



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

“EFECTO DE ALIMENTOS FUNCIONALES PARA CAMARÓN BLANCO (*Penaeus vannamei*) SOBRE LA EXPRESION DE GENES ASOCIADOS A LA RESISTENCIA AL VIRUS DE LA MANCHA BLANCA (WSSV) Y A UNA CEPA TOXIGÉNICA DE *Vibrio parahaemolyticus* (AHPND)”

TESIS

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales

(Orientación en Acuicultura)

Presenta

Mónica Janeth Cabrera Stevens

La Paz, Baja California Sur, diciembre del 2018.

ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 13:00 horas del día 22 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:

"EFECTO DE ALIMENTOS FUNCIONALES PARA CAMARÓN BLANCO (*Penaeus vannamei*) SOBRE LA EXPRESION DE GENES ASOCIADOS A LA RESISTENCIA AL VIRUS DE LA MANCHA BLANCA (WSSV) Y A UNA CEPA TOXIGÉNICA DE *Vibrio parahaemolyticus* (AHPND)"

Presentada por el alumno:

Monica Janeth Cabrera Stevens

Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACIÓN EN **Acuicultura**

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



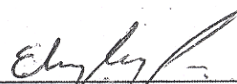
Dr. Alberto Peña Rodríguez
Co-Director de Tesis



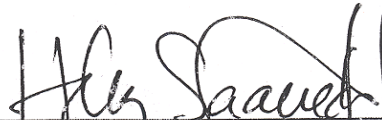
Dr. Arturo Sánchez Paz
Co-Director de Tesis



Dra. Cristina Escobedo Fregoso
Co-Tutor



Dr. Eduardo Quiroz Guzman
Co-Tutor



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

Conformación de Comités

Comité Tutorial

Dr. Alberto Peña Rodríguez. Co-Director de Tesis.
Cátedras CONACYT-CIBNOR.

Dr. José Arturo Sánchez Paz. Co-Director de Tesis.
CIBNOR Unidad Hermosillo.

Dra. Cristina Escobedo Fregoso. Co-Tutor.
Cátedras CONACYT-CIBNOR.

Dr. Eduardo Quiróz Guzmán. Co-Tutor.
Cátedras CONACYT-CIBNOR.

Comité Revisor de Tesis

Dr. Alberto Peña Rodríguez

Dr. José Arturo Sánchez Paz

Dra. Cristina Escobedo Fregoso

Dr. Eduardo Quiróz Guzmán

Jurado de Examen

Dr. Alberto Peña Rodríguez

Dr. José Arturo Sánchez Paz

Dra. Cristina Escobedo Fregoso

Suplente


Dr. Eduardo Quiróz Guzmán

Resumen

El camarón blanco *Penaeus vannamei* es un recurso acuícola importante por su valor económico y por el incremento de la práctica de su producción en la última década. Sin embargo, es afectado por enfermedades en los cultivos como el virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV) y la bacteria *Vibrio parahaemolyticus* toxigénica causante de la necrosis hepatopancreática aguda (AHPND). Una manera de mejorar el estado de salud y resistencia a enfermedades del camarón es por medio del perfeccionamiento de los alimentos tradicionales, abriendo paso a los alimentos de nueva generación o “funcionales” los cuales se han implementando en la ciencia en busca de efectos benéficos que ayuden a mejorar las condiciones del camarón blanco en su cultivo. En el presente estudio se probaron ocho distintos alimentos considerando los requerimientos nutricionales del camarón blanco *P. vannamei*, de los cuales un alimento se elaboró con la fórmula convencional o referencia (Ref); a seis se les agregaron ingredientes funcionales: 1- Alimento simbiótico que contiene probiótico y prebiótico (Sim), 2- extracto de tres algas *Ulva sp.*, *Eisenia sp.* y *Porphyra sp.*(Alga), 3- mayor cantidad de lo requerido de vitamina C (VitC), 4- β -glucanos (β -glu), 5- arginina (Arg), 6- mezcla de plantas cúrcuma y maca (CuMa); y finalmente un alimento con deficiencia en ácidos grasos altamente insaturados como control susceptible(DefAG). Estos alimentos fueron administrados a camarones en condiciones controladas de laboratorio durante 28 días, obteniendo que los camarones alimentados con CuMa, VitC y Sim fueron los que mejor rendimiento mostraron en el bioensayo de crecimiento, obteniendo diferencias significativas entre los distintos alimentos con valores de p menores a 0.05 para ganancia de peso, consumo, tasa de crecimiento y factor de conversión alimenticia. Por el contrario, los camarones alimentados con la dieta DefAG tuvieron el menor rendimiento en los parámetros evaluados. En un segundo ensayo, camarones alimentados durante 28 días con los ocho alimentos fueron retados con el virus WSSV y con la bacteria Vp_{AHPND} , obteniendo que los camarones infectados con WSSV y alimentados con CuMa presentaron el mayor porcentaje (60%) de supervivencia a las 72 h, a diferencia de los DefAG, β -glu y Ref con un 0% de supervivencia en el mismo periodo. En cuanto al reto de camarones infectados con Vp_{AHPND} los organismos alimentados con las dietas CuMa y VitC, fueron los que presentaron mayor supervivencia (85%) en 120 h, al contrario de los alimentados con la dieta DefAG que obtuvo el 10% de supervivencia. A partir de los camarones del ensayo de crecimiento, se realizó un análisis transcriptómico y se identificaron 51 genes asociados con resistencia a WSSV y 22 genes asociados con resistencia a VP_{AHPND} , siendo proteínas estructurales el grupo de genes más abundantes para ambos casos. De los genes identificados sólo nueve de ellos han sido reportados por otros autores, por lo que este trabajo aporta nueva información sobre genes de camarón blanco asociados a la resistencia a WSSV y VP_{AHPND} .

