
6.13	Análisis estadístico.....	30
7.	RESULTADOS	31
7.1	Determinación de la dosis de <i>Dunaliella</i> sp. en la dieta, según respuesta fisiológica, inmune y supervivencia de <i>L. vannamei</i> durante una infección con <i>V. parahaemolyticus</i>	31
7.1.1	Análisis proximal del alimento.....	31
7.1.2	Supervivencia de <i>Litopenaeus vannamei</i> infectado con <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	32
7.1.3	Conteo de hemocitos.....	32
7.1.4	Proteína.....	33
7.1.5	Glucosa.....	33
7.1.6	Lactato.....	34
7.1.7	Colesterol	34
7.1.8	Triglicéridos	34
7.1.9	Profenoloxidasa y fenoloxidasa.....	37
7.2	Determinación de la frecuencia de administración de <i>Dunaliella</i> sp. en la dieta, según respuesta fisiológica, inmune y supervivencia de <i>L. vannamei</i> durante una infección con <i>V. parahaemolyticus</i>	38
7.2.1	Análisis proximal del alimento.....	38
7.2.2	Supervivencia de <i>L. vannamei</i> después de ser infectado con <i>V. parahaemolyticus</i>	39
7.2.3	Conteo de hemocitos.....	40
7.2.4	Proteína.....	40
7.2.5	Glucosa.....	41
7.2.6	Lactato.....	41
7.2.7	Colesterol	42
7.2.8	Triglicéridos.....	42
7.2.9	Profenoloxidasa.....	46
7.2.10	Fenoloxidasa.....	46
7.2.11	Superóxido dismutasa.....	46
7.3	Evaluación de la respuesta fisiológica y expresión del gen Mn-SOD en <i>L. vannamei</i> alimentado con <i>Dunaliella</i> sp. y β -glucano durante una infección con <i>V. parahaemolyticus</i>	49
7.3.1	Análisis proximal del alimento.....	49

7.3.2	Supervivencia de <i>Litopenaeus vannamei</i> infectado con <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	50
7.3.3	Conteo de hemocitos.....	50
7.3.4	Proteína.....	51
7.3.5	Glucosa.....	51
7.3.6	Lactato.....	52
7.3.7	Colesterol.....	52
7.3.8	Triglicéridos.....	52
7.3.9	Expresión relativa del gen Mn-SOD.....	55
8.	DISCUSIÓN	56
8.1	Concentración de β -carotenos en <i>Dunaliella</i> sp.	56
8.2	Supervivencia de <i>L. vannamei</i> infectado con <i>V. parahaemolyticus</i>	57
8.3	Conteos de hemocitos en hemolinfa de <i>L. vannamei</i>	59
8.4	Análisis de parámetros plasmáticos en hemolinfa de <i>L. vannamei</i>	60
8.4.1	Proteína.....	60
8.4.2	Glucosa.....	61
8.4.3	Lactato.....	62
8.4.4	Triglicéridos y colesterol.....	63
8.5	Sistema inmune.....	65
8.5.1	Profenoloxidasa y fenoloxidasa.....	65
8.5.2	Superóxido dismutasa.....	66
9.	CONCLUSIONES	67
10.	LITERATURA CITADA	69

Lista de figuras

Figura 1. Producción de camarón en México (toneladas). (Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca, 2013).....	3
Figura 2. Microalga <i>Dunaliella</i> sp. utilizada en este trabajo.....	12
Figura 3. Diseño del sistema de cultivo estático escalonado, utilizado para la producción de la microalga <i>Dunaliella</i> sp.....	18
Figura 4. Extracción de muestra de hemolinfa de <i>L. vannamei</i>	27
Figura 5. Supervivencia de juveniles de <i>L. vannamei</i> alimentados con <i>Dunaliella</i> sp. y retados con <i>V. parahaemolyticus</i> (1x10 ⁶ CFU/mL). Se indica el promedio ± DE.....	32
Figura 6. Conteo de hemocitos en juveniles de <i>L. vannamei</i> alimentado con <i>Dunaliella</i> sp. durante una infección con <i>V. parahaemolyticus</i> . Se indica el promedio ± DE.....	33
Figura 7. Niveles de proteína (A), glucosa (B), lactato (C), colesterol (D) y triglicéridos (E) en plasma de <i>L. vannamei</i> alimentado con <i>Dunaliella</i> sp. e infectado con <i>V. parahaemolyticus</i> . *diferencias significativas entre tratamientos (p<0.05). Se indica el promedio ± DE.....	36
Figura 8. Actividad específica de fenoloxidasa y profenoloxidasa en hemocitos de <i>L. vannamei</i> alimentado con <i>Dunaliella</i> sp. e infectado con <i>Vibrio parahaemolyticus</i> . Se indica el promedio ± DE.....	37
Figura 9. Supervivencia de <i>L. vannamei</i> alimentado con <i>Dunaliella</i> sp. (frecuencia de administración de cada una de las dietas con la microalga: diaria (1), cada tercer día (3) y cada séptimo día (7)) después de 48 h de infección con <i>V. parahaemolyticus</i> . *diferencias significativas entre tratamientos (p<0.05). Se indica el promedio ± DE.....	39
Figura 10. Conteo de hemocitos (cél/mL) en hemolinfa de <i>L. vannamei</i> alimentado con <i>Dunaliella</i> sp. durante una infección con <i>V. parahaemolyticus</i> . *diferencias significativas entre tratamientos (p<0.05). Se indica el promedio ± DE.....	40
Figura 11. Actividad de proteína (A), glucosa (B), lactato (C), colesterol (D) y triglicéridos (E) en plasma de <i>L. vannamei</i> alimentado con <i>Dunaliella</i> sp. durante una infección por <i>V. parahaemolyticus</i> en todas las dietas (frecuencia). *Diferencias significativas entre los tratamientos (p<0.05). Se indica el promedio ± DE.....	44
Figura 12. Diagrama de dispersión de los valores de lactato y glucosa (mg/mL) en plasma de <i>L. vannamei</i> alimentado con <i>Dunaliella</i> sp. e infectado con <i>V. parahaemolyticus</i> . A las 0 hpi (A) y 48 hpi (B). *Dieta 1.5% en rojo, dieta 2% en café, dieta 3% en verde, C+ en azul y C- en morado.....	45
Figura 13. Actividad específica de profenoloxidasa (A), fenoloxidasa (B) y superóxido dismutasa (C) en <i>L. vannamei</i> alimentado con <i>Dunaliella</i> sp. durante una infección por <i>V. parahaemolyticus</i> en todas las dietas (frecuencia). *Diferencias significativas entre los tratamientos (p<0.05). Se indica el promedio ± DE.....	48
Figura 14. Supervivencia de <i>Litopenaeus vannamei</i> después de 72 horas infectado con <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	50
Figura 15. Conteo de hemocitos en <i>L. vannamei</i> alimentado con 2% <i>Dunaliella</i> sp. y 1.1% de β-glucano cada tercer día, a los días 0 y 7, así como a las 24 y 48 hpi con <i>V. parahaemolyticus</i>	51

- Figura 16.** Valores de proteína, glucosa, lactato, colesterol y triglicéridos en plasma de *Litopenaeus vannamei* alimentado con 2% *Dunaliella* sp. y 1.1% β -glucano en la dieta e infectado con *Vibrio parahaemolyticus*.....54
- Figura 17.** Expresión relativa de genes superóxido dismutasa (Mn-SOD) en *L. vannamei* alimentado con 2% *Dunaliella* sp. y 1.1% de β -glucano en la dieta e infectado con *V. parahaemolyticus*. (Expresión se muestra como expresión normalizada con el gen endógeno 18S) *Diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$).....55

Lista de tablas

Tabla I. Principales enfermedades infecciosas en cultivos de camarón en México (Gómez-Gil <i>et al.</i> 2001; Bonett-Calzada, 2017).....	4
Tabla II. Soluciones madre para la preparación del medio de cultivo f/2 (Guillard y Ryther, 1962), utilizado como base para la preparación del medio f/8.....	19
Tabla III. Ingredientes que componen el alimento experimental adicionado con <i>Dunaliella</i> sp para el bioensayo 1.....	21
Tabla IV. Ingredientes que componen el alimento experimental adicionado con <i>Dunaliella</i> sp para el bioensayo 2.....	22
Tabla V. Ingredientes que componen el alimento experimental adicionado con <i>Dunaliella</i> sp. y β -glucano para el bioensayo 3.....	23
Tabla VI. Longitud de onda, coloración y tiempo de incubación de la reacción colorimétrica para evaluar la concentración de cada metabolito.....	28
Tabla VII. Análisis proximal de las dietas a diferentes porcentajes de <i>Dunaliella</i> sp. utilizadas en el bioensayo 1. (Se indica el promedio y DE).....	31
Tabla VIII. Análisis proximal de las dietas a diferentes porcentajes de <i>Dunaliella</i> sp. utilizadas en el bioensayo 2 (Se indica el promedio y DE).....	38
Tabla IX. Análisis proximal de las dietas a diferentes porcentajes de <i>Dunaliella</i> sp. utilizadas en el bioensayo 3 (Se indica el promedio y DE).....	49

Abreviaturas

AHPND	Acute hepatopancreatic necrosis disease
ARN	Ácido ribonucleico
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
EMS	Síndrome de mortalidad temprana
FO	Fenoloxidasa
hpi	Horas post infección
IHHNV	Necrosis infecciosa hipodérmica y hematopoyética
LPS	Lipopolisacárido
Mn-SOD	Superóxido dismutasa ligada a manganeso
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido
NADP	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NHP	Hepatopancreatitis necrotizante
NO	Óxido nítrico
OH	Radical hidroxilo
ONOO	Peroxinitrito
PAMP	Patrones moleculares asociados a patógenos
proFO	Profenoloxidasa
PRR	Proteína de reconocimiento de patrones
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
ROS	Especies reactivas del oxígeno
SOD	Superóxido dismutasa
TCBS	Agar tiosulfato citrato bilis sacarosa
TLR	Receptores tipo Toll
TSA	Agar tripticasa de soya
UFC	Unidades formadoras de colonia
ups	Unidades prácticas de salinidad
WSSV	Síndrome de mancha blanca

1. INTRODUCCIÓN

La camaronicultura es una actividad agroindustrial altamente rentable; con la gran demanda de camarón y la baja tasa en su pesquería, la atención se ha puesto en su cultivo. La presencia de agentes patógenos que afectaron los cultivos, dejó como consecuencia una impactante disminución en la producción. Hasta el 2009, en México se produjeron 133,282 toneladas, sin embargo, la producción disminuyó hasta llegar a las 66,292 toneladas en 2013, debido al impacto ocasionado por el virus de mancha blanca (WSSV, por sus siglas en inglés) y posteriormente el síndrome de muerte temprana (EMS, por sus siglas en inglés). EMS conocido también como Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND, por sus siglas en inglés) debido a las lesiones histopatológicas observadas (Soto-Rodríguez *et al.*, 2015), surgió en el año 2009 en Asia, causando pérdidas importantes en los cultivos del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, esta enfermedad se caracteriza por causar mortalidad masiva en los primeros 30 días de cultivo, observando signos clínicos como lento crecimiento, natación errática y coloración pálida (Schryver *et al.*, 2014), causando el mayor daño en hepatopáncreas y señalando como agente causal de esta enfermedad a la bacteria *Vibrio parahaemolyticus* (Tran *et al.*, 2013). Ya que *L. vannamei* posee un sistema inmune innato sin capacidad de memoria, el interés en la prevención de enfermedades por el uso de inmunoestimulantes y compuestos bioactivos, ha incrementado, con el fin de estimular la respuesta del camarón para combatir infecciones ocasionadas por agentes patógenos, resultando en especímenes más resistentes (Rendón y Balcázar, 2003). Diferentes componentes como lipopolisacáridos, péptidoglicanos y β -glucano, han sido empleados como inmunoestimulantes en camarones (Campa-Córdova *et al.*, 2010; Vargas-Albores y Yepiz-Plascencia, 2000). Por otro lado tenemos a los compuestos bioactivos como pigmentos antioxidantes, específicamente el β -caroteno producido por la microalga *Dunaliella* sp. (Ponce-Palafox *et al.*, 2006), que incrementan la resistencia de *L. vannamei* a infecciones experimentales con WSSV (Medina-Félix *et al.*, 2014). Por lo anterior en este trabajo se evaluó supervivencia, respuesta fisiológica e inmune de *L. vannamei* alimentado con dietas enriquecidas con harina de la microalga *Dunaliella* sp. con altas concentraciones de β -carotenos durante una infección con *V. parahaemolyticus*.

2. ANTECEDENTES

2.1 Cultivo del camarón blanco, *Litopenaeus vannamei*

La acuicultura es una de las actividades de producción de alimentos de mayor crecimiento en las últimas décadas, actividad que se ha expandido, diversificado, intensificado y avanzado tecnológicamente; con certeza, el cultivo de camarón está teniendo beneficios significativos en términos socioeconómicos, rentabilidad y generación de divisas que han proporcionado importantes fuerzas impulsoras en la expansión global de la industria, además, la explotación del camarón ha sido uno de los rubros más importantes de la actividad pesquera en México debido a su alto valor comercial (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, 2013).

El cultivo de *L. vannamei* se inició en América en el año 1976, el cultivo comercial mostró un crecimiento muy rápido, haciéndose una actividad de interés para inversionistas. Se han desarrollado diferentes técnicas de cultivo, buscando una mayor producción y eficiencia de los cultivos. Estas técnicas están delimitadas por el grado de inversión en términos de trabajo y tecnología aplicada, la cual puede ser extensiva, con estanques rústicos e irregulares, utilizando semilla silvestre y alimento natural, o un cultivo súper intensivo, con alta tecnología aplicada a cultivos controlados bajo invernaderos, sistemas automatizados y utilizando larvas producidas en laboratorio para el control de enfermedades.

En el año 2009 en México se cultivaron 133 mil toneladas de camarón, sufriendo una disminución importante en años posteriores, con una producción de tan solo 60 mil toneladas en el año 2013 (Fig. 1). En el estado de Sonora la producción de camarón disminuyó un 83% del 2009 al 2013, por la presencia de agentes patógenos como es el síndrome de mancha blanca (WSSV) y el síndrome de muerte temprana (EMS), haciendo difícil la recuperación para la industria acuícola. La prevalencia de enfermedades en los cultivos es un gran reto a superar para alcanzar una acuicultura sustentable y saludable, al momento se han logrado grandes avances con la identificación y control de diferentes agentes que afectan los cultivos.

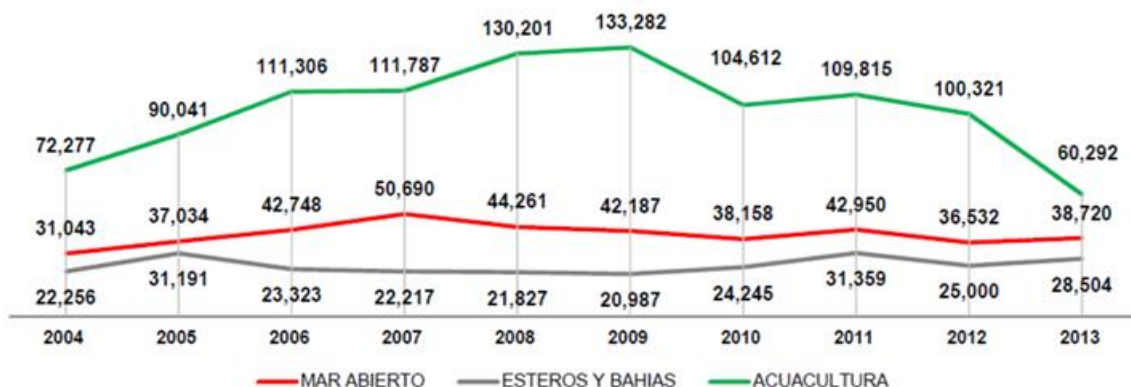


Figura 1. Producción de camarón en México (toneladas). (Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca, 2013).

2.2 Enfermedades del camarón

La presencia de enfermedades en los cultivos acuícolas es el principal obstáculo para una acuicultura exitosa. La influencia negativa de las condiciones ambientales afecta el sistema inmunológico del camarón, en donde el estrés se manifiesta inicialmente a nivel bioquímico y molecular, induciendo una serie de respuestas funcionales y estructurales en la regulación hormonal, metabolismo, osmorregulación y regulación inmunológica, haciéndolos más susceptibles a infecciones ocasionadas por virus o bacterias presentes de manera natural en el medio de cultivo, aunque los organismos se muestren sanos al inicio del cultivo, inmediatamente después de un brote de estrés puede desencadenar en una mortalidad masiva (Gómez-Gil *et al.*, 2001).

En el inicio del cultivo de camarón en México, la especie *Litopenaeus stylirostris* era la especie mayormente cultivada, sin embargo, el impacto de diversas enfermedades afectaron su producción, lo que llevo a los productores al cultivo de *L. vannamei* a finales de los años 90. Desafortunadamente debido al crecimiento acelerado de la agroindustria, aunado a inadecuadas técnicas de cultivo, así como el impacto de enfermedades los cultivos se vieron nuevamente afectados, causando pérdidas económicas considerables (Soto-Rodríguez *et al.*, 2015). Las enfermedades de mayor impacto en los cultivos de camarón en México se

presentan en la tabla I. Ante esta situación, se ha hecho necesaria la aplicación de medidas de bioseguridad y monitoreo constante para la detección de agentes patógenos y poder así controlar las enfermedades o incluso evitar su presencia.

Tabla I. Principales enfermedades infecciosas en cultivos de camarón en México (Gómez-Gil *et al.*, 2001; Bonett-Calzada, 2017).

Enfermedad	Año	Agente patógeno	Signos clínicos
Hepatopancreatitis necrotizante (NHP, por sus siglas en inglés)	1992	<i>Hepatobacter penaei</i>	Anorexia, cromatóforos expandidos, flacidez, branquias amarillas, hepatopáncreas atrófico y blanquecino con melanización.
Enfermedad de las manchas blancas (WSSV)	1999	Virus de las manchas blancas	Manchas blancas en cutícula de hasta 2 mm de diámetro.
Vibriosis sistémica		<i>Vibrio</i> sp.	Infecciones secundarias. Infección generalizada en cutícula, hepatopáncreas, órgano linfoide, corazón, hemolinfa y músculo.
Camarón manchado		<i>Vibrio</i> sp, <i>Aeromonas</i> sp, <i>Spoirillum</i> sp. y <i>Flavobacterium</i> so.	Infecciones en cutícula, apéndices y branquias. Lesiones localizadas en tono café a negro con cutícula erosionada.
Necrosis infecciosa hipodérmica y hematopoyética (IHHNV, por sus siglas en inglés)	1998	Virus de IHHNV	Rostros torcidos y deformes, antenas arrugadas, cutícula áspera y otras deformidades cuticulares.
Síndrome de Taura	1990	Virus del síndrome de Taura	Lesiones melanizadas cuticulares, expansión de cromatóforos rojos.
Síndrome de muerte temprana	2013	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Disfunción de las células del hepatopáncreas, con reducción de hasta el 50% de su tamaño.

2.3 Síndrome de muerte temprana ocasionada por *Vibrio parahaemolyticus*

Las especies de *Vibrio* se encuentran generalmente en los cultivos de camarón como: agentes oportunistas, una infección secundaria o como en este caso, un patógeno verdadero (Saulnier *et al.*, 2000).

El síndrome de muerte temprana (EMS) surgió en China en 2009, donde se detectaron mortalidades del 60-80%, ya que se desconocía el agente causal de la enfermedad, se le nombro síndrome de muerte temprana, en el año 2011 se le dio un nombre más descriptivo para la fase aguda de la enfermedad, síndrome de necrosis hepatopancreático agudo o AHPND (Joshi *et al.*, 2014; Tran *et al.*, 2013). En México se presentaron pérdidas del 23% de la producción de camarón en el 2013, aún con el efecto de los daños ocasionados por WSSV. En este mismo año se identificó que el agente causal de EMS era la bacteria Gram negativa *Vibrio parahaemolyticus*, que al ser infectada por un bacteriófago, genera una toxina dañando mortalmente al camarón, estas toxinas recientemente identificadas, están relacionadas con el nematodo *Photorhabdus luminescens*, por lo tanto a las toxinas se les nombró como *Photorhabdus* insect related proteins A y B (Pir-A y Pir-B) (Han *et al.*, 2015; Sirikharin *et al.*, 2015).

EMS es una enfermedad epidémica que altera el sistema digestivo de los camarones, afectando larvas de camarón después de los 20-35 días de cultivo, con mortalidades que pueden llegar al 100% (Krishna-Kumar *et al.*, 2014; Schryver *et al.*, 2014). La patología de esta bacteria está limitada al hepatopáncreas y está mediada por las toxinas Pir-A y Pir-B, los signos clínicos en el camarón son visible después de 10 días de infección, donde se puede observar un hepatopáncreas de color blanco pálido debido a la pérdida de pigmento en las células R, así como una reducción del 50% en su tamaño, en la fase terminal de la enfermedad se observan manchas negras debido a depósitos de melanina por la actividad de los hemocitos (Tran *et al.*, 2013). En un estudio histológico se encontró una degeneración progresiva del hepatopáncreas con disfunción en células R, B, F y E, afectando las células de los túbulos epiteliales, mismas que se desprenden de los túbulos afectados y se hacen necróticas ya sea

en otros túbulos o en el lumen intestinal (Joshi *et al.*, 2014; Krishna-Kumar *et al.*, 2014). La enfermedad se presenta en tres fases: en fase aguda se observa pérdida de funcionalidad de las células epiteliales de almacenamiento y digestión de los túbulos hepatopancreáticos, mientras que las células germinales dejan de dividirse y migran hacia intestino, en la fase intermedia, se genera melanización de los túbulos necrosados y en la fase terminal, se generaliza la destrucción del hepatopáncreas por la acción de la bacteria.

2.4 Sistema inmune en crustáceos

El sistema inmune de los crustáceos está conformado por las partes celular y humoral. La celular está mediada por los hemocitos que poseen capacidad citotóxica y comunicación intercelular que les permite llevar a cabo las funciones de: reconocimiento, coagulación, fagocitosis, melanización, formación de nódulos y encapsulación. Rendón y Balcázar (2003) clasifican a los hemocitos en tres tipos:

- Hemocitos hialinos que se caracterizan por la ausencia de gránulos, con un delgado citoplasma basófilo y un núcleo amplio y céntrico, estos hemocitos tiene capacidad fagocítica e intervienen en el proceso de coagulación.
- Hemocitos semigranulosos poseen un núcleo esférico o en forma de herradura y gránulos redondos pequeños, involucrados en la detección temprana de patógenos, así como fagocitosis, encapsulación y liberación del sistema proFO, además sintetizan y liberan péptidos antimicrobianos.
- Hemocitos granulosos son células grandes con gránulos, de alta relación citoplasma-núcleo, que contienen en sus gránulos diversos factores inmunes como el sistema proFO y péptidos antimicrobianos.

Mientras que en la parte humoral, se encuentran varios componentes plasmáticos como: lectinas, radicales libres, citosinas, chaperoninas, péptidos antimicrobianos, un sistema profenoloxidasa y la cascada de coagulación, que trabajan en conjunto para favorecer la destrucción de patógenos (Campa-Córdova *et al.*, 2010; Fagutao *et al.*, 2011; Vargas-Albores

et al., 1998; Yeh *et al.*, 2009). La inmunidad innata de los crustáceos requiere de una compleja participación en conjunto de grupos celulares especializados y factores humorales específicos que son generados contra un antígeno (Le Moullac y Haffner, 2000; Vázquez *et al.*, 1998).

El sistema inmune innato de los crustáceos, está controlado por un grupo de proteínas conocidas como receptores de reconocimiento de patrones (PRR), estas carecen de la afinidad de unión de anticuerpos, pero puede reconocer y unirse a algunas clases de polisacáridos, otros receptores reconocen y se unen a moléculas presentes en la superficie de microorganismos, activando directamente funciones de defensa celular (Deepika *et al.*, 2014; Su *et al.*, 2004). Actualmente se han detectado 11 tipos de PRR: proteínas relacionadas con β -1,3-glucanasa, proteínas de enlace β -1,3-glucano, lectinas tipo C, galectinas, proteínas relacionadas con fibrógeno, proteínas contenedoras de tioester, moléculas de adhesión de síndrome de Down, homólogos de serín proteasa, proteínas de activación trans que responden a unión de ARN y receptores tipo Toll (TLR) (Deepika *et al.*, 2014).

El reconocimiento de los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) por varios PRR puede desencadenar reacciones de defensa contra estos patógenos. De los diferentes tipos de PRR, los TLR son considerados por regla como moléculas de reconocimiento de patógenos en metazoos, estos receptores TLR, están involucrados principalmente en la defensa contra hongos, bacterias Gram positivo y virus (Söderhäll, K. 2010).

Durante el proceso de fagocitosis, se generan sustancias antimicrobianas, como especies reactivas del oxígeno, que causan daños tóxicos. La eliminación efectiva y rápida de las especies reactivas del oxígeno, es importante para el desarrollo y supervivencia de los organismos, esto se realiza mediante la acción de defensa antioxidante, como la superóxido dismutasa (SOD) que dismuta al anión superóxido (Campa, 2002), siendo una de las enzimas responsables de detener las reacciones causadas por estas especies reactivas del oxígeno y sus productos intermedios, disminuyendo daño celular (Gómez-Anduro *et al.*, 2006).

Al tratarse de un sistema inmune sin capacidad de memoria, el uso de vacunas no es práctico, mientras que el uso de antibióticos se encuentra restringido, dejando como principal opción el uso de inmunoestimulantes y aditivos que mejoren la respuesta celular del camarón. La utilización de estos en la acuicultura está tomando popularidad; microorganismos y/o sus derivados como iopolisacáridos (LPS), péptidoglicanos y β -glucano, han sido empleados como activadores del sistema inmune de los camarones incrementando las funciones de: fagocitosis, melanización, encapsulación y coagulación (Campa-Córdova *et al.*, 2010; Vargas-Albores y Yepiz-Plascencia, 2000).

2.5. Inmunoestimulantes en acuicultura

Actualmente uno de los métodos más utilizados por productores acuícolas para prevenir enfermedades en sus cultivos, es el uso de compuestos comerciales como inmunopotenciadores, inmunoestimulantes o suplementos alimenticios que mejoran la salud, estos son considerados como un elemento estructural proveniente de un microorganismo, que basa su principio en la estimulación del sistema inmune innato para incrementar la resistencia a agentes patógenos (Vásquez-Piñeros *et al.*, 2012). El uso de antibióticos en los cultivos de camarón es común, sin embargo, su uso indiscriminado conlleva a la generación de bacterias resistentes y a la eliminación de bacterias benéficas, limitando su competencia con microorganismos patógenos, compromete la respuesta inmune y posee efectos adversos sobre el medio ambiente (Vásquez-Piñeros *et al.*, 2012).

Diversos compuestos están siendo estudiados por sus efectos inmunoestimulantes, algunos con resultados muy alentadores para la industria acuícola como: elementos estructurales de bacterias (LPS, lipopéptidos, glicoproteínas capsulares y muramilpéptidos); productos de β -1,3/1,6 glucano que provienen de bacterias, hongos y levaduras; nutracéuticos que incluye vitaminas (C, E, A, D), carotenos, minerales (Cu, Mn, Zn, I) y probióticos formados por bacterias y levaduras (Bricknell y Dalmo, 2005).

De estos inmunoestimulantes, el uso de β -glucano en el alimento del camarón, ha reportado resultados positivos; estos están conformados por unidades repetidas de monómeros de glucosa, utilizados con éxito en la acuicultura para aumentar la resistencia a infecciones bacterianas y virales tanto en peces como en crustáceos (Cheng-Fang *et al.*, 2000; Pacheco *et al.*, 2011), su función radica en activar el sistema inmune, aumentando así la resistencia a enfermedades inespecíficas y reduciendo la mortalidad (Campa-Córdova *et al.*, 2002). Por otra parte los carotenoides, la vitamina E y C juegan un papel importante en la salud animal como antioxidantes mediante la inactivación de especies reactivas del oxígeno, involucradas en el proceso de fagocitosis. Se ha reportado que la función antioxidante de estos micronutrientes mejora la inmunidad mediante la preservación de la integridad funcional y estructural de las células inmunitarias importantes (Campa-Córdova *et al.*, 2002; Chew, 1995; Merchie *et al.*, 1998).

Algunos trabajos se han dirigido al estudio del uso de pigmentos como antioxidantes, incluso extraídos del chile (*Capsicum annuum*), en donde se mejoró la pigmentación del camarón (Arredondo-Figueroa *et al.*, 2003), así mismo, el uso de pigmentos de la flor de cempasúchil *Tagetes erecta*, reportaron efectos similares a otras fuentes de pigmentos (Tapia-Salazar *et al.*, 2008) y la aplicación de xantinas en el alimento de *L. vannamei* mejorando el crecimiento, frecuencia de muda y capacidad osmorregulatoria.

El β -caroteno es un promotor de la vitamina A o retinol, requerida en la regeneración del componente sensitivo a la luz en la retina; el transporte de calcio a través de las membranas, el crecimiento óseo, la reproducción y el mantenimiento de la integridad de las membranas de las células epiteliales (Lawrence y He, 1996). Los crustáceos tienen la habilidad metabólica de convertir el β -caroteno en astaxantina, ya que el β -caroteno actúa como antioxidante ha sido utilizado como suplemento en el alimento del camarón (Madhumathi y Rengasamy, 2011).

2.6 Antioxidantes en la inmunidad

El estrés oxidativo en *L. vannamei* provocado por agentes patógenos o como resultado del ambiente de cultivo, genera estrés oxidativo, produciendo cantidades excesivas de especies reactivas del oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés), como parte natural del proceso de activación de la fagocitosis (Madhumathi y Ramasamy, 2011).

La fagocitosis puede tomar dos rutas, aeróbica y anaeróbica. En la ruta aeróbica una molécula de NADP o una molécula de NADH es utilizada como donante de electrones, en donde se reduce un electrón de oxígeno para formar al radical superóxido, este dismuta a peróxido de hidrógeno por acción de la SOD, produciéndose una nueva molécula de oxígeno (Campa, 2002; Pacheco *et al.*, 2011). Las principales moléculas ROS son: radical hidroxilo (OH^\cdot), anión superóxido (O_2^-), óxido nítrico (NO) y peroxinitrito (ONOO^-), estas moléculas son importantes como parte de un proceso biológico normal, sin embargo, pueden causar daños directos como peroxidación de lípidos y proteínas, así como daños en ácidos nucleicos (Pacheco *et al.*, 2011).

El uso de antioxidantes naturales como promotores de vitaminas, juegan un papel importante en la inmunoestimulación, ya que actúan removiendo, disminuyendo o previniendo la iniciación o propagación de ROS. Los carotenoides, son antioxidantes que mejoran los sistemas antioxidantes de defensa como SOD y catalasa protegiendo a los organismos contra el daño ocasionado por estos radicales libres (Flores, 2006).

2.7 β -caroteno producido por *Dunaliella* sp.

La microalga *Dunaliella* sp. es una de las 30 000 especies de microalgas que se han cultivado comercialmente, debido a su gran valor en el mercado, como productora de glicerol y β -caroteno.

El género *Dunaliella* pertenece a la clase Chlorophyceae y al orden Volvocales, es un alga unicelular, mide de 8-25 μm de largo y 5-15 μm de ancho, presenta movilidad debido a dos flagelos apicales de igual longitud (Fig. 2), su principal característica es que carece de una pared celular rígida de polisacárido, en su lugar está cubierta por una membrana plasmática elástica (Tafreshi y Shariati, 2009). *Dunaliella* sp. ha sido objeto de estudios mutagénicos y manipulaciones genéticas para incrementar la calidad y cantidad de carotenos producidos (Jin y Melis, 2003) ya que destaca por su capacidad de acumular cantidades masivas de β -carotenos, además de presentar otras ventajas como fácil digestión por carecer de pared celular, su cultivo en el laboratorio es eficiente y de rápido crecimiento, además presenta resistencia a condiciones ambientales adversas, lo que permite una mayor manipulación del medio para la producción de diferentes compuestos bioactivos (Pisal y Lele, 2005).

Uno de los métodos utilizados para inducir la acumulación masiva de carotenoides es la reducción del crecimiento por la privación de nutrientes como nitrógeno e iluminación (Fimbres, 2011). López-Elías *et al.* (2013), reportaron concentraciones de 5.57 mg/L de β -caroteno, cuando *Dunaliella tertiolecta* es cultivada en medio f/8. Otras estrategias son utilizadas para promover altas concentraciones de carotenos, como concentraciones de salinidad elevadas, la disminución de nutrientes en el medio, altas temperaturas y altas radiaciones de luz, sin embargo, la utilización de estos métodos llevan a una baja concentración celular (Tafreshi y Shariati, 2009).

Trabajos realizados previamente mostraron la eficiencia de *Dunaliella* sp. al ser utilizada como aditivo en el alimento de *L. vannamei* durante una infección con WSSV (Medina-Félix *et al.*, 2014). Madhumathi y Rengasamy (2011), reportan la habilidad de *Penaeus monodon* de convertir el β -caroteno en astaxantina, pigmento involucrado en la actividad antioxidante, mejorando su actividad inmunológica y la resistencia a enfermedades. La adición de 50 y 100 mg/kg de β -caroteno mejoró la capacidad antioxidante de la SOD y CAT en músculo y hepatopáncreas, reduciendo el daño generado por radicales libres. Así mismo la adición de 100 mg/kg de β -caroteno mejoró la supervivencia de *L. vannamei* durante una infección con *Vibrio harveyi* (Flores-Leyva, 2006).

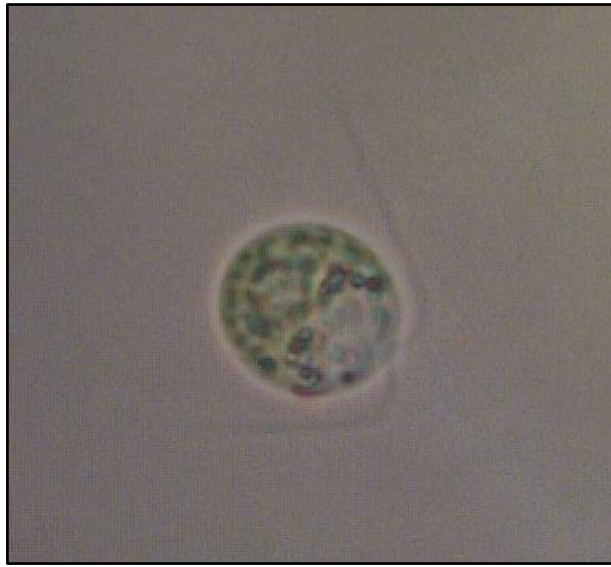


Figura 2. Microalga *Dunaliella* sp. utilizada en este trabajo.

3. JUSTIFICACIÓN

El camarón blanco del Pacífico (*L. vannamei*), es la especie de camarón mayormente cultivada en México; las enfermedades virales y bacterianas son la principal amenaza para la agroindustria acuícola. Las bacterias de género *Vibrio* están siempre presentes en los cultivos, siendo las responsables de diversas enfermedades, causando altas mortalidades cuando el sistema inmune del camarón se encuentra suprimido.

El impacto del EMS ocasionado por *V. parahaemolyticus* en los cultivos de *L. vannamei* en México ha sido devastador, llevando a los productores a bajar las densidades de siembra, hacer cosechas de organismos de menor talla y hacer uso de medicamentos, entre ellos antibióticos, sin embargo, existe un número muy reducido de antibióticos que pueden ser legalmente utilizados en la acuicultura (Varela-Mejías y Peña-Navarro, 2014). Debido a que la eliminación de agentes patógenos del medio es imposible, los métodos de prevención de enfermedades y de resistencia a ellas, son la única alternativa. El uso de inmunoestimulantes como activador del sistema inmune de *L. vannamei*, mejora la respuesta a infecciones ocasionadas por agentes patógenos. Ya que la microalga *Dunaliella* sp. se caracteriza por la acumulación de β -carotenos al ser cultivada en un medio limitado en nutrientes; estos son utilizados por su función antioxidante.

Por tal motivo se evaluó la adición de *Dunaliella* sp rica en β -caroteno en el alimento de *L. vannamei* para mejorar la respuesta fisiológica, inmune y supervivencia durante una infección producida por *V. parahaemolyticus*

4. HIPÓTESIS

La adición de *Dunaliella* sp. a la dieta del camarón blanco (*L. vannamei*) tendrá un impacto positivo en la respuesta fisiológica, inmune y supervivencia de los organismos ante una infección ocasionada por *V. parahaemolyticus*

5. OBJETIVO

Evaluar la respuesta fisiológica, inmune y supervivencia de *L. vannamei* alimentado con *Dunaliella* sp. durante una infección con *V. parahaemolyticus*

5.1 Objetivos particulares

- Objetivo 1: Determinar la dosis de *Dunaliella* sp. en la dieta, según respuesta fisiológica, inmune y supervivencia de *L. vannamei* durante una infección con *V. parahaemolyticus*.
- Objetivo 2: Determinar la frecuencia de adición de la dosis de *Dunaliella* sp. en la dieta, según respuesta fisiológica, inmune y supervivencia de *L. vannamei* durante una infección con *V. parahaemolyticus*.
- Objetivo 3: Evaluar la respuesta fisiológica y expresión del gen Mn-SOD en *L. vannamei* alimentado con *Dunaliella* sp. a la dosis y frecuencia de administración determinada por los objetivos anteriores, durante una infección con *V. parahaemolyticus*.

6. METODOLOGÍA

Para la realización de este trabajo, los organismos del camarón blanco, *L. vannamei* fueron donados por la granja acuícola local San Fabián, S. P. R. de R. I, localizada en Cruz de Piedra, Guaymas, Sonora, México.

6.1 Diseño experimental

6.1.1 Bioensayo 1: Determinación de la dosis de *Dunaliella* sp. en la dieta, según respuesta fisiológica, inmune y supervivencia de *L. vannamei* durante una infección con *V. parahaemolyticus*

Se evaluaron dietas adicionadas con el 1.5, 2, 2.5, y 3% de *Dunaliella* sp. en el alimento además de un control positivo (sin *Dunaliella* sp. en el alimento e infectado con *V. parahaemolyticus*) y un control negativo (sin *Dunaliella* sp. en el alimento ni infección con *V. parahaemolyticus*), cada uno de los tratamientos por triplicado, utilizando acuarios con una capacidad de 60 L, a los que se les agregaron 40 L de agua de mar (35 ups, 28 ± 2 °C). Para la limpieza de los acuarios se realizaron recambios de agua al 80% cada tercer día. En cada uno de los tratamientos se utilizaron 40 especímenes de *L. vannamei* con un peso inicial de 2.1 g (Fig. 3). Los organismos fueron alimentados con las dietas por 20 días (al 5% de la biomasa repartido en dos raciones diarias) para ser infectados con *V. parahaemolyticus* (1×10^6 UFC/mL). Se tomaron muestras de hemolinfa a las 0, 12, 24, 36 y 48 horas post infección (hpi) para la determinación de proteína, triglicéridos, glucosa y lactato, así como la actividad de proFO y FO.

6.1.2 Bioensayo 2: Determinación de la frecuencia de administración de *Dunaliella* sp. en la dieta, según respuesta fisiológica, inmune y supervivencia de *L. vannamei* durante una infección con *V. parahaemolyticus*

Se evaluaron once tratamientos experimentales, con las dosis de 1.5, 2 y 3% de *Dunaliella* sp. a tres frecuencias de alimentación: diaria (1), cada tres (3) y siete (7) días, un control positivo (sin *Dunaliella* sp. e infectado con *V. parahaemolyticus*) y un control negativo (sin *Dunaliella* sp. y sin infección con *V. parahaemolyticus*), cada uno por triplicado. Después de 20 días de alimentación, los organismos fueron infectados con la bacteria (1×10^6 UFC/mL).

Para este bioensayo se utilizaron acuarios de plástico con una capacidad de 15 L, con 10 L de agua de mar filtrada (35 ups y una temperatura de 28 ± 2 °C), en cada acuario se colocaron 15 organismos con un peso inicial de 3.1 g alimentados al 5% de su biomasa a dos raciones diarias. Se realizaron recambios de agua al 80% cada tercer día. Las muestras de hemolinfa se tomaron a las 0, 12, 24, 36 y 48 hpi. Se determinó la concentración de proteína, triglicéridos, glucosa y lactato, así como la actividad de profenoloxidasa proFO, FO y SOD, así como conteo de hemocitos

6.1.3 Bioensayo 3: Evaluación de la respuesta fisiológica y expresión del gen Mn-SOD en *L. vannamei* alimentado con *Dunaliella* sp. y β -glucano durante una infección con *V. parahaemolyticus*.

Se evaluó el efecto de la dieta con la adición cada tercer día del 2% *Dunaliella* sp. y 1.1% β -glucano (Reyes-Becerril *et al.*, 2008), en la dieta de *L. vannamei*, después de 15 días de alimentación con las dietas se infectó con *V. parahaemolyticus* (1×10^6 UFC/mL). Para este bioensayo se utilizaron acuarios de plástico con una capacidad de 15 L, conteniendo 10 L de agua de mar filtrada, la temperatura y salinidad permanecieron constantes (35 ups; 28 ± 2 °C). Se colocaron 8 camarones con un peso inicial de 19.2 g alimentados al 1.5% de su biomasa a dos raciones diarias.

Tratamientos control: se analizó un control por triplicado para cada una de las dietas, así como dos controles: positivo (sin estimulante e infectado con *V. parahaemolyticus*) y negativo (sin estimulante y sin infección con *V. parahaemolyticus*), cada uno de los tratamientos y controles por triplicado. Se tomaron muestras de hemolinfa a los días 0, 7 y 14, así como a los tiempos 24 y 48 hpi. Las muestras se procesaron para su análisis donde se determinó proteína, glucosa, lactato, triglicéridos y colesterol, además de la expresión del gen Mn-SOD.

6.2 Cultivo de *Dunaliella* sp.

Para cada uno de los bioensayos, la microalga *Dunaliella* sp. se obtuvo del cepario del Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (DICTUS) de la Universidad de Sonora (Hermosillo, Son.) utilizando medio f/8 (Tabla II) (basado en el medio f/2 de Guillard y Ryther, 1962), que contiene una cuarta parte de nitratos y fosfatos necesarios para su óptimo crecimiento, en agua de mar filtrada y estéril.

Se llevó a cabo un sistema de cultivo estático escalonado durante siete días para cada una de las etapas de cultivo (Fig. 3), iniciando en tubos de 20 mL hasta llegar a cilindros de 90 L, realizando conteos celulares diarios. Una vez que alcanzaron su crecimiento máximo, la microalga se flocló con sulfato de aluminio (0.15 g/L). El exceso de agua se retiró por sifoneo para obtener un concentrado de *Dunaliella* sp. el cual se almacenó en bolsas plásticas a -80 °C en ultracongelador (New Brunswick Scientific). Posteriormente el concentrado de *Dunaliella* sp. se secó por liofilización (Yamato® DC401) para obtener la harina y elaborar el alimento.

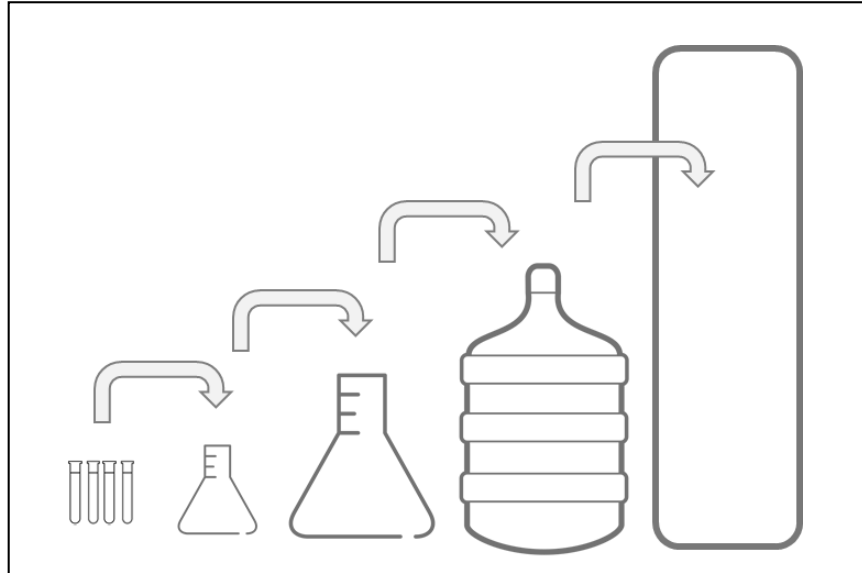


Figura 3. Diseño del sistema de cultivo estático escalonado, utilizado para la producción de la microalga *Dunaliella* sp.

Tabla II. Soluciones madre para la preparación del medio de cultivo f/2 (Guillard y Ryther, 1962), utilizado como base para la preparación del medio f/8.

Constituyentes		Cantidad
1	Nutrientes mayores	g/L de agua destilada
1.1	Nitrato de sodio, granulado y refinado	75
1.2	Fosfato de sodio monobásico	5
1.3	Silicato de sodio metasoluble	30
2	Metales traza	g/100 mL de agua destilada
2.1	Solución primaria	
2.1.1	Sulfato cúprico, cristales finos	0.98
2.1.2	Sulfato de zinc, cristales finos	2.2
2.1.3	Cloruro de cobalto, cristales finos	1.0
2.1.4	Cloruro manganoso, cristales finos	18.0
2.1.5	Molibdato de sodio, cristales finos	0.63
2.2	Solución secundaria	g/L de agua destilada
2.2.1	Cloruro férrico	3.15
2.2.2	EDTA disódico	4.36
2.2.3	Metales traza	1 mL de c/u de las sol. 2.1.1. a 2.1.5.
3	Vitaminas	
3.1	Solución primaria	g/L de agua destilada
3.1.1	Biotina cristalizada	0.1
3.1.2	Cianocobalamina	1.0
3.2	Solución secundaria	En 100 mL de agua destilada
3.2.1	Biotina	1 mL de la sol. 3.1.1
3.2.2	Cianocobalamina (B12)	1 mL de la sol. 3.1.2
3.2.3	Tiamina clorhídrica (B1)	20 mg

6.3 Determinación de β -carotenos en *Dunaliella* sp.

Una muestra de 0.03 g de harina de *Dunaliella* sp. se pesó por triplicado, para agregar 10 mL de acetona al 90%, se dejó reposar 24 h en obscuridad a 4°C, para posteriormente centrifugar a 5000 x g por 10 min y leer en el lector de microplacas (Bio Rad iMark™) a una longitud de onda de 450 nm. La curva de calibración para β -carotenos se realizó añadiendo 10 mg del estándar de β -carotenos (Sigma ® C9750) en 15 mL de acetona (0.6 mg/mL).