Palabras clave: camarón blanco, alimentos funcionales, WSSV, AHPND, transcriptómica.


Vo.Bo. Dr. Alberto Peña Rodríguez
Co-Director


Vo.Bo. Dr. Arturo Sánchez Paz
Co-Director

Summary

The whiteleg shrimp *Penaeus vannamei* is an important aquaculture resource due to its economic value and the increase in their production in the last decade. However, the culture it is affected by diseases such as the white spot syndrome virus (WSSV) and the toxigenic strain of the bacteria *Vibrio parahaemolyticus* that causes acute hepatopancreatic necrosis (AHPND). A way to improve the state of health and resistance to diseases of shrimp, is through the improvement of conventional feed, by opening the way to a new generation or "functional" feeds which have been implemented lately focused in beneficial effects that help to improve the culture conditions of the white shrimp. In the present study, eight different feeds were tested considering the nutritional requirements of the white shrimp *P. vannamei*: one feed was elaborated with the conventional formula used as reference (Ref); six functional feeds including 1- a symbiotic that contains probiotic and prebiotic (Sim), 2- extracts of three algae *Ulva sp.*, *Eisenia sp.* and *Porphyra sp.* (Alga), 3- extra amount of vitamin C required (VitC), 4- β -glucans (β -glu), 5- arginine (Arg), 6- mixture of turmeric and maca plants (CuMa); and finally a feed with deficiency in highly unsaturated fatty acids as susceptible control (DefAG). These foods were administered to shrimp under controlled laboratory conditions for 28 days, obtaining that the shrimp fed with CuMa, VitC and Sim were those that showed the best performance in the growth bioassay, obtaining significant differences between the different feeds ($p < 0.05$) for weight gain, feed consumption, growth rate and feed conversion rate. As expected, the shrimp fed with the DefAG diet had the lowest performance in the evaluated parameters. In a second bioassay, the shrimp fed during 28 days with the eight foods were challenged with the WSSV virus and the *Vp_{AHPND}* bacteria, obtaining that the shrimp infected with WSSV and fed with CuMa had the highest percentage (60%) of survival at 72 h, unlike the DefAG, β -glu and Ref with 0% survival in the same period. With respect to the challenge of shrimp infected with *Vp_{AHPND}*, specimens fed with CuMa and VitC diets had the highest survival (85%) in 120 h, in contrast to those fed with the DefAG diet, which obtained 10% survival. From the growth assay shrimp, a transcriptomic analysis was carried out and 51 genes were associated to resistance to WSSV and 22 genes associated to resistance to *Vp_{AHPND}*, being structural proteins the most abundant group of genes for both cases. Of the genes identified only nine of them have been reported by other authors, so this work provides new information on white shrimp genes associated with resistance to WSSV and *Vp_{AHPND}*.

Keywords: white shrimp, functional foods, WSSV, AHPND, transcriptomic.