6.4 Elaboración del alimento

Las dietas fueron formuladas y elaboradas mediante el software 5Pro (Chapala, Jal. México). El alimento se elaboró en el laboratorio de nutrición acuícola del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. (CIBNOR, S.C., La Paz, BCS). Todos los ingredientes mostrados en las tablas III, IV y V fueron tamizados a través de una malla de 250 μ m (CSC Scientific Company Inc., Fairfax, VA, EUA). Cada dieta fue preparada mezclando los ingredientes en una batidora industrial (Kitchen Aid®), añadiendo agua destilada hasta obtener una mezcla uniforme y formar el pellet (2 mm) en un molino de carne (Torrey®, modelo JR, criba Torrey® CI-12-1/8).

Una vez formado el pellets, el alimento se secó en un horno de flujo de aire a 38°C, hasta que su humedad fue menor al 15% (analizador de humedad Ohaus®). El alimento seco se almacenó en bolsas de plástico a -4°C hasta su uso.

Tabla III. Ingredientes que componen el alimento experimental adicionado con *Dunaliella* sp. para el bioensayo 1.

Ingredientes	Control	Alim. 1.5%	Alim. 2.0%	Alim. 2.5%	Alim. 3.0%
Harina integral de trigo ¹	688.2	585.5	575.9	566.4	556.8
Harina de sardina ¹	425.82	431.8	433.9	435.9	437.9
Pasta soya (0614)	300	300	300	300	300
Aceite de hígado de bacalao ¹	66.18	68.2	68.2	68.2	68.2
Pre-mezcla vitamina crustáceos ²	27	27	27	27	27
Lecitina de soya (Isoy1005) ³	24	24	24	24	24
Fosfato dibasico de sodio	18	18	18	18	18
Harina de <i>Dunaliella</i> sp.	--	22.5	30	37.5	45
Pre-mezcla mineral crustáceos ⁴	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5
Ligante ac. alginico	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5
Colesterol (C-8503) ⁵	4.2	4.2	4.2	4.2	4.2
Cloruro de colina (101386) ⁶	3	3	3	3	3
Vitamina C ⁷	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
Antioxidante BHT ⁵	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
Cantidad total	1,573 g	1,501 g	1,501 g	1,501 g	1,501 g

¹PIASA feed (Productora Industrial Acuasistemas, La Paz, B.C.S., Mexico).

²(g 900 g⁻¹) premezcla de vitaminas: Vit. A, 100,000 IU; Vit. 850 UI; α -tocopherol acetate 2000 IU; menadione (2); thiamine HCl (0.5); riboflavin (3); pyridoxine HCl (1); dl-Capantothenic acid (5); nicotinic acid (5); biotin (0.05); inositol (5); Vitamin B12 (0.02); folic acid (0.18). Sigma-Aldrich, St. Louis, MO.

³ODONAJI, D.F., México.

⁴(g 200 g⁻¹) Premezcla de minerales: KCl (28.57); MgSO₄•7H₂O (28.57); ZnSO₄•7H₂O (5.14); MnCl₂•4H₂O, 1.34; CuSO₄•5H₂O (0.29); KI (0.29); CoCl₂•2H₂O (0.14); Na₂HPO₄ (135.43). Sigma-Aldrich, St. Louis, MO.

⁵Sigma-Aldrich, St. Louis, MO.

⁶62% agente activo, ICN 101386.

⁷35% agente estable active, Roche Diagnostics, Risch-Rotkreuz, Switzerland.

Tabla IV. Ingredientes que componen el alimento experimental adicionado con *Dunaliella* sp. para el bioensayo 2.

Ingredientes	Control	Alim. 2.0%	Alim. 2.5%	Alim. 3.0%
Harina integral de trigo ¹	688.2	219.95	216.8	210.45
Harina de sardina ¹	372.7	126.15	126.8	128.2
Pasta soya (0614)	300	100	100	100
Aceite de hígado de bacalao ¹	46.05	15.4	15.4	15.4
Pre-mezcla vitamina crustáceos ²	27	9	9	9
Lecitina de soya (Isoy1005) ³	24	8	8	8
Fosfato dibasico de sodio	18	6	6	6
Harina de <i>Dunaliella</i> sp.	--	7.5	10	15
Pre-mezcla mineral crustáceos ⁴	7.5	2.5	2.5	2.5
Ligante ac. alginico	7.5	2.5	2.5	2.5
Colesterol (C-8503) ⁵	4.2	1.4	1.4	1.4
Cloruro de colina (101386) ⁶	3	1	1	1
Vitamina C ⁷	1.5	0.5	0.5	0.5
Antioxidante BHT ⁵	0.3	0.1	0.1	0.1
Cantidad total	1,500 g	500 g	500 g	500 g

¹PIASA feed (Productora Industrial Acuasistemas, La Paz, B.C.S., Mexico).

²(g 900 g-1) premezcla de vitaminas: Vit. A, 100,000 IU; Vit. 850 UI; α -tocopherol acetate 2000 IU; menadione (2); thiamine HCl (0.5); riboflavin (3); pyridoxine HCl (1); dl-Capantothenic acid (5); nicotinic acid (5); biotin (0.05); inositol (5); Vitamin B12 (0.02); folic acid (0.18). Sigma-Aldrich, St. Louis, MO.

³ODONAJI, D.F., México.

⁴(g 200 g-1) Premezcla de minerales: KCl (28.57); MgSO₄•7H₂O (28.57); ZnSO₄•7H₂O (5.14); MnCl₂•4H₂O, 1.34; CuSO₄•5H₂O (0.29); KI (0.29); CoCl₂•2H₂O (0.14); Na₂HPO₄ (135.43). Sigma-Aldrich, St. Louis, MO.

⁵Sigma-Aldrich, St. Louis, MO.

⁶62% agente activo, ICN 101386.

⁷35% agente estable active, Roche Diagnostics, Risch-Rotkreuz, Switzerland.

Tabla V. Ingredientes que componen el alimento experimental adicionado con *Dunaliella* sp. y β -glucano para el bioensayo 3.

Ingredientes	Control	<i>Dunaliella</i> sp. 2%	β -glucano 1.1%
Harina integral de trigo ¹	688.2	458.8	467.8
Harina de sardina ¹	372.7	248.5	248.5
Pasta soya ¹	300	200	200
Aceite de hígado de bacalao ¹	46.05	30.7	30.7
Pre-mezcla vitamina crustáceos ²	27	18	18
Lecitina de soya ³	24	16	16
Fosfato dibasico de sodio	18	12	12
Harina de <i>Dunaliella</i> sp.	--	20	--
β -glucano ⁸	--	--	11
Pre-mezcla mineral crustáceos ⁴	7.5	5	5
Ligante	7.5	5	5
Colesterol (c-8503) ⁵	4.2	2.8	2.8
Cloruro de colina ⁶	3	2	2
Vitamina C ⁷	1.5	1	1
Antioxidante BHT ⁵	0.3	0.2	0.2
Total	1,500 g	1,000 g	1,000 g

¹PIASA feed (Productora Industrial Acuasistemas, La Paz, B.C.S., Mexico).

²(g 900 g-1) premezcla de vitaminas: Vit. A, 100,000 IU; Vit. 850 UI; α -tocopherol acetate 2000 IU; menadione (2); thiamine HCl (0.5); riboflavin (3); pyridoxine HCl (1); dl-Capantothenic acid (5); nicotinic acid (5); biotin (0.05); inositol (5); Vitamin B12 (0.02); folic acid (0.18). Sigma-Aldrich, St. Louis, MO.

³ODONAJI, D.F., México.

⁴(g 200 g-1) Premezcla de minerales: KCl (28.57); MgSO₄•7H₂O (28.57); ZnSO₄•7H₂O (5.14); MnCl₂•4H₂O, 1.34; CuSO₄•5H₂O (0.29); KI (0.29); CoCl₂•2H₂O (0.14); Na₂HPO₄ (135.43). Sigma-Aldrich, St. Louis, MO.

⁵Sigma-Aldrich, St. Louis, MO.

⁶62% agente activo, ICN 101386.

⁷35% agente estable active, Roche Diagnostics, Risch-Rotkreuz, Switzerland.

⁸Macrogard ® DTF.

6.5 Análisis químico proximal del alimento

Se realizaron para cada uno de los ingredientes y dietas utilizadas en los tres bioensayos, en el laboratorio analítico de análisis químico proximal del CIBNOR, S.C. (La Paz, BCS) (Tablas VII, VIII y IX).

6.5.1 Determinación de humedad

Se realizó por el método de pérdida de peso, se pesaron con exactitud 2,000 g de muestra de las diferentes dietas por triplicado en un crisol de porcelana, previamente puesto a peso constante para después colocarse en la estufa a 105 °C a desecar por 4 horas, se deja enfriar en un desecador por 40 min para pesar en la balanza analítica. El porcentaje de humedad se obtiene al restar el peso del crisol con la muestra seca, el peso del crisol con la muestra húmeda entre los 2,000 g de muestra húmeda y multiplicar por 100.

6.5.2 Determinación ceniza

Las muestras del alimento utilizadas para humedad se utilizaron para la determinación de ceniza, se incineraron en la mufla a 600 °C por 5 h, para ser pesados en balanza analítica (OHAUS® AS200). El porcentaje de ceniza se determinó restando el peso del crisol vacío al peso del crisol con ceniza entre el peso de la muestra y multiplicado por 100.

6.5.3 Determinación de energía bruta

Se elaboraron pastillas de aproximadamente un gramo con el alimento finamente molido, para ser colocadas en capsulas inoxidables Parr por triplicado. Las muestras fueron analizadas en Parr Calorimeter 6400®.

6.5.4 Determinación de proteína cruda

Se pesaron 0.2000 g de muestra finamente molida por triplicado sobre papel de estaño oxidado de magnesio y se envuelve con éste. Las muestras se analizaron en el equipo Leco EP-528[®] empleando la técnica de combustión de Dumas, analizador de Nitrógeno/Proteína.

6.5.5 Determinación de lípidos

Se utilizó el método Soxtec Avanti (Tecator 2050), marca donde se pesaron 2,000 g de la muestra finamente molida sobre un filtro Whatman no. 1, para ser colocado en el cartucho de celulosa Whatman. Por otro lado se pesaron e identificaron los vasos vacíos de aluminio. Se colocaron los cartuchos en el equipo Soxtec Avanti 2050 y los vasos a los que se les agregaron 80 ml de éter de petróleo, el equipo se programó de la siguiente manera: 15 min de inmersión, 40 min de goteo del solvente, 10 min recuperando el solvente y 5 min de secado. Una vez terminado el ciclo se retiraron los vasos de aluminio con pinzas y se colocaron a la estufa a 103°C por 2 h, para ser pesados en una balanza analítica(OHAUS[®] AS200). El porcentaje de lípidos se determinó restando el peso del vaso vacío al peso del vaso con los lípidos extraídos entre los gramos de la muestra por 100.

6.5.6 Determinación de fibra

Mediante el método de hidrólisis sucesiva, con el extractor de fibra Foss, se pesaron 1 g de muestra previamente desgrasada, en el crisol de extracción por triplicado. Se colocaron en el equipo, poniendo a calentar el ácido sulfúrico al 1.25 % (0.225 N) y se agregaron 150 mL a cada crisol para hervir por 30 min, posteriormente se realizaron 3 lavados con agua destilada. Se agregaron 150 mL de hidróxido de sodio al 1.25 % (0.255 N) y octanol, se dejó hervir por 30 min más para filtrar y realizar nuevamente 3 lavados. Los crisoles se llevaron a la estufa a 120 °C por 2 h, se colocaron en el desecador por 30 min y se incineraron en la mufla a 520 °C por 20 min, nuevamente se llevaron a la estufa a 130 °C por 20 min. Para la

determinación de fibra se restó el peso del crisol con ceniza al peso del crisol, entre gramos de muestra por 100.

6.6 Preparación del inóculo de *V. parahaemolyticus*

La cepa *V. parahaemolyticus* fue aislada de camarones infectados en el Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional (CIIDIR-PN-Sin.) en Guasave Sinaloa México (López-León *et al.*, 2016). El inóculo de *V. parahaemolyticus* se preparó siguiendo la metodología descrita por Soto-Rodríguez *et al.* (2015) con algunas modificaciones, la bacteria se sembró en agar tripticasa de soya (TSA) para su reactivación, después de 24 h se resembraron por crecimiento masivo múltiples placas conteniendo TSA. La bacteria se recuperó con una asa bacteriológica para agregarla en solución salina (3% NaCl) estéril, hasta llegar a una absorbancia de 1 a una longitud de onda de 540 nm. Posteriormente, de esta solución se realizaron diluciones y se sembró en TCBS (agar tiosulfato citrato bilis sacarosa) para conteos y determinar la cantidad de unidades formadoras de colonias por mililitro. Los organismos fueron infectados por el método de inmersión, donde se colocó la cantidad de inóculo para una concentración de 1×10^6 UFC/mL en el agua de los tratamientos infectados (Balcázar *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2008b).

6.7 Anticoagulante de citrato trisódico

El anticoagulante se preparó agregando a un litro de agua destilada: 7.94 g de citrato trisódico, 22.4 g de NaCl y 20.71 g de glucosa (dextrosa anhidra), ajustando el pH a 7.5.

6.8 Obtención de hemolinfa

Se tomaron 100 μL de hemolinfa de la base del quinto par de pereiópodos (Fig. 4) utilizando una jeringa de insulina (1 mL, 7G x 13 mm) conteniendo 400 μL de anticoagulante de citrato trisodico (pH 7.5). Una vez recolectada la muestra se separaron 10 μL para el conteo de hemocitos y se colocaron en un tubo de 2 mL limpio y desinfectado, mientras que el resto de la hemolinfa se centrifugó a 9000 x g por 5 min para su análisis. En el bioensayo 3, el plasma se utilizó para el análisis de metabolitos plasmáticos mientras que la parte celular se almacenó agregando 500 μL de TRIzol® Reagent, para realizar la expresión del gen Mn-SOD.



Figura 4. Extracción de muestra de hemolinfa de *L. vannamei*.

6.9. Conteo total de hemocitos

El conteo se realizó utilizando un microscopio (Leica, 501094) y un hematocitómetro, aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{hemocitos por mL} = \frac{\text{hemocitos contados}}{\text{numero de cuadros contados}} \times 10000 \quad (1)$$

6.10 Análisis de parámetros plasmáticos en hemolinfa de *L. vannamei*

Para los bioensayos 1 y 2, se tomaron muestras a las: 0, 12, 24, 36 y 48 hpi, mientras que para el bioensayo 3, se tomaron muestras a los días 0, 7 y 14 de iniciado el tratamiento con las diferentes dietas y a las 24 y 48 hpi. Se utilizaron los Kits comerciales para diagnóstico RANDOX®, siguiendo las especificaciones del fabricante, colocando 10 µL de muestra (plasma) en una microplaca de 96 pozos con 300 µL de capacidad (Nunc™) más 200 µL de reactivo correspondiente y se incubaron por el tiempo indicado para cada una de ellas (Tabla VI), las placas se analizaron en el lector de microplacas Bio Rad iMark™, de acuerdo a la metodología propuesta por Sánchez-Paz *et al.* (2007).

Tabla VI. Longitud de onda, coloración y tiempo de incubación de la reacción colorimétrica para evaluar la concentración de cada metabolito

Metabolito	Longitud de onda (nm)	Coloración	Incubación (min)
Proteína (TP245)	550	Violeta	30
Colesterol (CH201)	490	Rosa	10
Triglicéridos (TR210)	490	Violeta	5-10
Lactato (LC2389)	550	Violeta	5-10
Glucosa (GL2614)	490	Rojo-violeta	10

6.11 Respuesta del sistema inmune

6.11.1 Actividad específica de Fenoloxidasa

Se colocaron 10 µL de plasma de camarón en una microplaca, más 250 µL de L-DOPA (SIGMA® D9628) (3 mg/mL), se incubó por 20 min para leer a 490 nm. Los valores de absorbancia obtenidos se normalizaron con los valores de proteína y se reportaron como actividad específica de FO por min/mg de proteína (Gollas-Galván *et al.*, 1997).

6.11.2 Actividad específica de profenoloxidasa

Se agregaron 10 μL de plasma de camarón en una microplaca, más 10 μL de tripsina y 250 μL de L-DOPA (3 mg/mL), se dejó incubar por 20 min y se leyó a 490 nm. Los valores de absorbancia obtenidos se normalizaron con los valores de proteína y se reporta como actividad específica de profenoloxida por min/mg de proteína (Gollas-Galván *et al.*, 1997).

6.11.3 Actividad de superóxido dismutasa

La actividad de SOD se determinó utilizando un kit SIGMA-ALDRICH® 19260, siguiendo las instrucciones del fabricante (Dudonné *et al.*, 2009).

6.12 Expresión de genes en PCR tiempo real (qPCR)

La extracción de ARN, se realizó utilizando TriPure SIGMA-Aldrich® (St. Louis, USA), posteriormente se leyó en un espectrofotómetro-UV Nanodrops 2000® (Thermo Scientific), utilizando el coeficiente de relación de las lecturas de absorbancia a 260/280. La integridad y pureza del ARN se verificó por electroforesis en gel de agarosa al 1% con TAE 1X. Para la síntesis de cDNA se utilizó un Kit IMPROM II™ (Promega). Se analizó el cDNA extraído de hemocitos de *L. vannamei*, utilizando una dilución 1:10 del cDNA para la técnica de qPCR. Utilizando como control endógeno 18S, F (GA AGT TTG ATC CTG GCT CAG) y R (CTA CGG CTA CCT TGT TAC GA). Se analizó la expresión del gen Mn-SOD, mediante el set de primers: Mn-SOD-f (TGG CAC AGT CAG TCC TCA GA) y Mn-SOD-r (AGA TGT GAG GTT CAA GGG CG) (García-Triana *et al.*, 2010). La qPCR se llevó a cabo en el sistema para PCR tiempo real Bio Rad® T100 utilizando SSOfast Eva Green Bio Rad®. Las amplificaciones se hicieron con un volumen de reacción de 10 µL: 5 µL de SSOfast, 1 µL de cada cebador específico (10 mM), 3 µL agua miliQ y 1 µL de cDNA. Con un perfil térmico de: 5 min a 95°C, 50 s a 57.5°C. MC de 70 °C a 90 °C cada 5 s.

6.13 Análisis estadístico

Los datos obtenidos en los bioensayos 1 y 3 fueron analizados mediante ANDEVA de una vía y la prueba a posteriori de Tukey HSD, donde se evaluaron las diferentes dietas durante el tiempo de infección con *V. parahaemolyticus*. Para el bioensayo 2, se analizaron los datos mediante MANDEVA, para evaluar la dieta, frecuencia y tiempo de infección con la bacteria, utilizando las pruebas a posteriori de Tukey y Dunnett. El bioensayo 1 se analizó en STATISTICA Star Soft®, mientras que los bioensayos 2 y 3 se analizaron en el software JMP® (Buckinghamshire, England). Valores $p < 0.05$ fueron considerados significativos.

7. RESULTADOS

7.1 Determinación de la dosis de *Dunaliella* sp. en la dieta, según respuesta fisiológica, inmune y supervivencia de *L. vannamei* durante una infección con *V. parahaemolyticus*

7.1.1 Análisis proximal del alimento

Se analizó humedad, proteína, lípidos (extracto etéreo), fibra cruda, ceniza, extracto libre de nitrógeno (ELN) y energía de las dietas preparadas para el primer bioensayo, la dieta se diseñó con el 37% de proteína (Tabla VII).

Tabla VII. Análisis proximal de las dietas a diferentes porcentajes de *Dunaliella* sp. utilizadas en el bioensayo 1 (Se indica el promedio y DE).

Muestra	Humedad (%)	Proteína (%)	Extracto etéreo (%)	Fibra cruda (%)	Cenizas (%)	ELN (%)	Energía (cal/g)
Control	7.08	37.35	7.16	1.60	8.12	45.77	4690.34
A	0.29	0.03	0.08	0.20	0.06		4.36
Control	5.46	37.51	7.04	1.57	8.12	45.77	4702.27
B	0.16	0.13	0.05	0.12	0.07		2.12
D. 1.5 %	8.30	37.36	7.11	1.17	9.41	44.96	4626.57
	0.10	0.09	0.11	0.15	0.04		6.27
D. 2 %	7.30	37.11	5.70	1.80	9.94	45.46	4597.47
	0.17	0.08	0.13	0.26	0.05		2.99
D. 2.5 %	9.20	37.38	6.73	1.20	10.39	44.30	4597.92
	0.13	0.04	0.26	0.10	0.04		4.82
D. 3 %	6.08	37.43	6.40	0.97	10.73	44.48	4569.80
	0.07	0.06	0.15	0.06	0.09		1.82

7.1.2 Supervivencia

Los organismos infectados con *V. parahaemolyticus* presentaron una alta mortalidad a las 48 hpi, con valores superiores al 80%. La dieta con 3% *Dunaliella* sp. mostró la mayor supervivencia (30.9%), seguido de la dieta con el 1.5% *Dunaliella* sp. (20.9%), mientras tanto, el control positivo (sin *Dunaliella* sp. e infectado con *V. parahaemolyticus*) presentó una supervivencia del 13.7% (Fig. 5).

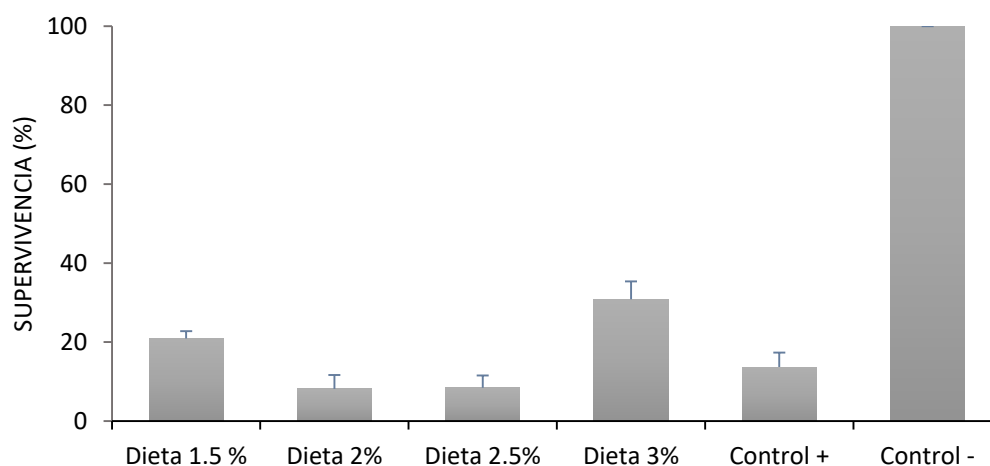


Figura 5. Supervivencia de juveniles de *L. vannamei* alimentados con *Dunaliella* sp. y retados con *V. parahaemolyticus* (1×10^6 CFU/mL). Se indica el promedio \pm DE.