Vo.Bo. Dr. Alberto Peña Rodríguez
Co-Director



Vo.Bo. Dr. Arturo Sánchez Paz
Co-Director

Dedicatoria

Quiero dedicar este trabajo primeramente a Dios el cual siempre me ayuda en los momentos más difíciles por los que he pasado, me ilumina y me da sabiduría cuando lo he necesitado; a mi esposo Leonardo Romero por ser mi motor y mi inspiración para seguir adelante, el cual siempre estuvo conmigo apoyándome en todo momento; mi padre Pedro Cabrera y mi madre Elizabeth Stevens mis grandes ejemplos en la vida, mis hermanas Lizeth y Priscila que han sido mis cómplices y mejores amigas; agradezco a mis grandes amigos los tocheros marmoteros por ser mi distracción y convivencia durante estos dos años.

Agradecimientos

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C. como institución receptora de los estudios de Posgrado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo para el desarrollo de mi trabajo de tesis dentro del proyecto "Desarrollo y validación de alimentos funcionales para el control de enfermedades en el camarón *Penaeus vannamei*" con clave 01-887 dentro la Convocatoria para Atender Problemas Nacionales 2015 y cuyo responsable técnico es el Dr. Alberto Peña Rodríguez.

De igual manera agradezco a CONACYT por la beca No. 654404 otorgada durante los dos años de duración de mi estudio

Al Laboratorio Nacional de Supercómputo del Sureste de México perteneciente a la Red de Laboratorios Nacionales CONACYT, por los recursos computacionales, el apoyo y la asistencia técnica.

A mis co-directores el Dr. Alberto Peña Rodríguez y el Dr. Arturo Sánchez Paz; y a mis co-tutores la Dra. Cristina Escobedo Fregoso y al Dr. Eduardo Quiróz Guzmán por formar parte de mi comité y apoyarme con mi tesis.

Al personal de CIBNOR Unidad Hermosillo M.C. Fernando Mendoza Cano, M.C. Trinidad Encinas García y Dra. Tania Lizbeth Enríquez Espinoza por su apoyo y colaboración en mi estancia.

A los técnicos Gabriela Mendoza Carrión del Laboratorio de Genómica y Bioinformática, Sandra de la Paz Reyes del Laboratorio Húmedo de Nutrición Acuícola, María Dolores Rondero Astorga del Laboratorio de Análisis Clínico Proximal, Ernesto Goytortua Bores del Laboratorio de Nutrición Acuícola, por su apoyo en los laboratorios para la realización de esta tesis.

A Horacio Sandoval Gómez del Laboratorio de Cómputo por su ayuda y disponibilidad en todo momento.

A Salvador Anwart Meza Jiménez del Laboratorio de Servicios de Ingeniería Electrónica que me apoyó y resolvió cada avería técnica durante todo mi trabajo.

A la granja Quinta San Fabián Acuicultores S.P.R. de R.L. de C.V. de la ciudad de Sonora por su donativo de camarones.

Contenido

Resumen	i
Summary	i
Índice de figuras	viii
Índice de tablas.....	ix
Abreviaturas.....	x
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1 Generalidades del camarón blanco	3
2.2 Camaronicultura	4
2.3 Virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV)	5
2.4 <i>Vibrio parahaemolyticus</i> toxigénico causante de la necrosis hepatopancreática aguda (<i>Vp_{AHPND}</i>).....	7
2.5 Alimentos funcionales para mitigación de enfermedades.....	8
2.6 Efecto del alimento sobre la expresión de genes.....	11
3. JUSTIFICACIÓN.....	14
4. HIPOTESIS.....	14
5. OBJETIVOS.....	15
5.1 Objetivo general	15
5.2 Objetivos específicos	15
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
6.1 Elaboración de alimentos funcionales.....	16
6.2 Evaluación de crecimiento y parámetros zootécnicos de <i>P. vannamei</i> alimentados con dietas funcionales.....	19
6.3 Evaluación de la supervivencia de <i>P. vannamei</i> alimentados con dietas funcionales e infectados con virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV) y <i>Vibrio parahaemolyticus</i> (<i>Vp_{AHPND}</i>).....	21
6.3.1 Diagnóstico de WSSV y <i>Vp_{AHPND}</i>	21
6.3.2 Aclimatación al alimento	22
6.3.3 Titulación de patógenos.....	23
6.3.4 Retos de infección.....	24
6.4 Análisis de expresión diferencial de camarones seleccionados por resistencia a patógenos.	26
6.4.1 Procesamiento de ARN	26
6.4.2 Análisis bioinformático	27
7. RESULTADOS.....	29
7.1 Evaluación de rendimiento productivo en camarón blanco alimentado con dietas funcionales.....	29
7.2 Evaluación de alimentos funcionales en respuesta a infecciones con WSSV y <i>Vp_{AHPND}</i> en camarón blanco	32
7.2.1 Reto infeccioso con WSSV.....	32
7.2.2 Reto con <i>Vp_{AHPND}</i>	35
7.3 Genes expresados diferencialmente en camarones (<i>P. vannamei</i>) resistentes y susceptibles a patógenos.....	38
7.3.1 Transcriptoma de <i>novo</i>	38