7.1.3 Conteo de hemocitos

Las dietas con el 1.5 y 2% de *Dunaliella* sp. mostraron una disminución después de las 12 hpi, mientras que la dieta con el 2.5% *Dunaliella* sp. se mantiene durante la infección con *V. parahaemolyticus*, por otro lado el tratamiento control positivo mostró los valores más bajos después de las 12 hpi (Fig. 6). No se encontraron diferencias significativas entre tratamientos.

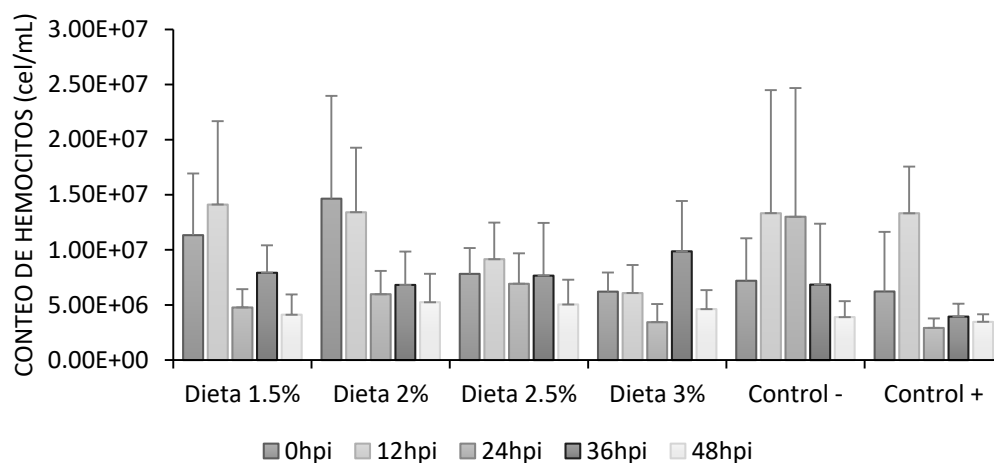


Figura 6. Conteo de hemocitos en juveniles de *L. vannamei* alimentado con *Dunaliella* sp. durante una infección con *V. parahaemolyticus*. Se indica el promedio \pm DE.

7.1.4 Proteína

No se encontraron diferencias significativas entre tratamientos (Fig. 7A), sin embargo, los niveles de proteína disminuyen a partir de las 24 hpi, incluso el control negativo, el cual presentó el valor más alto (245 mg/mL) a las 12 hpi. Por otro lado, el control positivo mostró los valores más bajos a las 48 hpi (123 mg/mL).

7.1.5 Glucosa

Los niveles de glucosa disminuyeron con el tiempo, incluso en el control negativo, alcanzando el nivel más bajo a las 48 hpi (Fig. 7B), mientras tanto, el control positivo mostró los niveles más bajos a las 48 hpi con 0.094 mg/mL y los niveles más altos se observaron en los camarones alimentados con 2% *Dunaliella* sp. a las 0 hpi (1.54 mg/mL).

7.1.6 Lactato

No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos (Fig. 7C); sin embargo, en las dietas que contienen *Dunaliella* sp. el nivel de lactato aumentó durante el tiempo de infección con *V. parahaemolyticus* y disminuyó después de las 24 hpi. El tratamiento control negativo no presentó variaciones durante los tiempos de muestreo, manteniendo sus valores entre 0.07 y 0.13 mg/mL.

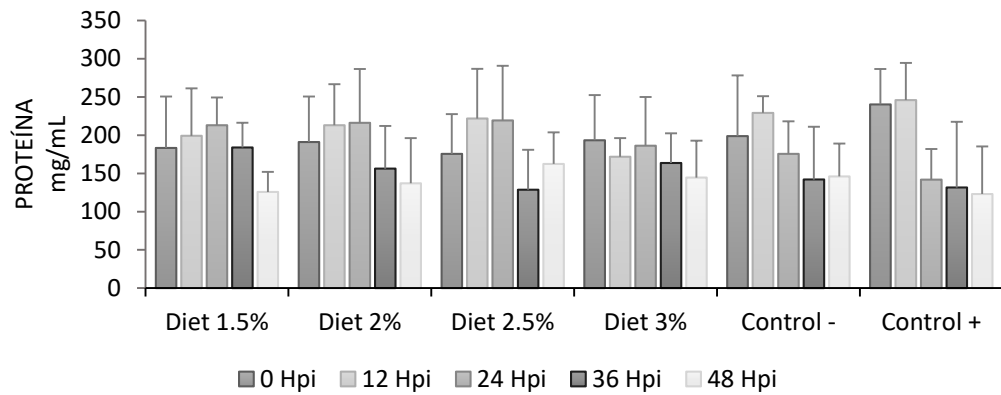
7.1.7 Colesterol

Los niveles de colesterol en plasma se mantuvieron constantes sin diferencias significativas entre tratamientos o tiempo, los valores más altos se reportaron a las 24 hpi en los camarones alimentados con las dietas 1.5 y 2% de *Dunaliella* sp. (0.76 y 0.76 mg/mL respectivamente), por su parte los camarones en el control negativo mantuvieron niveles constantes alrededor de 0.49 mg/mL (Fig. 7D).

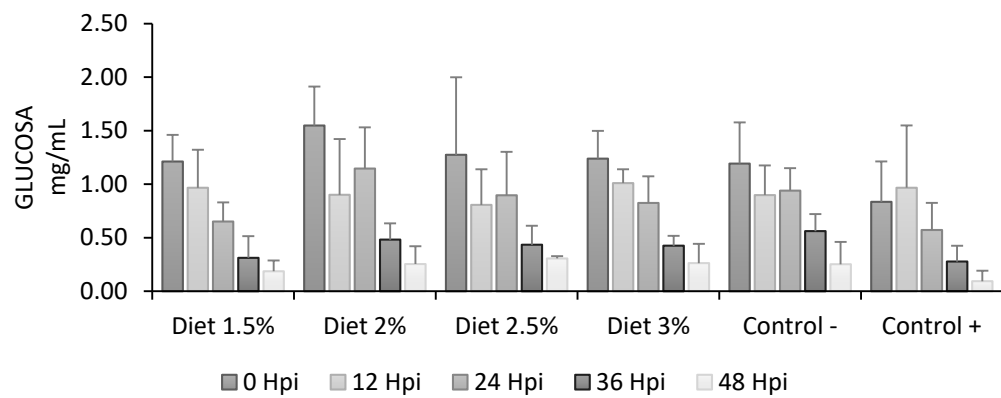
7.1.8 Triglicéridos

Altos valores de triglicéridos se encontraron en camarones alimentados con la dieta 1.5% *Dunaliella* sp. a las 12 hpi (1.10 mg/mL) con diferencias significativas ($p < 0.05$) (Fig. 7E). Los niveles de triglicéridos en el tratamiento control negativo se mantuvieron constantes (0.706 mg/mL), mientras tanto el tratamiento control positivo presentó los niveles más bajos (0.647 mg/mL).

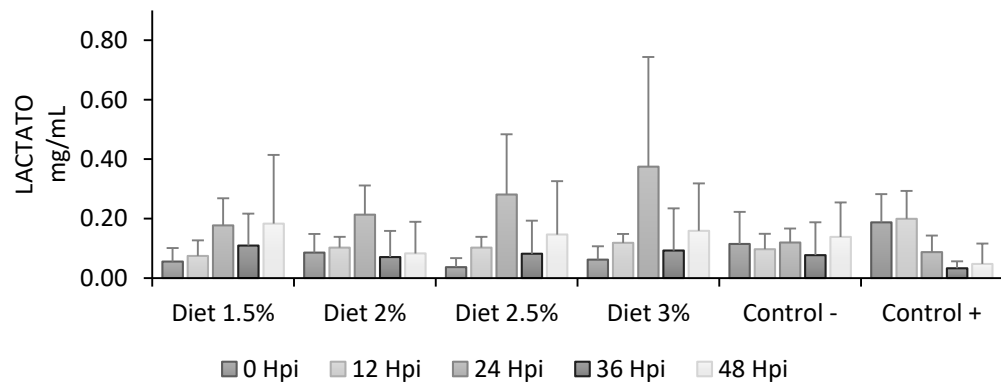
A



B



C



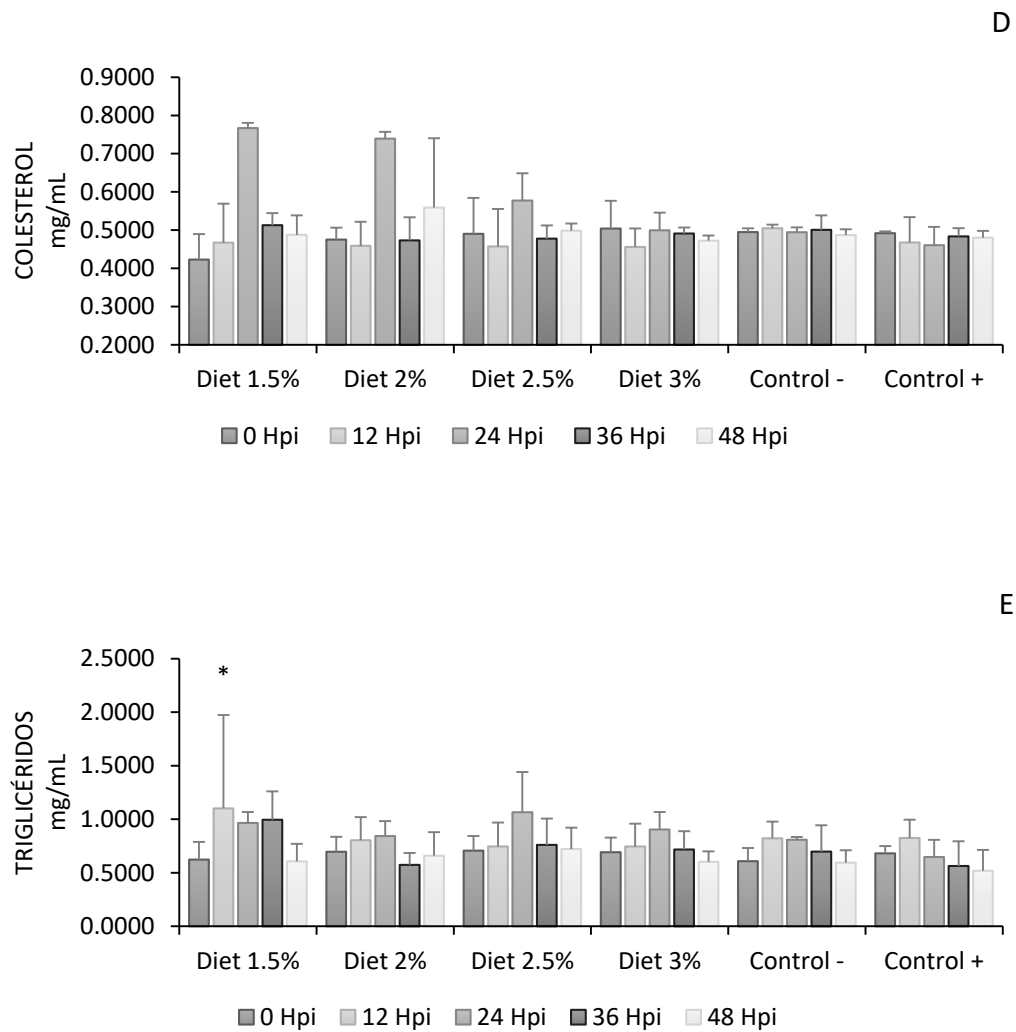


Figura 7. Niveles de proteína (A), glucosa (B), lactato (C), colesterol (D) y triglicéridos (E) en plasma de *L. vannamei* alimentado con *Dunaliella* sp. e infectado con *V. parahaemolyticus*. *diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.05$). Se indica el promedio \pm DE.

7.1.9 Profenoloxidasa y fenoloxidasa

La actividad específica de proFO alcanzó su punto más alto a las 36 hpi en las dietas que contenían *Dunaliella* sp., la dieta con 2.5% *Dunaliella* sp. presentó una actividad más alta comparada con el grupo control. La actividad de FO varió durante el tiempo de infección; en la figura 8 observamos a la dieta 3% *Dunaliella* sp. con un aumento gradual en su actividad, alcanzando su nivel más alto a las 48 hpi.

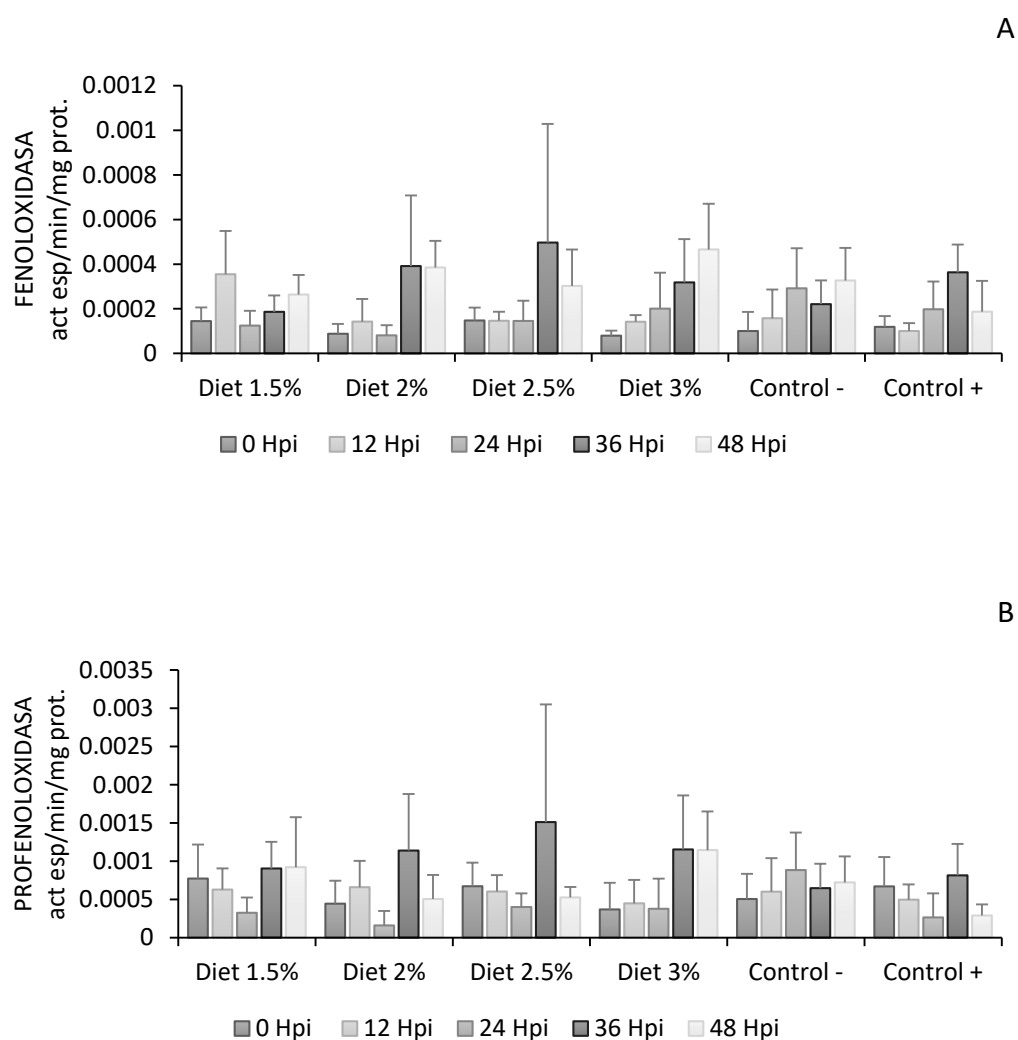


Figura 8. Actividad específica de fenoloxidasa (A) y profenoloxidasa (B) en hemocitos de *L. vannamei* alimentado con *Dunaliella* sp. e infectado con *Vibrio parahaemolyticus*. Se indica el promedio \pm DE.

7.2 Determinación de la frecuencia de administración de *Dunaliella* sp. en la dieta, según respuesta fisiológica, inmune y supervivencia de *L. vannamei* durante una infección con *V. parahaemolyticus*

7.2.1 Análisis proximal del alimento

En la tabla VIII, se presentan los resultados de humedad, proteína, lípidos (extracto etéreo), fibra cruda, ceniza, extracto libre de nitrógeno (ELN) y energía de las dietas preparadas para el segundo bioensayo, la dieta se diseñó con el 37% de proteína.

Tabla VIII. Análisis proximal de las dietas a diferentes porcentajes de *Dunaliella* sp. utilizadas en el bioensayo 2 (Se indica el promedio y DE).

Muestra	Humedad (%)	Proteína (%)	Extracto Etéreo (%)	Fibra Cruda (%)	Cenizas (%)	ELN (%)	Energía (cal/g)
<i>Dunaliella</i>	3.92	18.97	0.10	0.10	56.22	24.61	1111.64
sp.	0.04	0.22	0.00	0.00	0.00		4.09
Dieta control	7.38	36.19	7.04	0.70	7.89	48.17	4625.67
	0.15	0.12	0.05	0.10	0.02		2.05
Dieta 1.5%	8.63	36.39	7.38	0.77	8.73	46.73	4592.97
	0.06	0.11	0.08	0.06	0.03		3.92
Dieta 2%	9.15	36.40	7.44	0.77	9.15	46.24	4571.74
	0.05	0.09	0.05	0.06	0.03		1.72
Dieta 3%	7.36	36.67	7.46	0.63	9.80	45.44	4549.47
	0.07	0.07	0.06	0.06	0.04		7.86

7.2.2 Supervivencia de *L. vannamei* después de ser infectado con *V. parahaemolyticus*

Se registró una alta mortalidad para todos los tratamientos infectados con *V. parahaemolyticus* a las 48 hpi, con diferencias significativas entre tratamientos, en los tratamientos: control positivo ($p=0.0431$), 3% (1) ($p=0.0139$) y 3% (7) ($p=0.0431$) comparado con el control negativo. Los organismos alimentados con la dieta diaria al 3% de *Dunaliella* sp. reportaron la supervivencia más baja (25.5%), mientras que la dieta con el 2% de *Dunaliella* sp. administrada cada 3 (2% (3)) y 7 días (2% (7)), resultaron en la mayor supervivencia entre los tratamientos infectados (52% y 57% respectivamente) (Fig. 9); mientras que el control negativo presentó una supervivencia del 100%.

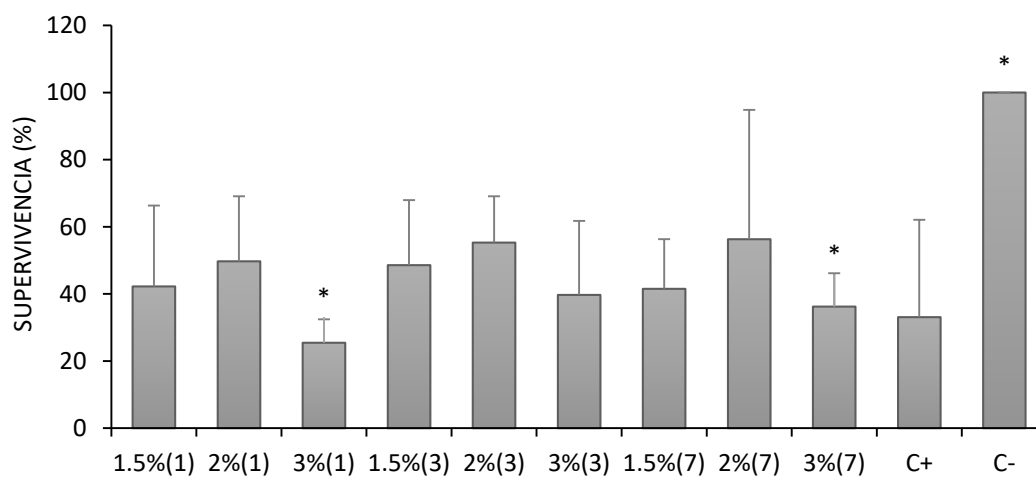


Figura 9. Supervivencia de *L. vannamei* alimentado con *Dunaliella* sp. (Frecuencia de administración de cada una de las dietas con la microalga: diaria (1), cada tercer día (3) y cada séptimo día (7)) después de 48 h de infección con *V. parahaemolyticus*. *diferencias significativas entre tratamientos ($p<0.05$). Se indica el promedio \pm DE.

7.2.3 Conteo de hemocitos

En cuanto al conteo de hemocitos, se reportaron diferencias significativas ($p=0.0001$) entre los tratamientos. La dieta con el 3% (3) con el conteo de hemocitos más alto ($11\,237\,500$ cel/mL), mientras que el control negativo (C-) presentó la menor concentración de hemocitos ($2\,458\,333$ cel/mL) con poca variación en el tiempo (Fig. 10); el conteo de hemocitos en la dieta con el 3% *Dunaliella* sp. en todas las frecuencias de administración disminuyó después de 24 hpi.

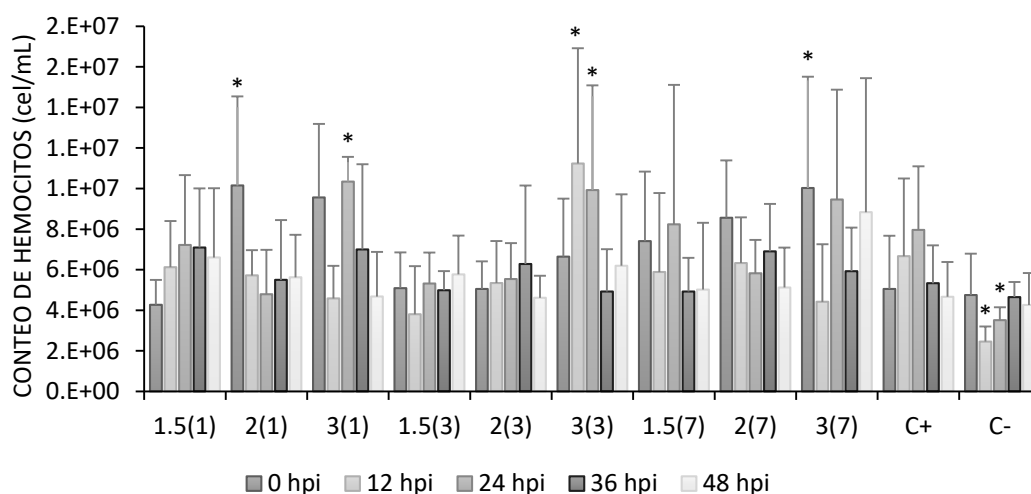


Figura 10. Conteo de hemocitos (cel/mL) en hemolinfa de *L. vannamei* alimentado con *Dunaliella* sp. durante una infección con *V. parahaemolyticus*. *diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.05$). Se indica el promedio \pm DE.

7.2.4 Proteína

Se reportaron diferencias significativas entre tratamientos ($p=0.0248$). Un nivel alto de proteína en plasma de *L. vannamei* (266 mg/mL) se reportó a las 12 hpi en camarones alimentados con la dieta 2% (7), mostrando diferencias significativas en comparación con las dietas: 2% (1) ($p=0.0221$), C- ($p=0.0254$) y 3% (3) ($p=0.0288$), mientras que el nivel más bajo (56 mg/mL) se observó en la dieta 3% (1) a las 48 hpi. Los niveles de proteína en

organismos del control positivo disminuyeron después de 12 hpi y permanecieron constantes durante el resto del experimento (Fig. 11A).

7.2.5 Glucosa

No se reportan diferencias significativas entre las dietas de *Dunaliella* sp. y los grupos control ($p > 0.05$); los niveles se mantuvieron constantes entre 1.3 y 1.5 mg/mL después de la infección con *V. parahaemolyticus* y se observó una disminución a los 12 hpi en todas las dietas (Fig. 11B). En la figura 12A podemos observar una relación entre lactato y glucosa a 0 hpi en la dieta 2% (7) con un coeficiente de correlación (r) de 0.7171 ($p = 0.1087$) y la dieta 3% (7) con $r = 0.4585$ ($p = 0.3604$), mientras que la figura 12B muestra esta relación a 48 hpi donde los niveles de glucosa aumentan junto con los niveles de lactato en la dieta 2% (7) con un $r = -0.3438$ ($p = 0.500$). Así mismo, en los tiempos 0 y 48 hpi observamos una correlación positiva en los niveles de glucosa y lactato en los tratamientos 1.5% (7) con $r = -0.8242$ ($p = 0.866$).

7.2.6 Lactato

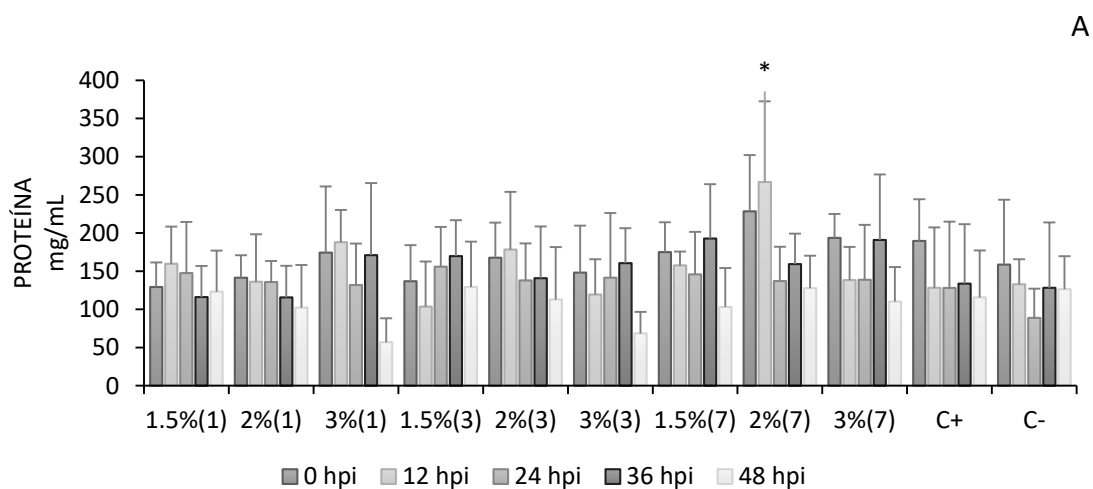
Se presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre tratamientos en la concentración de lactato en plasma. Se observó una variación alta antes de la infección (0 hpi) en todos los tratamientos, excepto en los grupos control. Los valores más altos se observaron para las dietas: 2% (7) (0.88 mg/mL) y 3% (7) (0.84 mg/mL), ambos a 0 hpi (Fig. 11C), donde se produjo una disminución drástica de la concentración de lactato a las 12 hpi. El control negativo no mostró cambios importantes a lo largo del tiempo, mientras que el control positivo reportó una disminución drástica a los 48 hpi.

7.2.7 Colesterol

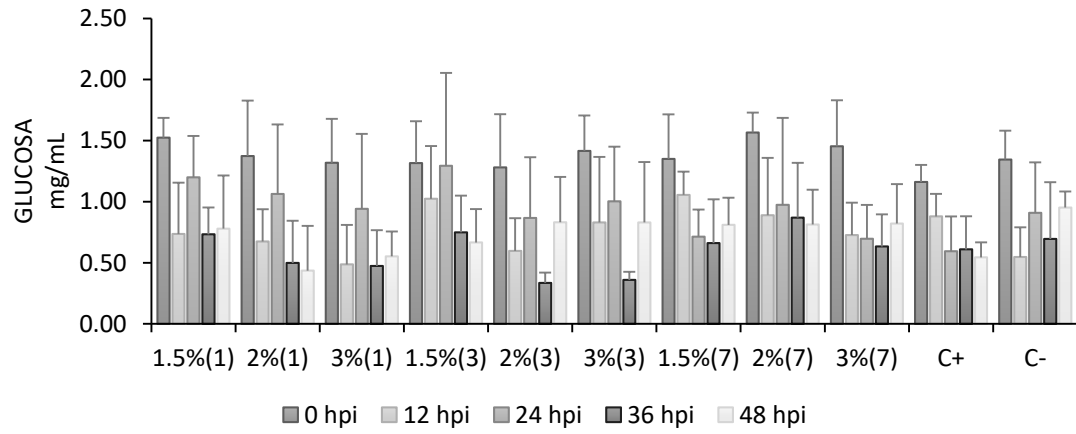
Al final de la fase de infección, todos los niveles de colesterol eran más bajos que los observados a las 0 hpi (Fig. 11D). Valores significativamente altos se alcanzaron a 0 hpi, para todas las dietas, mostrando diferencias durante la infección entre las dietas 1.5% ($p=0.0054$), 2% ($p=0.0067$) suministrados diariamente y la dieta 2% (7) ($p=0.0335$) comparado con control negativo. La dieta 2% (3) registró el mayor nivel de colesterol en el plasma (0.78 mg/mL) a las 0 hpi, disminuyendo drásticamente después de eso con diferencias significativas en comparación con otros tratamientos ($p<0.05$).

7.2.8 Triglicéridos

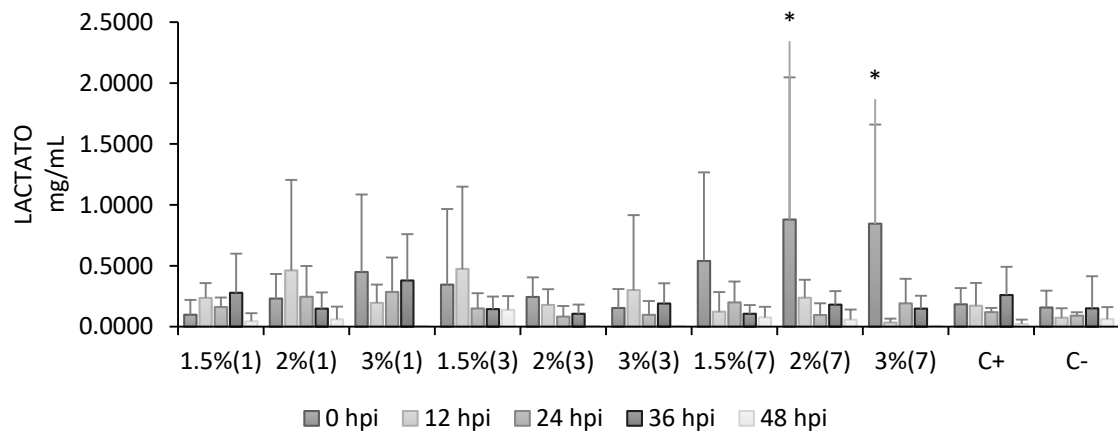
La concentración plasmática de triglicéridos en *L. vannamei* permanece constante a lo largo de la infección con *V. parahaemolyticus*, sin embargo, a las 48 hpi en las dietas que contienen la microalga *Dunaliella* sp., se presentó un incremento drástico, con diferencias significativas ($p=0.0001$). Por otro lado las dietas control mantienen constantes sus concentraciones de triglicéridos, siendo el tratamiento C- el que mostró los niveles más bajos (0.6077 mg/mL) a las 48 hpi (Fig. 11E).



B



C



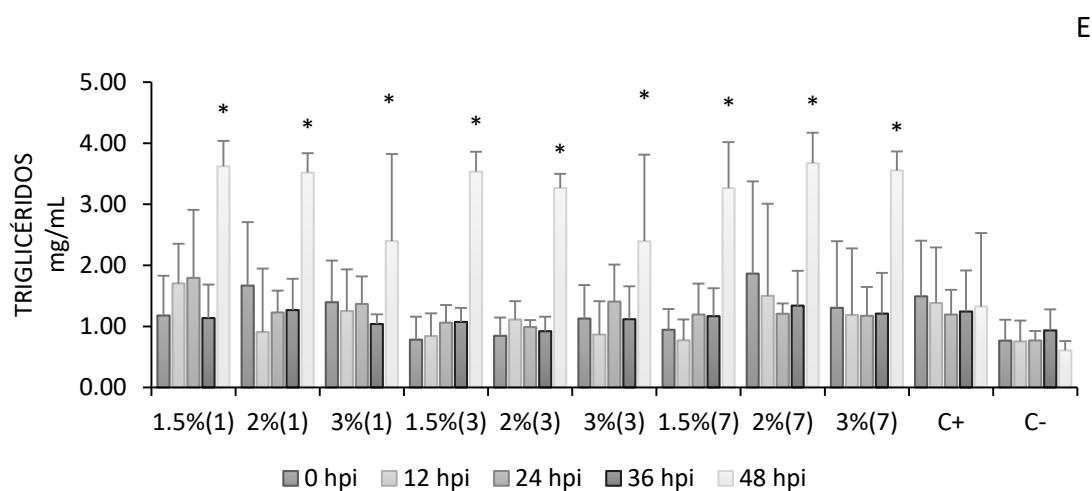
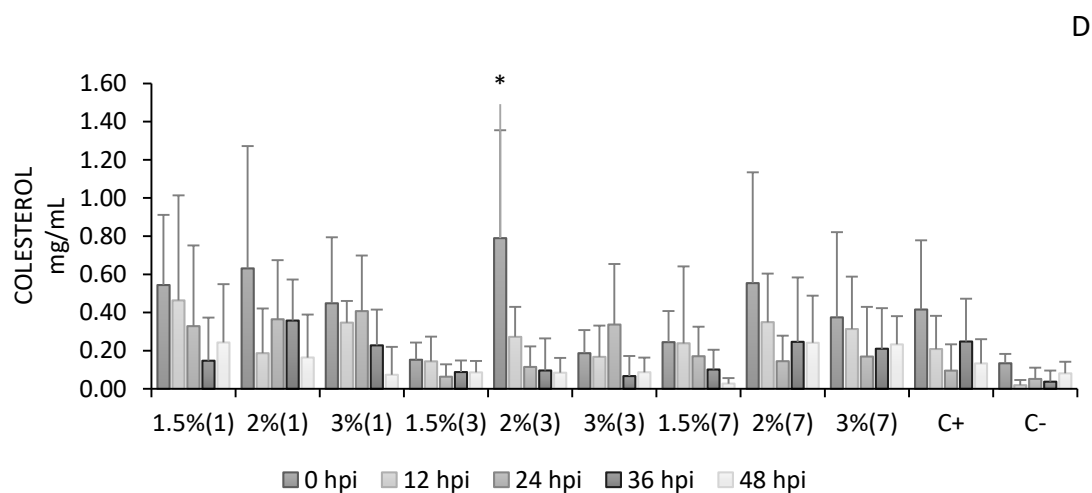


Figura 11. Actividad de proteína (A), glucosa (B), lactato (C), colesterol (D) y triglicéridos (E) en plasma de *L. vannamei* alimentado con *Dunaliella* sp. durante una infección por *V. parahaemolyticus* en todas las dietas (frecuencia). *Diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$). Se indica el promedio \pm DE.

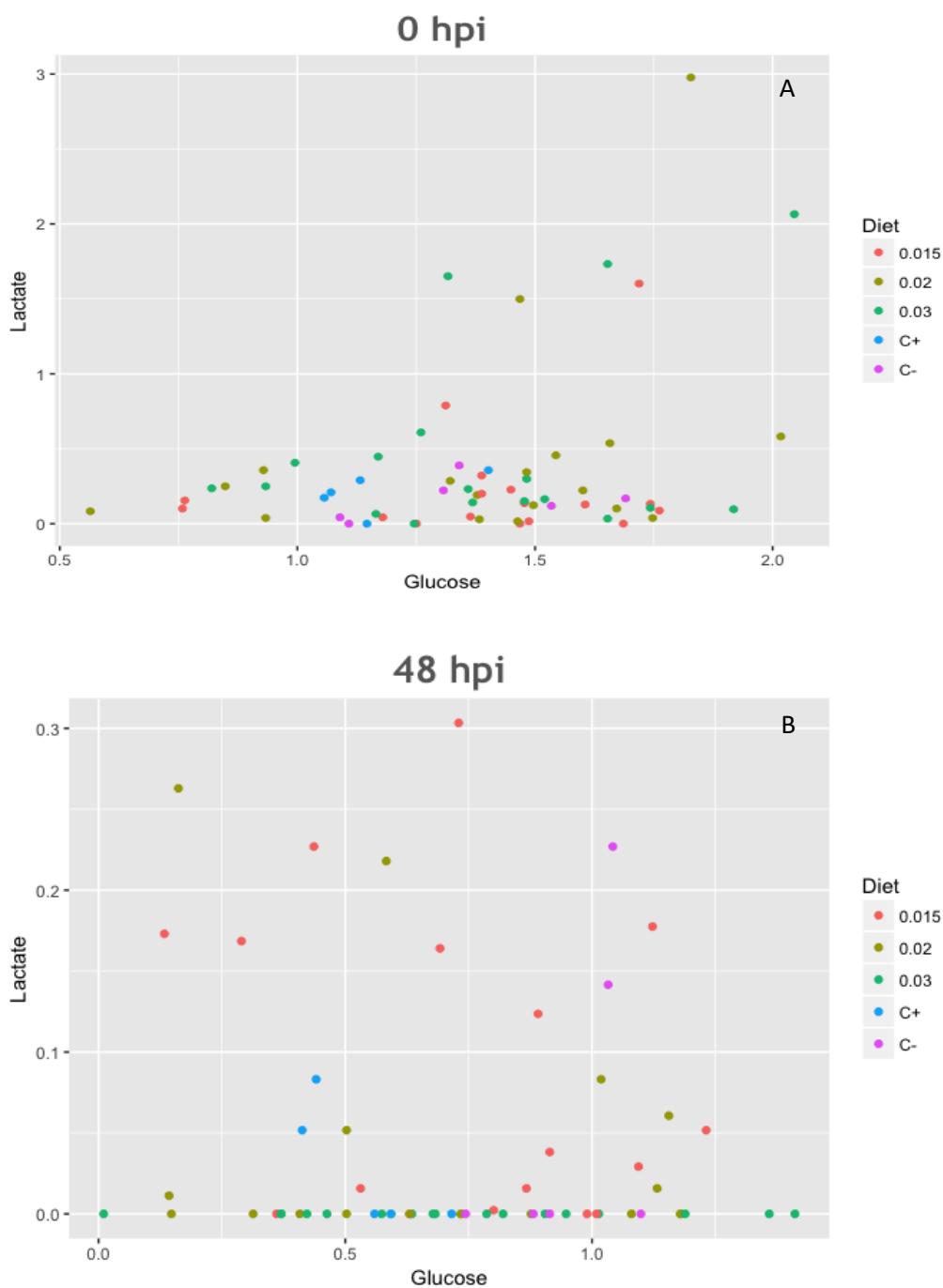


Figura 12. Diagrama de dispersión de los valores de lactato y glucosa (mg/mL) en plasma de *L. vannamei* alimentado con *Dunaliella* sp. e infectado con *V. parahaemolyticus*. A las 0 hpi (A) y 48 hpi (B). *Dieta 1.5% en rojo, dieta 2% en café, dieta 3% en verde, C+ en azul y C- en morado.

7.2.9 Profenoloxidasa

Se observó una alta actividad de la enzima FO al activarse la proFO en los camarones infectados, comparando con los grupos controles. Así mismo, reportamos diferencias estadísticas entre las dietas: 1.5%, 2% y 3% alimentados diariamente ($p=0.0133$) (comparando las diferencias entre los tiempos 0 y 48 hpi). Organismos alimentados con la dieta 3% (3) mostraron la actividad más alta (0.0018 act. esp/min/mg de prot.), así mismo, organismos alimentados con las dietas 3% *Dunaliella* sp. diariamente y cada 3 días aumentaron la actividad de proFO a las 48 hpi (Fig. 13A).

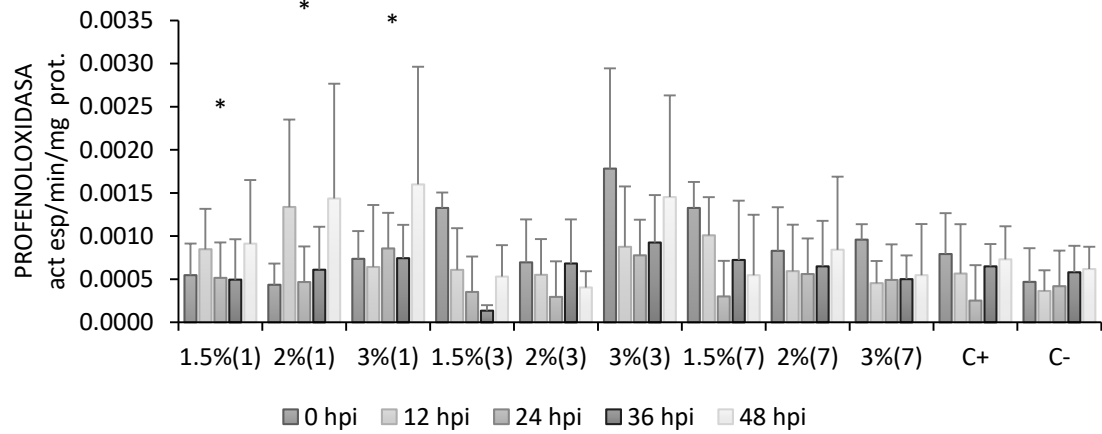
7.2.10 Fenoloxidasa

Al comparar las diferencias en la actividad de la enzima FO a las 0 y 48 hpi se reportaron diferencias significativas ($p=0.0180$), específicamente en las dietas del 1.5% (3) y el 3% (1) en donde los valores de la actividad pasan por grandes cambios a través de la infección con *V. parahaemolyticus*. Mientras tanto, los organismos alimentados con dietas al 3% de *Dunaliella* sp. en todas las frecuencias de administración, presentaron la mayor actividad a las 48 hpi, la actividad de FO disminuyó cuando la frecuencia de administración de la microalga en la dieta es menor (Fig. 13B). Por otro lado, el C- no mostró ningún cambio importante con el tiempo.

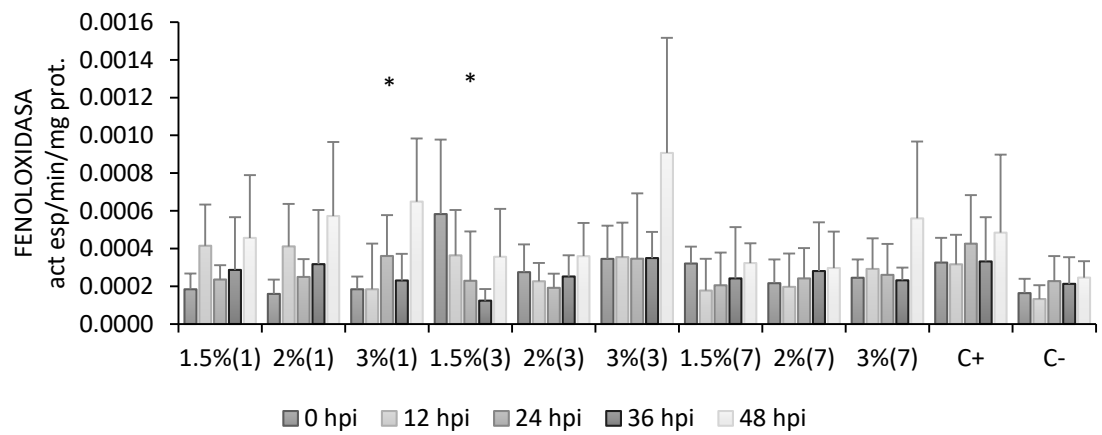
7.2.11 Superóxido dismutasa

Respecto a la actividad de la enzima SOD, no se encontraron diferencias durante el tiempo de infección o entre tratamientos ($p>0.05$). El control positivo mostró menor porcentaje de actividad a las 0 hpi (52.73%). En general la actividad de SOD se mantuvo constante con valores superiores al 70%. Mientras tanto, el control negativo se mantiene fluctuante durante el tiempo de experimento (Fig. 13C).

A



B



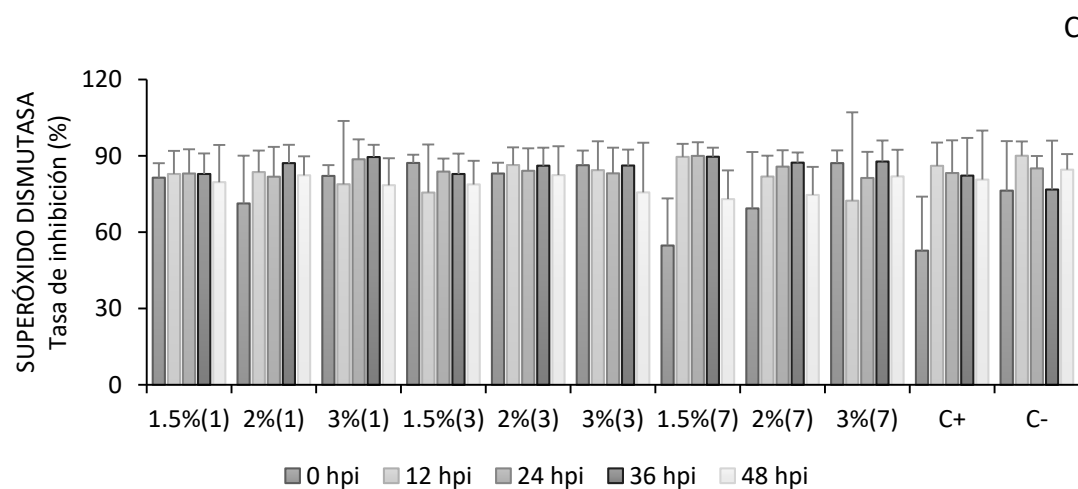


Figura 13. Actividad específica de profenoloxidasa (A), fenoloxidasa (B) y superóxido dismutasa (C) en *L. vannamei* alimentado con *Dunaliella* sp. durante una infección por *V. parahaemolyticus* en todas las dietas (frecuencia). *Diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$). Se indica el promedio \pm DE.

7.3 Evaluación de la respuesta fisiológica y expresión del gen Mn-SOD en *L. vannamei* alimentado con *Dunaliella* sp. y β -glucano durante una infección con *V. parahaemolyticus*.

7.3.1 Análisis proximal del alimento

En la tabla IX, se presentan los resultados de humedad, proteína, lípidos (extracto etéreo), fibra, ceniza, extracto libre de nitrógeno (ELN) y energía de las dietas preparadas para el tercer bioensayo, la dieta se diseñó con el 35% de proteína.

Tabla IX. Análisis proximal de las dietas a diferentes porcentajes de *Dunaliella* sp. utilizadas en el bioensayo 3 (Se indica el promedio y DE).