7.3.2 Genes identificados en camarones que presentaron resistencia a WSSV.....	40
7.3.3 Genes asociados a resistencia con Vp_{AHPND}	45
8. DISCUSIÓN.....	51
8.1 Evaluación de rendimiento productivo en camarón blanco alimentado con dietas funcionales.....	51
8.2 Evaluación de alimentos funcionales en respuesta a infecciones con WSSV y Vp_{AHPND} en camarón blanco.	52
8.2.1 Titulación de patógenos.....	52
8.2.2 Reto infeccioso con WSSV.....	53
8.2.3 Reto con <i>Vibrio parahaemolyticus</i> (Vp_{AHPND}).....	55
8.3 Genes expresados diferencialmente entre camarones (<i>P.vannamei</i>) resistentes y susceptibles a patógenos.....	58
8.3.1 Genes asociados a resistencia con WSSV	58
8.3.2 Genes asociados a resistencia con Vp_{AHPND}	59
9. CONCLUSIONES.....	61
10. LITERATURA CITADA.....	62
11. ANEXOS	74

Índice de figuras

Figura 1. Morfología de camarones peneidos	3
Figura 2. Anatomía interna de camarones peneidos.....	4
Figura 3. Serie histórica de la producción de camarón en México.....	5
Figura 4. Representación estructural del virus causante de WSSV.	6
Figura 5. Tanques de 500 L para aclimatación de camarones al alimento.....	23
Figura 6. Tanques de 60 L utilizados en retos patológicos.	24
Figura 7. Infección de camarones con WSSV por el método de inyección.....	25
Figura 8. Infección de camarones con Vp_{AHPND} mediante alimentación forzada.	26
Figura 9. Consumo individual total de cada uno de los diferentes alimentos en gramos.....	29
Figura 10. Ganancia de peso total en gramos por tratamiento.	30
Figura 11. Factor de conversión alimenticia de los tratamientos.....	31
Figura 12. Porcentaje de supervivencia en camarón blanco en la titulación con virus de WSSV. ...	32
Figura 13. Porcentaje de supervivencia de camarones alimentados con dietas funcionales e infectados con WSSV.....	33
Figura 14. Regresión de Modelo Lineal Generalizado de mortalidad en camarón <i>P. vannamei</i> infectado con WSSV.	34
Figura 15. Porcentaje de supervivencia en camarón blanco en la titulación con Vp_{AHPND}	35
Figura 16. Porcentaje de supervivencia en horas post-infección con Vp_{AHPND}	36
Figura 17. Regresión de Modelo Lineal Generalizado de mortalidad en camarón <i>P. vannamei</i> infectado con Vp_{AHPND}	37
Figura 18. Calidad de lecturas de las librerías de camarones diferencialmente alimentados con el alimento de referencia.....	38
Figura 19. Gráfica de volcán que muestra los genes expresados diferencialmente entre los tratamientos Alga vs Ref.	39
Figura 20. Agrupamiento de librerías en relación a los genes sobre-expresados y sub-expresados entre los distintos tratamientos.....	40
Figura 21. Número de genes sobre-expresados en común en camarones alimentados con tratamientos que confieren resistencia a la infección con WSSV (CuMa y Alga).	41
Figura 22. Número de genes sub-expresados en común en camarones alimentados con tratamientos que confieren resistencia a la infección con WSSV (CuMa y Alga).	42
Figura 23. Clasificación de genes asociados a resistencia a WSSV por su proceso biológico.....	45
Figura 24. Número de genes sobre-expresados en común en camarones alimentados con tratamientos que confieren resistencia a la infección con Vp_{AHPND} (CuMa y VitC).	46
Figura 25. Número de genes sub-expresados en común en camarones alimentados con tratamientos que confieren resistencia a la infección con Vp_{AHPND} (CuMa y VitC).	47
Figura 26. Clasificación de genes asociados a resistencia a Vp_{AHPND}	50