Muestra	Humedad (%)	Proteína (%)	Extracto etéreo (%)	Fibra cruda (%)	Cenizas (%)	ELN (%)	Energía (cal/g)
Control	7.41 0.10	34.46 0.03	6.83 0.07	0.33 0.06	9.24 0.11	49.13	4426.59 1.90
Dieta β -glucano	7.69 0.09	34.57 0.21	6.60 0.05	0.23 0.06	9.18 0.03	49.42	4421.16 1.23
Dieta <i>Dunaliella</i>	7.28 0.06	34.35 0.03	6.70 0.05	0.67 0.06	10.02 0.01	48.26	4341.43 6.56

7.3.2 Supervivencia de *L. vannamei* infectado con *V. parahaemolyticus*

No se reportan diferencias significativas para la supervivencia de *L. vannamei*, sin embargo, el control positivo presentó la supervivencia más baja del 79.5%, seguido de la dieta con el 1.1% de β -glucano con el 87.5% y la dieta 2% *Dunaliella* sp. con la supervivencia más alta del 92.9% (Fig. 14).

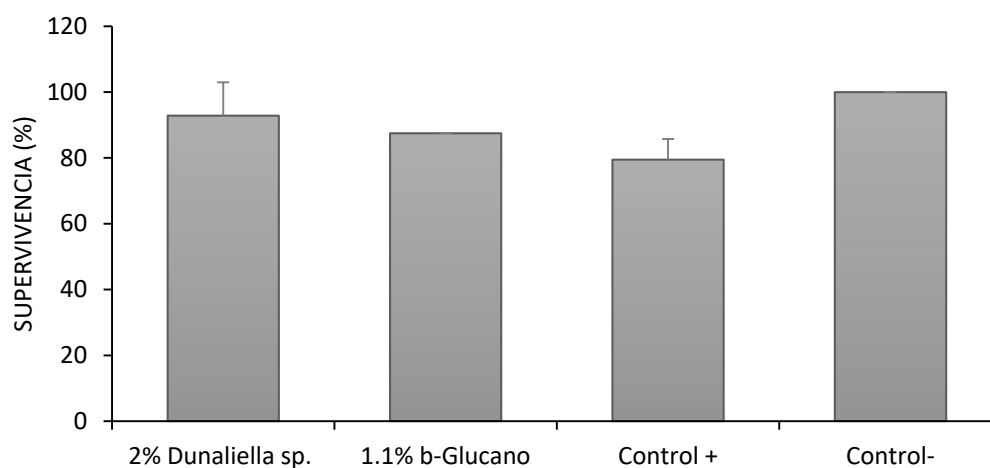


Figura 14. Supervivencia de *L. vannamei* después de 72 horas infectado con *V. parahaemolyticus*.

7.3.3 Conteo de hemocitos

El conteo de hemocitos fue superior en organismos infectados con *V. parahaemolyticus* a las 24 y 48 hpi (Fig. 15). Los camarones alimentados con *Dunaliella* sp. e infectados con la bacteria mostraron una mayor concentración de hemocitos que el grupo alimentado también con *Dunaliella* sp. sin infección con *V. parahaemolyticus* (*Dunaliella* sp. negativo). No se reportan diferencias significativas.

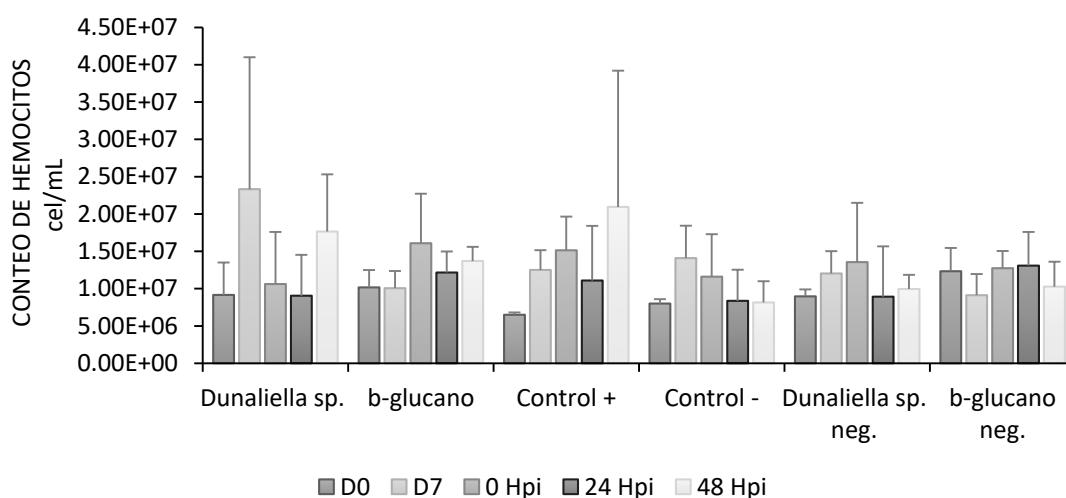


Figura 15. Conteo de hemocitos en *L. vannamei* alimentado con 2% *Dunaliella* sp. y 1.1% de β -glucano cada tercer día, a los días 0 y 7, así como a las 24 y 48 hpi con *V. parahaemolyticus*.

7.3.4 Proteína

Los niveles de proteína en plasma fueron similares entre tratamientos, sin embargo, la concentración de proteína en organismos infectados con *V. parahaemolyticus* a las 48 hpi son menores que los reportados en los controles no infectados. Las dietas con el 1.1% β -glucano y 2% *Dunaliella* sp., presentan un aumento gradual en la concentración de proteína en los días previos a la infección con la bacteria (Fig. 16A).

7.3.5 Glucosa

La concentración de glucosa en plasma de *L. vannamei* disminuyó a las 48 hpi en los tratamientos infectados con *V. parahaemolyticus*, mientras que en las dietas con inmunoestimulantes y sin infección con *V. parahaemolyticus* se mantuvo durante la infección. La concentración más alta la encontramos en el control negativo de *Dunaliella* sp. al día 7 de iniciado el experimento (Fig. 16B).

7.3.6 Lactato

Los niveles de lactato en plasma disminuyeron después de iniciado el experimento en todas las dietas, en la figura 16C se observa un ligero aumento después de la infección con *V. parahaemolyticus*, el tratamiento control negativo mantiene los niveles de lactato a través del tiempo de muestreo. La dieta con *Dunaliella* sp. e infectada con *V. parahaemolyticus* mostró una disminución en los niveles a las 24 hpi (0.02 mg/mL), mientras que la dieta con *Dunaliella* sp. y sin infección, mostró niveles mayores (0.05 mg/mL).

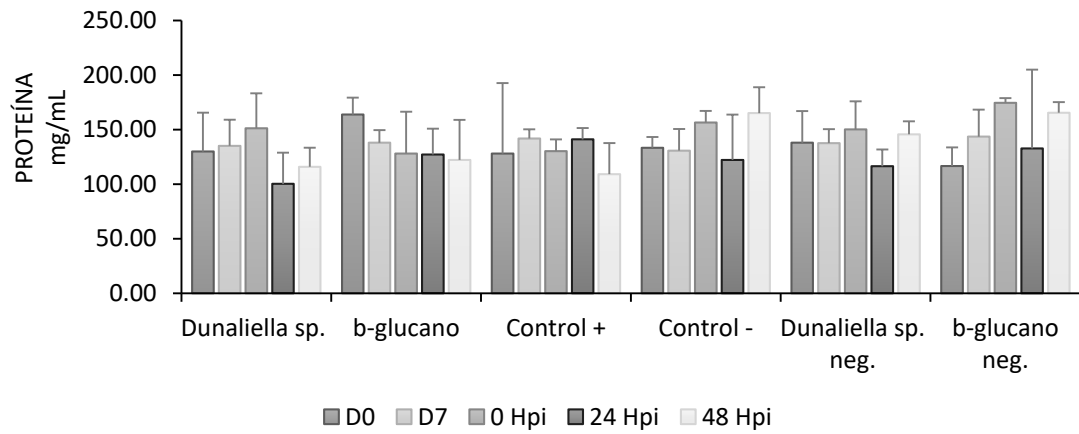
7.3.7 Colesterol

La dieta adicionada al 2% *Dunaliella* sp. presentó concentraciones de colesterol bajas (0.04 mg/mL) al iniciar el bioensayo (D0), los niveles de colesterol en plasma aumentan gradualmente alcanzando niveles máximos (0.28 mg/mL) a las 48 hpi. Por otro lado, la dieta 1.1% β -glucano mantuvo los niveles constantes. El control positivo disminuyó significativamente después de la infección con *V. parahaemolyticus*. No se observaron diferencias significativas entre tratamientos (Fig. 16D).

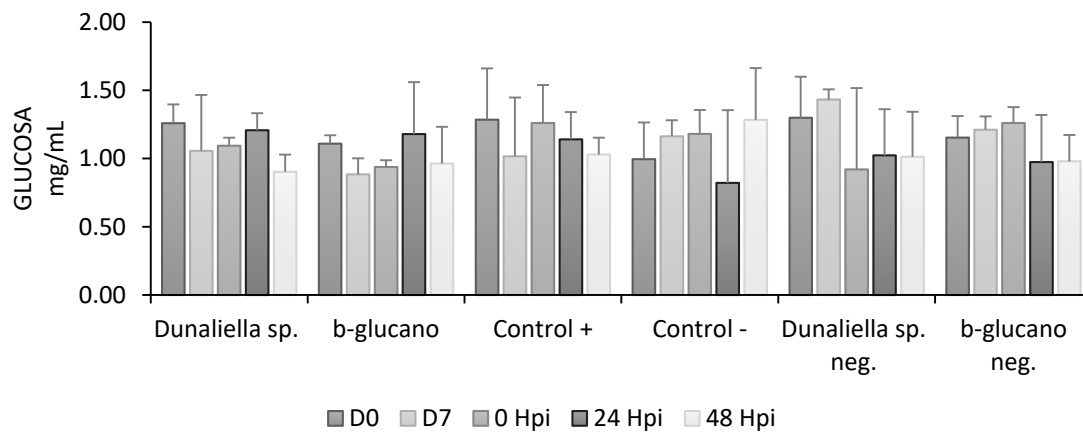
7.3.8 Triglicéridos

La dieta 1.1% β -glucano e infectadas con *V. parahaemolyticus* mantuvo estables los niveles de triglicérido en plasma durante la infección, por otra parte, el tratamiento control positivo mostró una disminución a las 48 hpi, mientras que la dieta 2% *Dunaliella* sp. alcanzó mayores niveles a las 24 y 48 hpi comparado con el tratamiento *Dunaliella* sp. negativo (Fig. 16E).

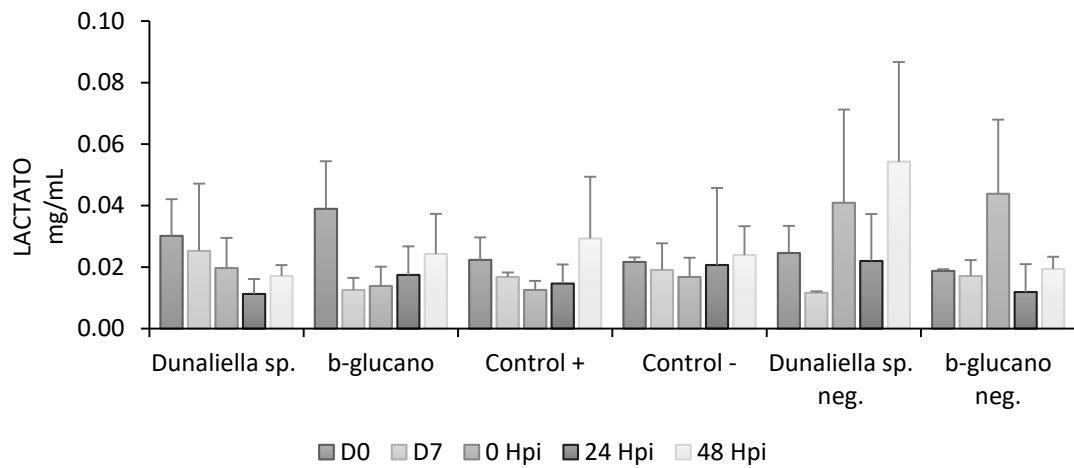
A



B



C



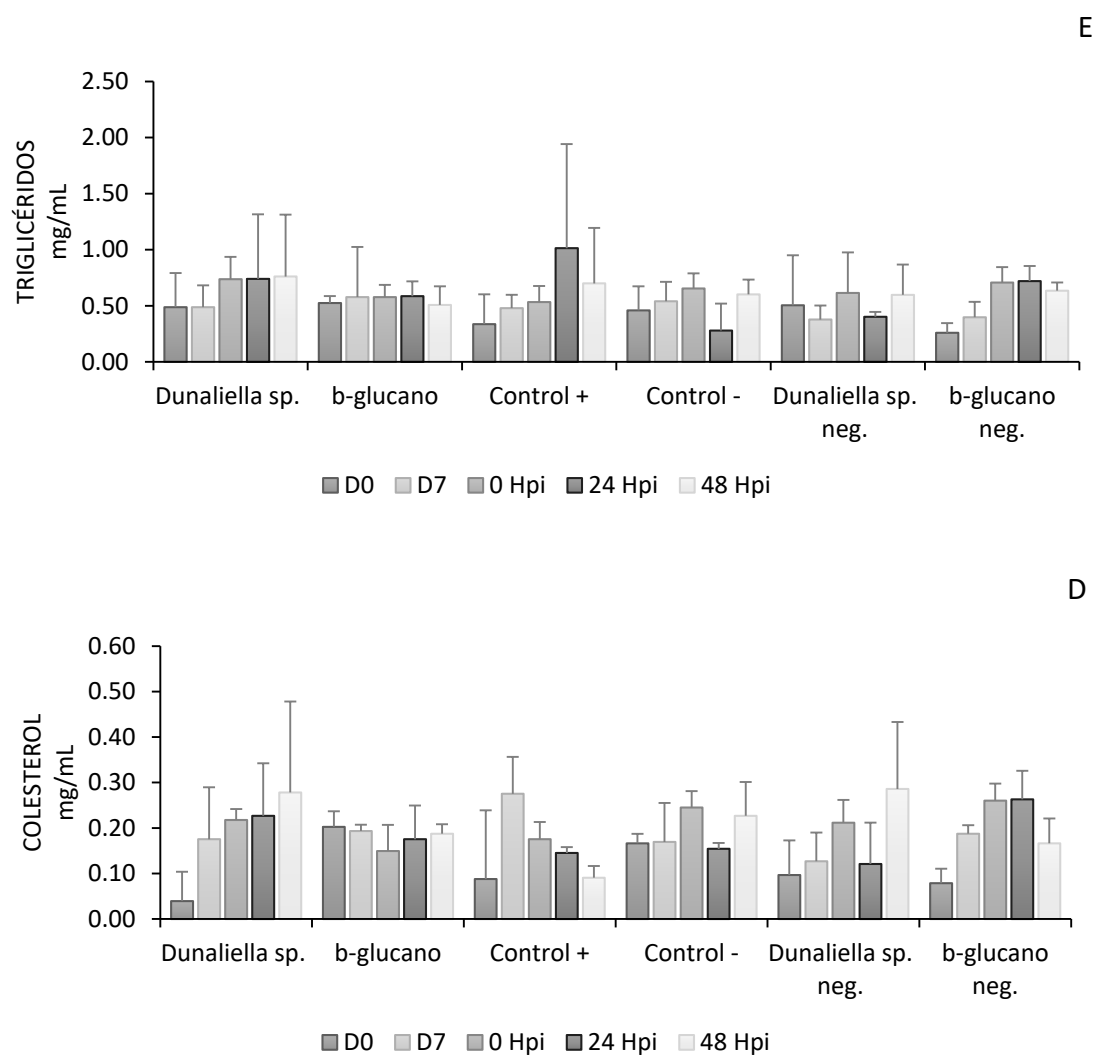


Figura 16. Valores de proteína (A), glucosa (B), lactato (C), colesterol (D) y triglicéridos (E) en plasma de *Litopenaeus vannamei* alimentado con 2% *Dunaliella* sp. y 1.1% β -glucano en la dieta e infectado con *Vibrio parahaemolyticus*.

7.3.9 Expresión relativa del gen Mn-SOD

Se reportaron diferencias significativas ($p < 0.05$) al día 7 de iniciado el experimento, donde la expresión fue 25 veces mayor que en otros tiempos (Fig. 17). A las 48 h de infección con la bacteria la expresión de SOD fue mayor en los tratamientos con *Dunaliella* sp. (3.52) y β -glucano (3.27) comparado con el tratamiento control positivo (0.95).

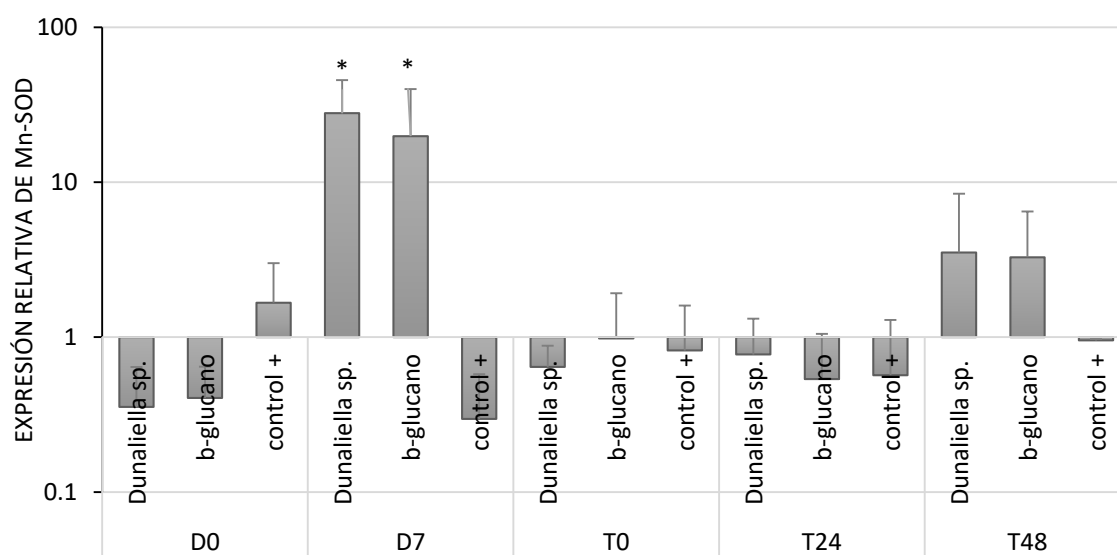


Figura 17. Expresión relativa de genes superóxido dismutasa (Mn-SOD) en *L. vannamei* alimentado con 2% *Dunaliella* sp. y 1.1% de β -glucano en la dieta e infectado con *V. parahaemolyticus*. (Expresión se muestra como expresión normalizada con el gen endógeno 18S) *Diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$).

8. DISCUSIÓN

8.1 Concentración de β -carotenos en *Dunaliella* sp.

Los carotenoides naturales producidos por la microalga *Dunaliella* sp. han sido evaluados en acuicultura para ser utilizados como fuente de antioxidantes; aunque el camarón blanco *L. vannamei* no sintetiza carotenos, puede utilizar los carotenos disponibles en la dieta y depositarlos en sus tejidos (Boonyaratpalin *et al.*, 2001; Dall, 1995; Supamattaya *et al.*, 2005), una vez consumidos, el β -caroteno es convertido en astaxantina a través de la vía isocryptoxanthin, echinenone, cantaxantina y 3-hidroxi-cantaxantina para ser almacenado en tejido (Tanaka *et al.*, 1976).

Los carotenoides han sido utilizados en la acuicultura por sus múltiples beneficios como: pigmentos naturales, su función antioxidante, provitamina A, protección celular, así como el aumento en el crecimiento y potencial reproductivo (Liñán-Cabello *et al.*, 2002). Cuando la microalga *Dunaliella* sp. crece en un medio bajo en nitratos, el pH aumenta, por lo que el medio se alcaliniza promoviendo la precipitación de sales de sulfato o fosfato, provocando un estado de deficiencia, como consecuencia las células disminuyen su actividad fotosintética y por consiguiente el exceso de irradiación causa daño celular, por lo tanto la célula aumenta la producción de carotenos y xantofilas como un posible fotoprotector (Serpa-Ibáñez y Calderón-Rodríguez, 2006). La microalga *Dunaliella* sp. utilizada para la preparación de las dietas en el primer bioensayo, presentó una concentración de β -caroteno de 0.157 mg/mL, en segundo bioensayo, la concentración fue de 0.52 mg/mL y para el tercer bioensayo de 0.329 mg/mL, valores que son significativamente mayores que el reportado por Cifuentes *et al.* (1996) para *Dunaliella salina* en un medio de cultivo limitado en nitrógeno (0.0358 mg/mL) y más altas aún que las reportadas por López-Elías *et al.* (2013) para *Dunaliella tertiolecta* en medio f/2 (0.0054 mg/mL).

La microalga *Dunaliella* sp. con altas concentraciones de β -caroteno es conocida por mejorar la respuesta del sistema inmune en el camarón, lo que lleva a la producción de organismos

más resistentes a enfermedades, al reforzar el sistema enzimático antioxidante de hemocitos (López-Elías *et al.*, 2016; Medina-Félix *et al.*, 2014). Los carotenos son los inhibidores biológicos más eficaces de radicales libres, estos tiene la capacidad de causar daño celular y en material genético (Beutner *et al.*, 2001). Así mismo, Madhumathi y Rengasamy (2011) concluyeron que la administración oral de *Dunaliella salina* en el alimento de *L. monodon* es un agente profiláctico para disminuir la mortalidad por WSSV.

8.2 Supervivencia de *L. vannamei* infectado con *V. parahaemolyticus*

La mortalidad ocasionada por *V. parahaemolyticus* en los dos primeros bioensayos fue muy severa, en el bioensayo 1, los camarones infectados mostraron una mortalidad rápida, con valores superiores al 80% a las 48 hpi, la dieta con 3% de *Dunaliella* sp. presentó la mayor supervivencia con el 30.9%. Lomelí-Ortega y Martínez-Díaz (2014) infectaron a *L. vannamei* con *V. parahaemolyticus* (2×10^6 UFC/mL) utilizando un bacteriófago (A3S y Vpms1) como inmunoestimulante y reportaron una supervivencia del 80% contra el 59% en el control infectado, por otro lado, cuando *L. vannamei* es infectado con *V. alginolyticus* aunado a estrés salino, la mortalidad fue del 100% (Chang-Che *et al.*, 2010). Mientras que Li *et al.* (2008a), infectaron a *L. vannamei* con la misma bacteria (1×10^6 UFC/mL) reportando una mortalidad del 62% después de 14 días de infección, aunque en ambas investigaciones se reportaron valores de mortalidad muy elevados, la patogenicidad entre cepas puede variar, incluso siendo la misma especie.