Índice de tablas

Tabla I. Ingredientes o aditivos con propiedades funcionales evaluados en alimentos para especies acuícolas.....	10
Tabla II. Formulación para la elaboración de alimentos experimentales (g kg^{-1}).....	18
Tabla III. Composición proximal de alimentos experimentales.....	19
Tabla IV. Parámetros de rendimiento del alimento en crecimiento.....	31
Tabla V. Tiempo letal medio en morir para camarones infectados con WSSV.....	34
Tabla VI. Tiempo letal medio en morir para camarones infectados con AHPND.....	37
Tabla VII. Genes ensamblados.....	39
Tabla VIII. Genes sobre-expresados diferencialmente asociados a resistencia a WSSV.....	43
Tabla IX. Genes sub-expresados diferencialmente asociados a resistencia a WSSV.....	44
Tabla X. Genes sobre-expresados diferencialmente asociados a resistencia a Vp_{AHPND}	48
Tabla XI. Genes sub-expresados diferencialmente asociados a resistencia a Vp_{AHPND}	49
Tabla XII. Genes expresados diferencialmente en las dos condiciones de infección (WSSV y Vp_{AHPND}).	50

Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AHPND	Acute hepatopancreatic necrosis disease
Arg	Arginina
ARN	Ácido ribonucleico
β -glu	Beta glucanos
CIBNOR	Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C.
CuMa	Curcuma y maca
DefAG	Deficiencia en ácidos grasos
DHA	Ácido docosahexaenoico
DL50	Dosis letal 50
edgeR	Empirical analysis of digital gene expression data in R
EMS	Early Mortality Syndrome
EPA	Eicosapentaenoic Acid
GML	Modelo Lineal Generalizado
HUFAs	High-Unsaturated Fatty Acid
IHHN	Infección Hepodermica Hematopoyética Necrotizante
MYLK	Myosin Light chain Kinase
pb	Pares de bases
PO	Phenoloxidase
PROPO	Prophenoloxidase
PUFA	Polyunsaturated Fatty Acid
Ref	Referencia
RNA-seq	Ribonucleic acid sequencing
Sim	Simbiótico
TLM	Tiempo Letal Medio
t	Toneladas
UFC/ml	Unidades Formadoras de Colonias por mililitro
VitC	Vitamina C
<i>Vp</i> _{AHPND}	<i>Vibro parahaemolyticus</i> causante de AHPND
WSD	White Spot Disease
WSSV	White Spot Syndrome Virus

1. INTRODUCCIÓN

La acuicultura es una actividad global de producción de especies acuáticas vegetales y animales, de alto impacto social y económico que contribuye de forma significativa a la producción mundial de alimentos (FAO, 2016). En el 2014, la producción de especies de origen acuícola alcanzó las 73.8 millones de toneladas (t) con un valor estimado en \$160.2 millones de dólares a nivel mundial, lo que contrasta con 93.4 millones de t de producto obtenido por medio de la pesca en aguas marinas y continentales, volumen que se ha mantenido en un punto de extracción límite en la última década (FAO, 2016). La producción de camarón representa el 15% del volumen total mundial de producción de las especies comerciales. En México, el camarón se encuentra en el segundo lugar en producción acuícola con 129,049 t, las cuales representan el 62.62% del total del recurso obtenido (206,087 t de camarón proveniente de pesquería y acuicultura); sin embargo, ocupa el primer lugar en cuanto a valor comercial generando ingresos por \$11,479 millones de pesos (CONAPESCA, 2016).

Históricamente el cultivo de camarón ha presentado diferentes problemáticas generadas por patógenos. En los últimos años, la industria del camarón blanco *Penaeus vannamei* se ha afectado gravemente por el virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV, por sus siglas en inglés) y la enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda (AHPND) causada por distintas bacterias del género *Vibrio* que contienen un plásmido que codifica un par de proteínas homólogas a las toxinas *PirA* y *PirB* de la bacteria del género *Photobacterium* (Han *et al.*, 2015). Estos patógenos causaron altas mortalidades en cultivos de camarón *P. vannamei*, provocando pérdidas económicas en un gran número de granjas de Sinaloa y Sonora, los estados de mayor producción camaronícola en México (FAO, 2016).

Las enfermedades del camarón se presentan después de periodos de estrés causado por mal manejo, malas condiciones físico-químicas del agua, o por la alimentación con dietas deficientes en nutrientes o en mal estado (Cuéllar *et al.*, 2010). Por ello, se han

implementado medidas de amortiguación para el control de enfermedades, entre las que destacan las buenas prácticas de manejo que buscan mantener los cultivos bioseguros, reducir los factores de estrés y manipulación, y el uso de alimentos balanceados de buena calidad. En la última década se ha incrementado el desarrollo de alimentos que además de cubrir los requerimientos nutricionales para el buen crecimiento de los camarones, buscan fortalecer el estado de salud de los camarones para enfrentar posibles patógenos oportunistas y emergentes. Estos alimentos son llamados de “*nueva generación*” o “*alimentos funcionales*”, que son productos balanceados que contienen ingredientes o aditivos que favorecen las capacidades y funciones fisiológicas en un organismo, previenen enfermedades y promueven la salud (Alvídrez *et al.*, 2002; Cortés *et al.*, 2005; Hasler *et al.*, 1998; Silveira *et al.*, 2003). Sin embargo, estos alimentos pueden generar cambios en el organismo, por lo cual, con ayuda de herramientas moleculares de vanguardia, es posible evaluar el efecto que tienen estos alimentos sobre la expresión de genes (nutrigenómica), identificando genes o vías metabólicas que se inducen o inhiben y causan efectos benéficos o dañinos para la salud del organismo (Lu *et al.*, 2011; Sanhueza *et al.*, 2012).

En el presente estudio se evaluó el efecto de distintos alimentos funcionales en el crecimiento del camarón blanco *P. vannamei*, y su resistencia a infecciones con WSSV y *Vibrio parahaemolyticus* causante de la necrosis hepatopancreática aguda (AHPND), además de realizar un análisis nutrigenómico por efecto de dichos alimentos, para identificar genes asociados con la resistencia a estas enfermedades.

2. ANTECEDENTES

2.1 Generalidades del camarón blanco

El camarón blanco (*Penaeus vannamei*) es un decápodo perteneciente a la familia Penaeidae. Su cuerpo se compone de una parte anterior llamada cefalotórax, el cual está compuesta por la fusión de su cabeza y el tórax, los cuales contienen apéndices antenulares, maxilares y cinco pares de pereiópodos, además de otras estructuras. Su parte media está dividida en 6 segmentos con un par de pleópodos cada uno, formando así al abdomen y su parte posterior formada por el telson y los urópodos (Fig. 1). Su estructura interna general se conforma de hepatopáncreas, estómago, intestino, y un corazón (sistema circulatorio abierto), entre otros órganos (Fig. 2). Su ciclo de vida se encuentra representado por seis etapas que son: nauplio, protozoa, mysis, postlarva, juvenil y adulto. Su desarrollo larval ocurre en manglares, lagunas costeras y estuarios, mientras que los adultos habitan en mar abierto. Es una especie nativa de la costa oriental del Océano Pacífico, desde el estado de Sonora hasta Perú, de hábitat marino tropical donde la temperatura del agua es normalmente superior a 20 °C (Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO, 2006). Los especímenes adultos se alimentan de detritos bénticos, gusanos, bivalvos y otros crustáceos.