Como mencionamos anteriormente, la tasa de mortalidad a consecuencia de la bacteria *Vibrio* es muy relativa, ya que depende de muchos factores, como el medio ambiente, el estado de salud de los organismos y la virulencia de la cepa, por tal motivo, para el bioensayo 2, se repitió la adición de algunos porcentajes de *Dunaliella* sp. en el alimento, que no quedaron muy claros en el primer bioensayo, obteniendo resultados opuestos en la dieta con el 3% *Dunaliella* sp., ya que los inmunoestimulantes no mostraron una relación lineal del efecto de la dosis, a menudo muestran una respuesta máxima distinta a una concentración intermedia e incluso una ausencia total del efecto o un efecto tóxico adverso a una concentración alta

(Sajeevan *et al.*, 2009). Para el bioensayo 2, se buscaba encontrar una relación dosis/frecuencia para obtener los mejores resultados en supervivencia y respuesta fisiológica e inmune en *L. vannamei*. En la Fig. 8, observamos una alta mortalidad en los tratamientos infectados con *V. parahaemolyticus*, la dieta con el 3% *Dunaliella* sp. administrada diariamente, mostró la mortalidad más alta, contrario a lo obtenido en el bioensayo 1, esto nos indica el efecto negativo que tiene la sobre estimulación en los organismos, en este caso la administración excesiva de la microalga rica en β -caroteno. Por otro lado, la dieta con el 2% *Dunaliella* sp. independientemente de la frecuencia de administración, presentó una supervivencia superior al 49%, en comparación con el 33% reportado para el control positivo.

Una vez que se estableció la relación dosis/frecuencia en el alimento de *L. vannamei*, se comparó con un inmunoestimulante comercial, como lo es el β -glucano, a una dosis de 1.1% y administrada a la misma frecuencia que se administró la microalga (cada tercer día), no se reportaron diferencias significativas entre dietas. Por otra parte, en el bioensayo 3, se utilizaron organismos de mayor tamaño (19.2 g), lo que los hace más resistentes, esto explica la alta supervivencia comparada con los bioensayos anteriores, donde se utilizaron organismos de menor talla (Soto-Rodríguez *et al.*, 2015).

La patogenicidad de *V. parahaemolyticus* utilizada en esta investigación fue muy severa, se ha reportado anteriormente que la patogenicidad para diferentes cepas de *Vibrio* puede ser muy variante; por ejemplo, una cepa de *V. parahaemolyticus* identificada en India no poseía algunas regiones específicas encontradas en *V. parahaemolyticus* causante de AHPND, pero el aislamiento consistente de bacterias en camarones moribundos mostró que esta bacteria era la causa de muerte, por lo que concluyeron que los determinantes de virulencia podrían variar entre cepas (Kumar *et al.*, 2014), esto significa que las bacterias pueden ser mortales por sí mismas. Dada la alta mortalidad obtenida en los bioensayos 1 y 2, los datos nos dan evidencia de que la cepa de *V. parahaemolyticus* utilizada en este trabajo es muy letal, mientras que el tamaño de los organismos aunado al efecto de la microalga en el bioensayo 3 jugó un papel importante a la resistencia contra la bacteria.

En el estudio realizado por Madhumathi y Rengasamy (2011) se evaluaron las concentraciones del 1 y 2% de *Dunaliella salina* en el alimento de *P. monodon* y concluyeron que esta microalga es un agente potencial de protección contra la infección por WSSV, ya que aumentó la respuesta inmune en los organismos. Como se pudo observar en este trabajo, en los tres bioensayos, la microalga *Dunaliella* sp. adicionada en el alimento favoreció a la supervivencia respecto a los camarones del grupo control. Así mismo, López-Elías *et al.* (2016) sugirieron el uso de *Dunaliella* sp. en la dieta *L. vannamei* para mejorar la respuesta del sistema inmune, reportando 80% de supervivencia con la inclusión del 1% de *Dunaliella* sp. en comparación con el 56% de supervivencia en el grupo control infectado con WSSV.

8.3 Conteos de hemocitos en hemolinfa de *L. vannamei*

En el primer bioensayo la concentración de hemocitos disminuyó a las 24 hpi, lo cual se justifica con el papel tan importante que juegan los hemocitos en el sistema inmune del camarón, comenzando por la fagocitosis, la encapsulación y la formación de nódulos. En el proceso de fagocitosis se desencadena la explosión respiratoria que involucra la liberación de enzimas degradativas y productos intermedios de oxígeno como anión superóxido (O_2^-), radical hidroxilo (OH), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radicales libres del oxígeno y SOD como productos principales de este proceso (Li *et al.*, 2008a). En el segundo bioensayo, se observaron concentraciones elevadas de hemocitos comparadas con el control negativo, y al igual que el bioensayo anterior se presentó una disminución en la concentración a partir de las 24 hpi, resultados similares a los reportados por Hsieh *et al.* (2008) después de 12 hpi con la bacteria *V. alginolyticus* en *L. vannamei*. Así mismo, Mugnier *et al.* (2013), reportaron concentraciones de hemocitos de hasta 30 millones de cel/mL, en *L. stylirostris* cultivado en granja en organismos sanos, con una disminución del 50% en organismos infectados con *Vibrio*.

Por otro lado en el tercer bioensayo las dietas infectadas presentaron un aumento en la concentración de hemocitos a las 48 hpi. Se ha reportado, que un aumento en el número de hemocitos mejora la respuesta inmune de los crustáceos durante los períodos de estrés,

haciéndolos más resistentes a enfermedades (Luna-González *et al.*, 2013). Por otro lado, López *et al.* (2003), reportaron un incremento en el conteo de hemocitos cuando se añadieron 0.2 g de β -glucano/kg de alimento de *L. vannamei*, los cuales tenían un peso promedio de 2 g, al tratarse de organismos más pequeños, los hace más susceptibles a infecciones y estrés, en el tercer bioensayo se trabajó con organismos de mayor talla, que no mostraron grandes cambios en el número de hemocitos.

8.4 Análisis de parámetros plasmáticos en hemolinfa de *L. vannamei*

Los parámetros bioquímicos plasmáticos reportados para *L. vannamei* no siempre tienen una distribución normal (Pascual *et al.*, 2003), pueden cambiar rápidamente debido a diversos factores como estrés, variaciones ambientales o agentes patógenos capaces de producir una infección, así mismo, la dirección de las rutas metabólicas está determinada por las enzimas disponibles en el sistema metabólico del organismo. Las moléculas plasmáticas y metabolitos presentes en la hemolinfa de *L. vannamei* pueden darnos una idea de su estado fisiológico y se considera importante establecer parámetros de referencia que nos permitan detectar ciertos signos de estrés o indicios de infección (López-Elías *et al.*, 2016).

8.4.1 Proteína

Los niveles de proteína en la hemolinfa disminuyeron durante las horas post infección en todos los bioensayos, como consecuencia a la infección con *V. parahaemolyticus*. Los valores de proteína reportados en este trabajo coinciden con los de Pascual *et al.* (2003) de 224.2 ± 64.19 mg/mL, en un cultivos al exterior. La proteína en plasma de *L. vannamei* es la fuente más importante de energía y biomoléculas para el sistema inmune (Rosas *et al.*, 2002). Varias proteínas de la hemolinfa están involucradas en la respuesta inmunológica, incluidas las proteínas de coagulación y el sistema profenoloxidasa (Pascual *et al.*, 2003).

En el segundo bioensayo, durante el período de infección con *V. parahaemolyticus*, se registraron menores niveles de proteína en todos los tratamientos, excepto en el control

negativo, esto sugiere el uso de proteína como fuente de energía por los organismos durante la infección, ya que son las proteínas el principal sustrato metabólico durante la inanición (Pascual *et al.*, 2006; Rosas *et al.*, 2002). Por otro lado, en el tercer bioensayo los niveles de proteína aumentaron de forma gradual en las dos semanas de alimentación con la microalga previo a la infección. Como era de esperarse, los niveles disminuyeron a las 24 hpi. Jiann-Chu y Sha-Yen (1993) concluyeron que los niveles de proteína en hemolinfa de crustáceos varían con las especies y los ciclos de muda, lo que dificulta establecer un parámetro normal.

8.4.2 Glucosa

En el camarón, la glucosa es producida por la glándula digestiva, transformada en glucosa-6P y transportada a hemolinfa para ser utilizada como energía por los tejidos (Rosa *et al.*, 2002). Cualquier tipo de estrés activa la respuesta fisiológica de *L. vannamei*, pero también puede inhibir la respuesta inmune, lo que afectaría su capacidad para defenderse de un agente patógeno. En una situación de estrés, *L. vannamei* usa fuentes de energía como la glucosa, por tal motivo los niveles de glucosa en hemolinfa se ha utilizado como un indicador del estado fisiológico general en diversos tipos de invertebrados (Racotta y Palacios, 1998). En el primer bioensayo, los niveles de glucosa durante la infección disminuyeron con el tiempo, incluso en el control negativo, esto pudiera deberse a la manipulación de los organismos cada 12 horas para la toma de muestra, lo que pudiera considerarse como una forma de estrés importante; dado que la glucosa es una fuente de energía, los niveles en la hemolinfa disminuyen durante la infección con *V. parahaemolyticus*, de manera similar, Sánchez-Paz *et al.* (2007) encontraron una reducción constante de los niveles de glucosa en plasma después de 48 h de inanición, efecto que ocurre durante una infección con *V. parahaemolyticus*, ya que los organismos después de ser infectados disminuyen la ingesta de alimentos de manera considerable. Así mismo, en el segundo bioensayo, observamos de nuevo una reducción en los niveles de glucosa una vez que comenzó la infección, mientras que en el tercer bioensayo, al comparar el tratamiento alimentado con 2% *Dunaliella* sp. con el tratamiento 1.1% β -glucano encontramos valores muy similares entre ambos. Los valores reportados en los tres bioensayos son superiores a los reportados por Pascual *et al.* (2003)

para *L. vannamei* cultivado al exterior (0.38 ± 0.21 mg/mL); sin embargo Galván-Álvarez *et al.* (2012), reportan valores superiores a los 2 mg/mL en *L. vannamei* a los 7 días de ser infectado con IHHNV, con una disminución drástica (0.2 mg/mL) al día 14 de ser infectado. Como se indicó anteriormente, bajo condiciones de estrés, la glucosa es utilizada como una fuente de energía rápida, sin embargo, es consumida muy rápidamente, por lo que otras vías metabólicas para la obtención de energía son activadas.

8.4.3 Lactato

El lactato es el principal producto final de la ruta anaeróbica en crustáceos, dado que el lactato no es excretado, debe de ser lentamente metabolizado por el proceso de la gluconeogénesis (Hsieh *et al.*, 2008). Los niveles de lactato en *L. vannamei* infectados con *V. parahaemolyticus* en el bioensayo 1, son mayores que los reportados por Pascual *et al.* (2003), quienes reportaron valores sin una distribución normal de 0.11 ± 0.11 mg/mL. De forma similar, Pascual *et al.* (2004) reportó valores de 0.46 mg/mL para *L. vannamei* alimentados con una dieta baja en carbohidratos, donde otras rutas metabólicas son activadas y el aumento de lactato en plasma es mayor para cubrir la demanda de energía, valores que son similares que los obtenidos en las dietas con el 1.5 y 2.5% *Dunaliella* sp. antes de la infección. En el bioensayo 1, los organismos presentaron anorexia y se deterioraron rápidamente; la demanda de energía aumentó, por lo que se inició un proceso energético alternativo, utilizando al lactato disponible en hemolinfa, los niveles de lactato disminuyen a las 36 hpi debido a la gluconeogénesis, donde se utilizó como fuente de energía.

En el segundo bioensayo, el comportamiento fue muy similar, los niveles de lactato disminuyeron hasta concentraciones de 0 mg/mL en las dietas: 2% (3), 3% (1), 3% (3) y 3% (7) a las 48 hpi, en este mismo tiempo, observamos una recuperación en los valores de glucosa en estas dietas, lo que evidencia la capacidad de *L. vannamei* para recuperar su metabolismo energético mediante otras rutas metabólicas, como la gluconeogénesis. En la figura 12 se puede observar una relación entre glucosa y lactato en las dietas 2% (7) y 3% (7), mientras tanto, los grupos control mantuvieron bajas concentraciones para ambos

metabolitos. En una investigación previa, Pascual *et al.* (2003), concluyeron que las condiciones de cultivo no afectaban los niveles de lactato, por otro lado, Racotta y Palacios (1998) reportaron diferencias en los niveles de lactato entre camarones estresados (>30 mg/mL) y no estresados (0.015 mg/mL).

Con excepción de las dietas suministradas diariamente, los niveles de lactato disminuyeron en todas las dietas una vez que comenzó la infección, indicando una demanda de energía por *L. vannamei* y su capacidad de equilibrarse con otras vías metabólicas. Mientras, en el objetivo 3, los niveles de lactato se recuperaron a las 48 hpi en los tratamientos infectados con *V. parahaemolyticus*, caso similar reportado por Pascual *et al.* (2003), donde los niveles de glucosa y lactato disminuyeron al día 5 y se recuperaron al día 6 de infección con WSSV, esto por la activación de mecanismos de compensación.

8.4.4 Triglicéridos y Colesterol

Los lípidos en el camarón pueden ser utilizados como una fuente de energía (9 kcal/g), además de ser esenciales para el crecimiento, supervivencia y reproducción, así mismo, la concentración de triglicéridos está relacionada con el contenido de lípidos disponibles en la dieta (González-Félix *et al.*, 2002). Como se mencionó anteriormente, es difícil establecer parámetros normales, en el bioensayo 1 los niveles de colesterol y triglicéridos en hemolinfa de *L. vannamei* no parecen ser afectados por la infección con *V. parahaemolyticus*, ya que no se encontraron diferencias significativas y los valores se mantienen durante la infección, sin embargo, los valores de colesterol reportados fueron más altos que los mencionados por Pascual *et al.* (2004) para juveniles silvestres de *L. vannamei* (0.3 mg/mL) y para organismos cultivados (0.24 mg/mL), mientras que los valores de triglicéridos en *L. vannamei* en este bioensayo, se mantuvieron entre 1.1 y 5.7 mg/mL. Chen *et al.* (2011) reportaron una disminución significativa en *L. vannamei*, con concentraciones de 0.85 mg/mL antes de la infección con WSSV y 0.25 mg/mL 72 horas después de la infección, concluyendo con la utilización de los triglicéridos como una fuente de energía y síntesis de macromoléculas utilizadas en el ensamblaje del virión.

En el segundo bioensayo, reportamos una disminución de los niveles de colesterol en organismos infectados como indicativo de activación de la gluconeogénesis y como un esfuerzo para compensar la demanda de energía en el camarón después de la infección con *V. parahaemolyticus*. Por otra parte, los niveles de triglicéridos incrementaron durante la infección, alcanzando niveles elevados a las 48 hpi, en todos los tratamientos que contenían la microalga *Dunaliella* sp., en comparación con los grupos control. Galván-Álvarez *et al.* (2012), también reportan un aumento en la concentración de triglicéridos en el plasma de *L vannamei*, después de dos semanas de infección con IHNV, siendo éste tres veces mayor que el observado en el grupo no infectado. Khovidhunkit *et al.* (2004), observaron una alteración constante durante la infección que incrementó los niveles séricos de triglicéridos, afectando la composición y la función de las lipoproteínas y aumentando la oxidación de los lípidos. Los carotenos son un potente antioxidante, capaces de estabilizar radicales libres, evitando la oxidación de lípidos (Wade *et al.*, 2017); estos altos niveles de triglicéridos pueden deberse a una baja velocidad de oxidación de lípidos, atribuida al contenido de β -caroteno en *Dunaliella* sp., que funciona como un antioxidante, previniendo el daño celular, datos similares a los reportados por Ouraji *et al.* (2011) en el contenido de lípidos del músculo *Fenneropenaeus indicus*, cuando adicionaron vitamina E a la dieta.

Los valores de lípidos en plasma de camarón podrían ser utilizados como un indicador en su rendimiento, así mismo nos proporciona una referencia de la salud de los organismos; por lo tanto, es importante considerar establecer valores de referencia para *L vannamei* en cada tipo de cultivo, que dependerá de la calidad de los alimentos utilizados y de las condiciones ambientales a la que son sometidos (Pascual *et al.*, 2003). Para el bioensayo 3, los niveles de colesterol en camarones alimentados con el 2% *Dunaliella* sp. mostraron un aumento gradual, contrario de los valores reportados para el control positivo, donde los valores disminuyen con la infección por *V. parahaemolyticus*. Estos datos coinciden con los obtenidos en el bioensayo 2, donde *Dunaliella* sp. evitó la oxidación de lípidos y permitió la recuperación de sus niveles a las 48 hpi, mientras que la dieta 1.1% β -glucano mantuvo los mismos niveles de colesterol y triglicéridos, sin verse afectado por la bacteria.

8.5 Sistema inmune

8.5.1 Profenoloxidasa y fenoloxidasa

El sistema proFO tiene una importante función de defensa contra patógenos (Huang *et al.*, 2010). La proFO es activada a FO y liberada por los hemocitos al plasma, resultando en la síntesis de melanina. En este proceso, la FO convierte los fenoles en quinonas, que se polimerizan para formar melanina, activando otros mecanismos de defensa como: fagocitosis, formación de nódulos, encapsulación, anión superóxido y radicales de hidroxilo (OH[•]) (González-Santoyo y Córdoba-Aguilar, 2011). En el primer bioensayo, la actividad FO y proFO aumentó después de 24 hpi, en los organismos alimentados con la dieta 3% *Dunaliella* sp. que al mismo tiempo presentó también la tasa de supervivencia más alta, así mismo, Madhumathi y Rengasamy (2011), reportaron un aumento en la actividad de proFO en dietas enriquecidas con el 1 y 2% de *D. salina* en *P. monodon* durante una infección con WSSV.

Se han estudiado diferentes inmunoestimulantes para incrementar la respuesta inmune en el camarón, como el trabajo de López *et al.* (2003), donde adicionaron vitamina C a la dieta, reportando un aumento en la actividad proFO, indicando la capacidad de *L. vannamei* para incrementar la respuesta del sistema inmune, mientras que los tratados con 0.2 gr/kg β -glucano mostraron una reducción en la actividad de proFO, concluyendo que el uso excesivo de inmunoestimulantes puede llevar a los organismos a una fatiga inmunológica, en comparación con aquellos que son alimentados con un aditivo como la vitamina C.

De forma similar, en el bioensayo 2, la actividad de FO aumentó durante la infección con *V. parahaemolyticus*, y la actividad de proFO disminuyó después de la infección, aumentando nuevamente a las 48 hpi en las dietas con *Dunaliella* sp. suministradas diariamente y la dieta 3% (3). Dado que la proteína juegan un papel importante en el mecanismo de proFO, una dieta rica en nutrientes promueve un estado fisiológico óptimo y una respuesta más efectiva del sistema inmune (Pascual *et al.*, 2006).

8.5.2 Superóxido dismutasa

La enzima SOD es responsable de transformar el anión superóxido en moléculas menos oxidantes como el peróxido de hidrógeno, evitando estrés oxidativo y daño celular (Gómez-Anduro *et al.*, 2006). Organismos de *P. monodon* alimentados con el 1% de *D. salina* mostraron un 50% menos de actividad comparada con el control negativo durante una infección por WSSV (Madhumanthi y Rengasamy, 2011). De manera similar, *L. vannamei* infectado con *V. harveyi* mostró una disminución del 47% en la actividad de SOD después de 12 hpi (Hai-Hong *et al.*, 2013), opuesto a lo reportado en el bioensayo 2, donde no se observaron alteraciones significativas en la actividad de SOD.

En el bioensayo 3, se evaluó la expresión del gen Mn-SOD, con diferencias significativas en el tiempo, Luna-Gonzalez *et al.* (2013), probaron el efecto inmunoestimulante de bacterias ácido lácticas y levaduras adicionadas en el alimento de *L. vannamei*, y no reportaron diferencias por la adición de éstas. La expresión de genes relacionados con el sistema inmune en el camarón nos da información sobre la activación del sistema inmune y su modulación, en este caso pudimos observar un aumento en la expresión del gen SOD al día 7 después de ser alimentados con β -glucano; a las 48 hpi la expresión fue hasta cuatro veces mayor en los tratamientos con *Dunaliella* sp. y β -glucano que el control positivo. Durante una infección con *V. alginolyticus*, la actividad de SOD en hemolinfa de *L. vannamei* disminuyó en un 50% a las 36 hpi y se recuperó a las 48 hpi, indicando la activación de la enzima NADPH- oxidasa responsable de la activación de la SOD que tiene como sustrato al anión superóxido (Hsieh *et al.*, 2008).

9. CONCLUSIONES

- La deficiencia de nitratos y fosfatos en el medio de cultivo de *Dunaliella* sp. aumentó la concentración de β -carotenos por encima de valores reportados anteriormente.
- La mortalidad en el bioensayo 1 fue mayor al 80%, lo que indica que la cepa de *V. parahaemolyticus* utilizada en este trabajo fue muy virulenta. A pesar de lo anterior, la dieta con el 3% *Dunaliella* sp. presentó la mayor supervivencia (30.9%).
- La mortalidad ocasionada por de la bacteria *V. parahaemolyticus* utilizada en el bioensayo 2 fue elevada, la mayor supervivencia se reportó para las dietas con la adición del 2 y 3% *Dunaliella* sp. suministradas cada tres días, con resultados positivos en la respuesta fisiológica en inmune.
- En el bioensayo 2, se observó un aumento en el nivel de triglicéridos a las 48 hpi, en las dietas que contenían la microalga y no en los grupos controles, debido a una disminución en la oxidación de lípidos gracias a la acción antioxidante de *Dunaliella* sp.
- Así mismo, en el bioensayo 2, se observó una relación en los niveles de glucosa y lactato en las dietas 2% (7) y 3% (7), donde al disminuir los niveles de lactato en plasma, los niveles de glucosa se recuperan, evidenciando la capacidad metabólica por parte de *L. vannamei* para utilizar otras vías de compensación metabólica, debido a la infección ocasionada por la bacteria, ya que la anorexia es uno de los primeros signos ante la infección.
- En el bioensayo 3, la talla de los organismos en conjunto con la acción de la microalga, fueron un factor importante para minimizar el impacto de la bacteria *V. parahaemolyticus*. Observamos también, altos valores en el conteo de hemocitos, colesterol y triglicéridos en plasma de *L. vannamei* en las dieta con *Dunaliella* sp, comparado con el control positivo. La expresión relativa del gen SOD presentó un aumento significativo al día 7 de la administración de las dietas con *Dunaliella* sp. y β -glucano, comparados con el control positivo, así como una expresión cuatro veces mayor a las 48 hpi comparado también con el control positivo.

- En este trabajo no se encontró una relación hemocitos/ supervivencia, ya que en los bioensayos, las dietas con concentraciones altas de hemocitos no resultaron en una mayor supervivencia. Así mismo, los niveles de proteína en plasma de *L. vannamei* disminuyeron después de la infección con *V. parahaemolyticus*, en todos los bioensayos ya que representan una fuente importante de energía y moléculas involucradas en la actividad del sistema inmune. Los niveles de glucosa en plasma de *L. vannamei* disminuyeron después de 12 hpi con *V. parahaemolyticus* en todos los bioensayos.
- En general, la activación del sistema inmune por parte de *Dunaliella* sp. fue positiva, ya que la actividad de profenoloxidasa y fenoloxidasa aumentó en los bioensayos 1 y 2, en las dietas con el 2.5 y 3%, así como en las dietas con el 2 y 3% administradas cada tercer día.
- Se confirma la hipótesis planteada en este trabajo, ya que la adición de *Dunaliella* sp. al 2% administrada cada tercer día a la dieta de *L. vannamei* tiene un efecto positivo en la respuesta fisiológica e inmune durante una infección por la bacteria *V. parahaemolyticus*.