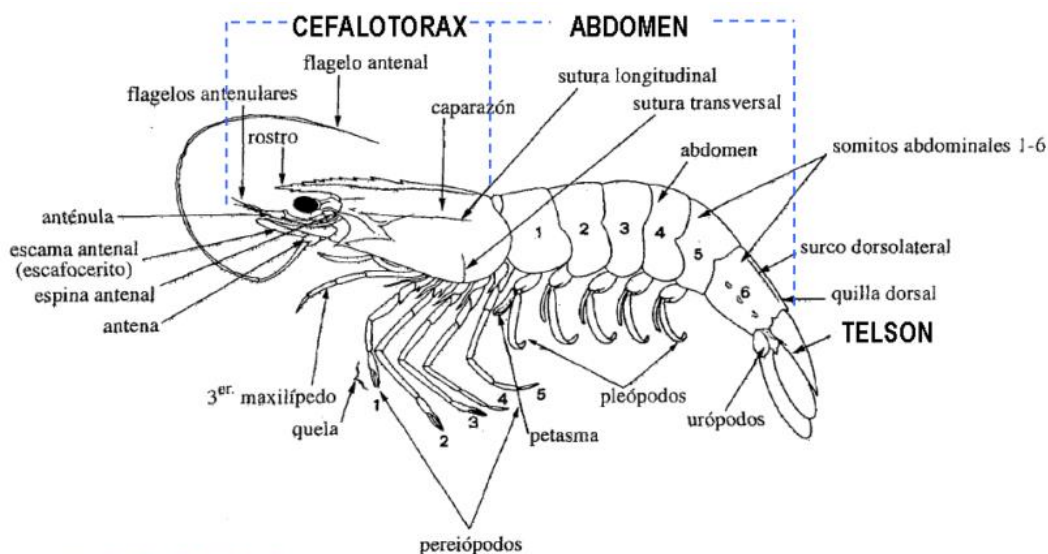


Figura 1. Morfología de camarones peneidos. Fuente: FAO (1995).

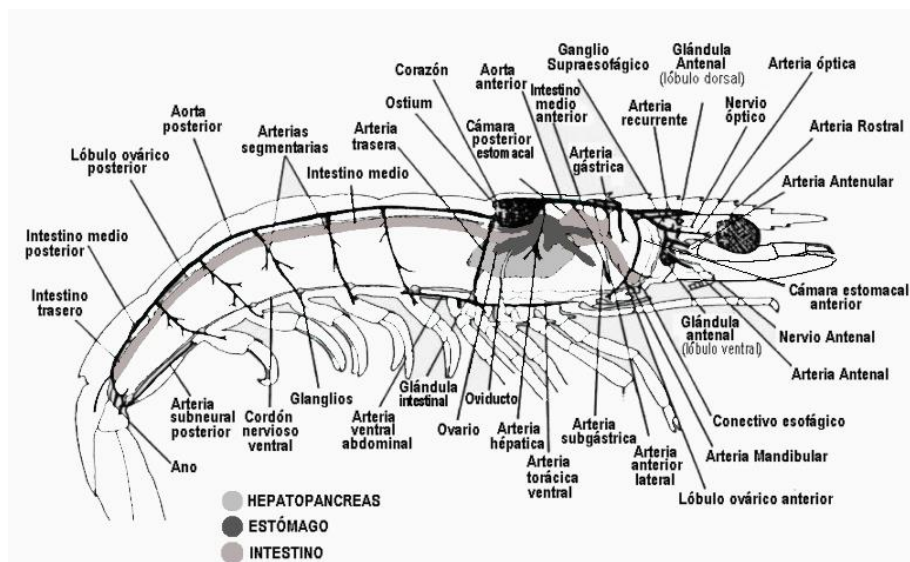


Figura 2. Anatomía interna de camarones peneidos. Fuente: Aguilar *et al.* (2009).

2.2 Camaronicultura

El cultivo del camarón blanco inició en 1973 en Florida (EUA) con la primera reproducción en cautiverio. En 1976, al descubrir que la ablación del pedúnculo ocular unilateral promueve la maduración gonadal de hembras, se promovió el cultivo comercial en América del Sur y Central. El primer cultivo en México se desarrolló en 1969 en Guaymas, Sonora, con el camarón café *Farfantepenaeus californiensis*. Posteriormente, en 1975 se realizaron esfuerzos para cultivar el camarón azul *Penaeus stylirostris*, obteniendo buenos resultados. A finales de la década de los setentas se construyeron las primeras granjas semi-intensivas en el estado de Sinaloa, logrando obtener sus primeras cosechas para comercialización (Arredondo, 2002; Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO, 2006). Como se puede observar en la figura 3 la producción del camarón de acuicultura en México tiene mayor oportunidad de crecimiento comparado con el obtenido por pesquería, mismo que se ha mantenido estable a lo largo de los últimos años.