10. LITERATURA CITADA

- Arredondo-Figueroa, J., R. Pedroza-Islas, J. Ponce-Palafox, E. J. Vernon-Carter. 2003. Pigmentación del camarón blanco del Pacífico (*Litopenaeus vannamei*, Boone 1931) con carotenoides de Chile (*Capsicum annuum*), esterificados y saponificados, en comparación con la astaxantina. *Rev. Mex. Ing. Quím.* 2:101-108.
- Balcázar, J. L., T. Rojas-Luna, D. P. Cunningham. 2007. Effect of the addition of four potential probiotic strains on the survival of the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) following immersion challenge with *Vibrio parahaemolyticus*. *J Invertebr Pathol.* 96:47-150.
- Beutner, S., B. Bloedorn, S. Frixel, I. Hernández, T. Hoffmann, M. Hans-Dieter, B. Mayer, P. Noach, T. Ruck, M. Schmidt, I. Schlke, S. Sell, H. Ernest, S. Haremza, G. Seybold, H. Sies, W. Stahi, R. Walsh. 2001. Quantitative assessment of antioxidant properties of natural colorants and phytochemicals: carotenoids, flavonoids, phenols and indigoids. The role of β -carotene in antioxidant functions. *J Sci Food Agric.* 81:559-568.
- Bonett Calzada, B. G. 2017. Caracterización genética de líneas de reproductores del camarón blanco *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* en cultivo. Tesis (Maestría en ciencias en acuicultura). Ensenada, México. CICESE. 81 pp.
- Boonyaratpalin, M., S. Thongrod, K. Supamattaya, G. Britton, L. E. Schlipalius. 2001. Effects of β -carotene source, *Dunaliella salina*, and astaxanthin on pigmentation, growth, survival and health of *Penaeus monodon*. *Aquacult. Res.* 32:182-190.
- Bricknell, I., R. A. Dalmo. 2005. The use of immunostimulants in fish larval aquaculture. *Fish Shellfish Immun.* 19:457-472.
- Campa Córdova, A. I. 2002. Determinación de moléculas que intervienen en el sistema inmune del camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) en respuesta al uso de inmunoestimulantes. Tesis (Doctorado). La Paz, México. CIBNOR. 45 pp.
- Campa-Córdova, A. I., N. Y. Hernández-Saavedra, R. De-Phillipps, F. Ascencio. 2002. Generation of superoxide anion and SOD activity in haemocytes and muscle of American White shrimp (*Litopenaeus vannamei*) as a response to β -glucan and sulphated polysaccharide. *Fish Shellfish Immun.* 12:353-366.
- Campa-Córdova, A., A. F. Hernández-Salmerón, F. Ascencio-Valle, A. Aguirre-Guzmán. 2010. Respuesta inmune y antioxidante en camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, expuesto a inmunoestimulantes y probióticos. En: Cruz-Suarez, L. E., D. Rique-Marie, M. Tapia-Salazar, M. G. Nieto-López, D. A. Villarreal-Cavazos, J. Gamboa-Delgado (eds.). *Avances en Nutrición Acuícola-Memorias del Décimo Simposio Internacional de Nutrición Acuícola*, 8-10 de Noviembre. San Nicolás de los Garza, N. L. México. pp 567-587.
- Chen, I. T., T. Aoki, Y. Huang, I. Hirono, T. Chen, J. Y. Huang, G. Chang, G. Lo, H. Wang. 2011. White spot syndrome virus induces metabolic changes resembling the Warburg effect in shrimp hemocytes in the early stage of infection. *J. Virol.* 85:12919–12928.
- Cheng-Fang, C., C. Houng-Yung, S. Mao-Sen, L. I-Chiu. 2000. Immunomodulation by dietary β -1,3-glucan in the brooders of the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Fish Shellfish Immun.* 10:505-514.

- Chew, B. P. 1995. Antioxidant vitamins affect food animal immunity and health. *J. Nutr.* 125:1804-1808.
- Cifuentes, A. S., M. Gonzales, O. Parra, M. Suñiga. 1996. Cultivo de cepas de *Dunaliella salina* (Teoderesco 1905) en diferentes medios bajo condiciones de laboratorio. *Rev. Chil. Hist. Nat.* 69:105-112.
- Dall, W. 1995. Carotenoids versus retinoids (Vitamin A) as essential growth factors in Penaeid prawns (*Penaeus semisulcatus*). *Mar. Biol.* 124:209–213.
- Deepika, A. K. Sreedharan, P. Anutosh, M. Makesh, K. Rajendran. 2014. Toll-pathway in tiger shrimp (*Penaeus monodon*) responds to white spot syndrome virus infection: Evidence through molecular characterization and expression profiles of MyD88, TRAF6 and TLR genes. *Fish Shellfish Immun.* 41:441-450.
- Dudonné, S., X. Vitrac, P. Coutière, M. Woillez, J. M. Mérillon. 2009. Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays. *J. Agr. Food Chem.* 57:1768-1774.
- Fagutao, F., H. Kondo, T. Aoki, I. Hirono. 2011. Prophenoloxidase has a role in innate immunity in penaeid shrimp, pp. 171-176. In: Bondad-Reantaso, M.G., J. B. Jones, F. Corsin, T. Aoki. (Eds.). *Diseases in Asian Aquaculture VII*. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Selangor, Malaysia. pp 385.
- Fimbres Olivarría, D. 2011. Crecimiento, biomasa y producción de carotenoides de *Dunaliella* sp. en concentraciones diferentes de nitrógeno. Tesis de Maestría (Maestría en Biociencias). Sonora, México. Universidad de Sonora. 57 p.
- Flores Leyva, L. 2006. Evaluación de pigmentos carotenoides como aditivos alimentarios para la prevención de infecciones producidas por el virus de mancha blanca (WSSV) y la bacteria *Vibrio harveyi* en el camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. Tesis de maestría. La Paz. México. CIBNOR. 45 p.
- Galván-Álvarez, D., F. Mendoza-Cano, J. Hernández-López, A. Sánchez-Paz. 2012. Experimental evidence of metabolic disturbance in the White shrimp *Penaeus vannamei* induced by infectious Hypodermal and Hematopoietic necrosis virus (IHHNV). *J. Invertebr. Pathol.* 111: 60–67.
- García-Triana, A., T. Zenteno-Savin, A. M. Peregrino-Uriarte, G. Yepiz-Plascencia. 2010. Hypoxia, reoxygenation and cytosolic manganese superoxide dismutase (cMnSOD) silencing in *Litopenaeus vannamei*: Effects on cMnSOD transcripts, superoxide dismutase activity and superoxide anion production capacity. *Dev. Comp. Immunol.* 34:1230-1235.
- Gollas-Galván, T., J. Hernández-López, F. Vargas-Albores. 1997. Effect of calcium on the prophenoloxidase system activation on the brown shrimp (*Penaeus californiensis*, Holmes). *Comp. Biochem. Physiol.* 117:419-425.
- Gómez-Anduro, G. A., C. A. Barillas-Mury, A. B. Peregrino-Uriarte, L. Gupta, T. Gollas-Galvan, J. Hernandez-Lopez, G. Yepiz-Plascencia. 2006. The cytosolic manganese superoxide dismutase from the shrimp *Litopenaeus vannamei*: molecular cloning and expression. *Dev. Comp. Immunol.* 30:893-900.
- Gómez-Gil, B., A. Roque, A. Guerra-Flores. 2001. Enfermedades infecciosas más comunes en la camaronicultura en México y el impacto del uso de antimicrobianos. En: Páez-

- Osuna, F. (Eds.). Camaronicultura y medio ambiente. México: Instituto de Ciencias del Mar y Limnología. pp 273-274.
- González-Santoyo, I., A. Córdoba-Aguilar. 2011. Phenoloxidase: a key component of the insect immune system. *Entomol. Exp. Appl.* 142:1-16.
- Guillard, R. L., J. H. Ryther. 1962. Studies on marine planktonic diatoms I. *Cyclotella nana* Husted and *Detonula confervacea* (Cleve). *Can. J. Microbiol.* 8: 229-239.
- Hai-Hong, H., L. Xiao-Lin, X. Jian-Hai, W. Ping. 2013. Immune response of *Litopenaeus vannamei* after infection with *Vibrio harvey*. *Aquacult.* 406-407:115-120.
- Han, J. E., K. F. Tang, L. H. Tran, D. V. Lightner. 2015. *Photorhabdus* insect-relates (Pir) toxin-like genes in a plasmid *Vibrio parahaemolyticus*, the causative agent of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) of shrimp. *Dis. Aquat. Organ.* 113:33-40.
- He, W., S. Rahimnejad, L. Wang, K. Song, K. Lu, C. Zhang. 2017. Effects of organic acids and essential oils blend on growth, gut microbiota, immune response and disease resistance of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) against *Vibrio parahaemolyticus*. *Fish Shellfish Immun.* 70:164-173.
- Hsieh, S. H., Y. H. Ruan, Y. C. Li, P. S. Hsieh, C. H. Hu, C. M. Kuo. 2008. Immune and physiological responses in Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*) to *Vibrio alginolyticus*. *Aquacult.* 275:335-341.
- Huang, J., Y. Yang, A. Wang. 2010. Reconsideration of phenoloxidase activity determination in white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immun.* 28:240-244.
- Jiann-Chu, C., C. Sha-Yen. 1993. Studies on haemocyanin and hemolymph protein levels of *Penaeus japonicus* based on sex, size and moulting cycle. *Comp. Biochem. Physiol.* 106:293-296.
- Jin, E., A. Melis. 2003. Microalgal Biotechnology: carotenoid through the phytoplankton, rotifer, *Artemia*, shrimp pathway. *Afr. J. Biotechnol.* 11:1277-1282.
- Joshi, J., J. Srisala, V. Truong, I. Tung-Chen, B. Nuangsaeng, C. Fang, T. W. Flegel, K. Sritunyalucksana, S. Thitamadee. 2014. Variation in *Vibrio parahaemolyticus* isolates from a single Thai shrimp farm experiencing an outbreak of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND). *Aquacult.* 428:297-302.
- Khovidhunkit, W., M. S. Kim, R. A. Memon, J. K. Shigenaga, A. H. Moser, K. R. Feingold, C. Grunfeld. 2004. Effects of infection and inflammation on lipid and lipoprotein metabolism: mechanisms and consequences to the host. *J. Lipid Res.* 45:1169-1196.
- Krishna-Kumar, B., V. Kumar-Deekshit, J. Mohan-Raj, B. Mallappa-Shivanagowda, I. Karunasagar, I. Karunasagar. 2014. Diversity of *Vibrio parahaemolyticus* associated with disease outbreak among cultured *Litopenaeus vannamei* (Pacific white shrimp) in India. *Aquacult.* 433:247-251.
- Lawrence, A. L., H. He. 1996. Requerimientos vitamínicos para camarones peneidos. En: *Avances de nutrición acuícola III*. Nuevo León, México. pp 204.
- Le Moullac, G., P. Haffner. 2000. Environmental factors affecting immune responses in Crustacea. *Aquacult.* 191:121-131.
- Li, C. C. S. T. Yeh, J. C. Chen. 2008a. The immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* following *Vibrio alginolyticus* injection. *Fish Shellfish Immun.* 25:853-860.

- Li, J., B. Tan, K. Mai, Q. Ai, W. Zhang, Z. Liufu, W. Xu. 2008b. Immune responses and resistance against *Vibrio parahaemolyticus* induced by probiotic bacterium *Arthrobacter* XE-7 in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. J. World Aquacult. Soc. 39:477-489.
- Liñán-Cabello, M. A., J. Piniagua-Michel, P. M. Hopkins. 2002. Bioactive roles of carotenoids and retinoids in crustaceans. Aquacult. Nutr. 8:299-309.
- López, N., G. Guzon, G. Gaxiola, G. Taboada, M. Valenzuela, C. Pascual, A. Sánchez, C. Rosas. 2003. Physiological, nutritional, and immunological role of dietary β 1-3 glucan and ascorbic acid 2-monophosphate in *Litopenaeus vannamei* juveniles. Aquacult. 22:223-243.
- López-Elías, J. A., D. Fimbres-Olivarría, L. A. Medina-Juárez, A. Miranda-Baeza, L. R. Martínez-Córdova, D. M. Molina-Quijada. 2013. Producción de biomasa y carotenoides de *Dunaliella tertiolecta* en medios limitados en nitrógeno. Phyton 82:23-30.
- López-Elías, J. A., D. Medina-Félix, A. I. Campa-Córdova, L. R. Martínez-Córdova, J. Hernández-López, F. Mendoza-Cano, M. Rivas-Vega. 2016. Optimización de la supervivencia y respuesta inmune de *Litopenaeus vannamei* alimentado con dietas ricas en carotenos e infectado con el síndrome de mancha blanca. Lat. Am, J. Aquat. Res. 44:1-8.
- López-León, P., A. Luna-González, R. Escamilla-Montes, M. C. Flores-Miranda, J. Fierro-Coronado, P. Álvarez-Ruiz, G. Duarte-Plata. 2016. Isolation and characterization of infectious *Vibrio parahaemolyticus*, the causative agent of AHPND, from the white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Lat. Am. J. Aquatic Res. 44:470-479.
- Luna-González, A., J. Moreno-Herrera, A. I. Campa-Córdova, H. González-Ocampo, J. Fierro-Coronado, P. Álvarez-Ruiz, M. Bueno-Ibarra. 2013. Respuesta inmune y expresión de genes en el camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) inducida por inmunoestimulantes microbianos. Lat. Am. J. Aquatic Res. 41:898-907.
- Madhumathi, M., R. Rengasamy. 2011. Antioxidant status of *Penaeus monodon* fed with *Dunaliella salina* supplemented diet and resistance against WSSV. Int. J. Eng. Sci. Technol. 3:7249-7259.
- Medina-Félix, D., J. A. López-Elías, L. R. Martínez-Córdova, M. López-Torres, J. Hernández-López, M. Rivas-Vega, F. Mendoza-Cano. 2014. Evaluation of the productive and physiological responses of *Litopenaeus vannamei* infected with WSSV and fed diets enriched with *Dunaliella* sp. J. Invertebr. Pathol. 117:9-12.
- Merchie, G., E. Kontara, P. Lavens, R. Robles, K. Kurmaly, P. Sorgeloos. 1998. Effect of vitamin C and astaxanthin on stress and disease resistance of postlarval tiger shrimp, *Penaeus monodon* (Fabricius). Aquacult. Res. 29:579-585.
- Mugnier, C., C. Justou, H. Lemonnier, J. Patrois, D. Anquer, C. Goarant, J. R. Lecoz. 2013. Biological, physiological, immunological and nutritional assessment of farm-reared *Litopenaeus stylirostris* shrimp affected or unaffected by vibriosis. Aquacult. 388-391:105-114.
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. 2013. Report of the FAO/MARD Technical Workshop on Early Mortality Syndrome (EMS) or Acute Hepatopancreatic Necrosis Syndrome (AHPND) of Cultured Shrimp (under

- TCP/VIE/3304). Hanoi, Viet Nam, 25–27 June 2013. FAO Fisheries and Aquaculture Report No. 1053. Rome. 54 p.
- Ouraji, H., A. M. Abedian-Kenari, B. Shabanopour, A. Shabani, M. Sodogar, S. Jafarpour, G. H. Ebrahimi. 2011. Growth, survival, and fatty acid composition of Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus* (Milne Edwards) fed diets containing different levels of vitamin E and lipid. *Aquacult. Int.* 19:903-916.
- Pacheco, R., F. Ascencio, M. Zarain, G. Gómez, A. Campa. 2011. Enhancement of superoxide dismutase and catalase activity in juvenile Brown shrimp, *Farfantepenaeus californiensis* (Holmes, 1900), fed β -1.3 glucan vitamin E and β -carotene and infected with white spot syndrome virus. *Lat. Am. J. Aquat. Res.* 39:534-543.
- Pascual, C., A. Sánchez, E. Zenteno, G. Cuzon, G. Gabriela, R. Brito, R. Gelabert, E. Hidalgo, C. Rosas. 2006. Biochemical, physiological, and immunological changes during starvation in juveniles of *Litopenaeus vannamei*. *Aquacult.* 251:416-429.
- Pascual, C., G. Gaxiola, C. Rosas. 2003. Blood metabolites and hemocyanin of the White shrimp, *Litopenaeus vannamei*: the effect of culture conditions and a comparison with other crustacean species. *Mar. Biol.* 142:735-745.
- Pascual, C., L. Arena, G. Cuzon, G. Gaxiola, G. Taboada, M. Valenzuela, C. Rosas. 2004. Effect of a size-based selection program on blood metabolites and immune response of *Litopenaeus vannamei* juveniles fed different dietary carbohydrate levels. *Aquacult.* 230:405-416.
- Pisal D. S., S. S. Lele. 2005. Carotenoid production from microalga, *Dunaliella salina*. *Indian J. Biotechnol.* 4:476-483.
- Ponce-Palafox, J. T., J. L. Arredondo-Figueroa, E. J. Vernon. 2006. Carotenoids from plants used in diets for the culture of the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Rev. Mex. Ing. Quim.* 5:157-165.
- Racotta, I., E. Palacios. 1998. Hemolymph metabolic variables in response to experimental manipulation stress and serotonin injection in *Penaeus vannamei*. *J. World Aquacult. Soc.* 29:351-356.
- Rendón, L., J. L. Balcázar. 2003. Inmunología de camarones: Conceptos básicos y recientes avances. *Rev. Aquat.* 19:27-33.
- Reyes-Becerril, M., I. Salinas, A. Cuesta, J. Meseguer, D. Tovar-Ramírez, F. Ascencio-Valle, M. A. Esteban. 2008. Oral delivery of yeast *Debaryomyces hansenii* modulates the innate immune parameters and the expression of immune-relevant genes in the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) *Fish Shellfish Immun.* 25:731-739.
- Rosas, C., C. Pascual, N. López, A. Sánchez. 2002. Metabolitos sanguíneos como herramientas para evaluar el estado nutricional de camarones peneidos. En: Cruz-Suárez, L., D. Ricque-Marie, M. Tapia-Salazar, M. Gaxiola-Cortez. (Eds.). Avances en Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI simposio internacional de nutrición acuícola. 3 al 6 de septiembre del 02. Cancún, Quintana Roo, México. pp 54-71.
- Sánchez-Paz, A., F. García-Cardeno, J. Hernández-López, A. Muhlia-Almazán, G. Yepiz-Plascencia. 2007. Effect of short-term starvation on hepatopáncreas and plasma energy reserves of the Pacific White shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 340:184-193.

- Saulnier, D., P. Haffner, P. Goarant, D. Ansquer. 2000. Experimental infection models for shrimp vibriosis studies: a review. *Aquacult.* 191:133-144.
- Schryver, P., T. Defoirdt, P. Sorgeloos. 2014. Early mortality syndrome outbreaks: a microbial management issue in shrimp farming. *PLoS athog.* 10(4): 1003919. (16/11/2018) Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3999206/pdf/ppat.1003919.pdf>.
- Serpa-Ibáñez, R. F., A. Calderón-Rodríguez. 2006. Efecto de diferentes fuentes de nitrógeno en el contenido de carotenoides y clorofila de cuatro cepas peruanas de *Dunaliella salina*. *Ecol. Aplic.* 5:93-99.
- Sirikharin, R., S. Taengchaiyaphum, P. Sanguanrut, T. Duong-Chi, R. Mavichak, P. Proespraiwong, B. Nuangsaeng, S. Thitamadee, T. Flegel, K. Sriyunalucksana. 2015. Characterization and PCR detection of binary, Pir-Like toxins from *Vibrio parahaemolyticus* isolates that cause acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in shrimp. *Plos one.* 10(5):126987. (16/11/2018) Disponible en: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0126987>.
- Söderhäll, K. (Ed). 2010. *Invertebrate Immunity*. Springer-Landes bioscience, Primera edición. Texas, USA. p 316.
- Soto-Rodríguez, S. A., B. Gómez-Gil, R. Lozano-Olvera, M. Betancourt-Lozano, M. S. Morales-Covarrubias. 2015. Field and experimental evidence of *Vibrio parahaemolyticus* as the causative agent of acute hepatopancreatic necrosis disease of culture shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in northwestern Mexico. *Appl. Environ. Microbiol.* 81:1689-1699.
- Su, J., L. Song, W. Xu, L. Wu, H. Li, J. Xiang. 2004. cDNA cloning and mRNA expression of the lipopolysaccharide and beta-1,3-glucan-binding protein gene from scallop *Chlamys farreri*. *Aquacult.* 239:69-80.
- Supamattaya, K., S. Kiriratnikom, M. Boonyaratpalin, L. Borowitzka. 2005. Effect of a *Dunaliella* extract on growth performance, health condition, immune response and disease resistance in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Aquacult.* 248:207-216.
- Tafreshi, A. H., M. Shariati. 2009. *Dunaliella* biotechnology: methods and applications. *J. Appl. Microbiol.* 107:14-35.
- Tanaka, Y., H. Matsuguchi, T. Katayama, K. Simpson, C. Cichester. 1976. The biosynthesis of astaxanthin-XVIII. The metabolism of the carotenoids in the prawn, *Penaeus japonicus* bate. *Japan. Soc. Sci. Fish.* 42:197-202.
- Tapia-Salazar, M., D. Ricque-Marie, M. Nieto-López, L. E. Cruz Suárez. 2008. Uso de pigmentos de la flor de cempasúchil (*Tagetes erecta*) como aditivo en alimentos para camarón *L. vannamei*. In: Cruz-Suárez, L. E., D. R. Marie, M. T. Salazar, M. G. G. Nieto López, D. A. Villarreal Cavazos, J. P. Lazo, M. T. Viana. (eds.). *Avances en nutrición acuícola. IX Simposio Internacional de Nutrición Acuícola.* 24-27 Noviembre 2008. Universidad Autónoma de Nuevo León, México. pp 492-513.
- Tran, L., L. Nunan, R. M. Redman, L. Mohny, C. Pantoja, K. Fitzsimmons, D. Lightner. 2013. Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. *Dis. Aquat. Organ.* 105:45-55.
- Varela-Mejías, A., N. Peña-Navarro. 2014. Síndrome de la mortalidad temprana (EMS/AHPNS) en camarones cultivados: una revisión. *Rep. Cient.* 17:25-30.

- Vargas-Albores, F., G. Yepiz-Plascencia. 2000. Beta glucan binding protein and its role in shrimp immune response. *Aquacult.* 191:13-21.
- Vargas-Albores, F., J. Hernández-López, T. Gollas-Galván, K. Montaña-Pérez, F. Jiménez-Vega, G. Yepiz-Plascencia. 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.
- Vásquez-Piñeros, M., L. Rondón-Barragan, P. Eslava-Mocha. 2012. Inmunoestimulantes en teleósteos: probióticos, β -glucanos y LPS. *Orinoquia*, 16:46-62.
- Vázquez, L., L. Sierra, S. Juárez, C. Agundis, A. Zavala, E. Zenteno. 1998. Mecanismos de inmunidad en Crustáceos. *Interc.* 23:334-348.
- Wade, N. M., J. Gabaudan, B. D. Glencross. 2017. A review of carotenoid utilization and function ion crustacean aquaculture. *Rev. Aquacult.* 2:141-156.
- Yeh, S. P., Y. N. Chen, S. L. Hsieh, W. Cheng, C. H. Liu. 2009. Immune response of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, after a concurrent infection with white spot syndrome virus and infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus. *Fish Shellfish Immun.* 26:582-588.