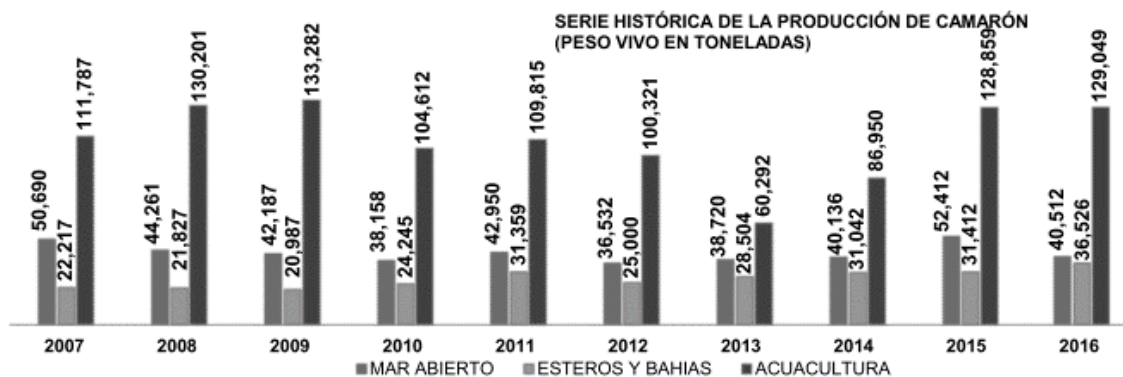


Figura 3. Serie histórica de la producción de camarón en México. Fuente: CONAPESCA (2016).

En 1990 se detectaron los primeros problemas de enfermedades infecciosas en el cultivo de camarón azul *P. stylirostris*, apareciendo la infección hipodérmica y hematopoyética necrotizante (IHHN), causante de mortalidades masivas y obligando a los camaronicultores a utilizar la especie *P. vannamei* que presentó mayor resistencia a la enfermedad (Jiménez *et al.*, 1999; Martínez *et al.*, 2009). Sin embargo, han surgido nuevas enfermedades para esta especie de camarón, llegando a llamar la atención de los productores por las enormes pérdidas causadas en los cultivos.

2.3 Virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV)

Al paso del tiempo, en el cultivo de *P. vannamei* surgieron enfermedades como la enfermedad de la mancha blanca (WSD, por sus siglas en inglés). Durante un tiempo, se consideró que el responsable de la enfermedad era un baculovirus, sin embargo, actualmente se ha reconocido que el agente etiológico de la enfermedad es el virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV, por sus siglas en inglés). Este virus posee un genoma de ADN de doble cadena, y se encuentra envuelto por una membrana trilaminar. Por sus características fisicoquímicas y morfológicas el WSSV ha sido clasificado por la Comisión Internacional de Taxonomía de Virus como el único miembro de la familia Nimaviridae, y

del género *Whispovirus* (Fig. 4). El tamaño del WSSV es de 70–167 de diámetro y 210–420 nm de longitud (Galaviz y Molina, 2014; Mayo, 2002; Oakey y Smith, 2018; Sánchez-Paz, 2010).

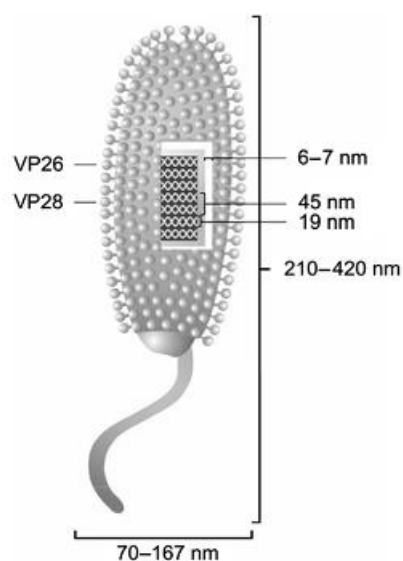


Figura 4. Representación estructural del virus causante de WSSV. Fuente: Sánchez-Paz (2010).

La forma natural de transmisión del WSSV ocurre de manera horizontal, es decir por medio de la ingesta de tejido infectado o a través de la exposición directa de especímenes sanos a partículas virales en el agua. Este virus posee la capacidad de replicarse en distintas especies de hospederos, entre las cuales algunas pertenecen a los ordenes Díptera y Estomatópoda, además de otros ordenes de importancia en la acuicultura como el Anostraca, a la cual pertenece la especie *Artemia* sp., utilizada como alimento vivo en la acuicultura, además de infectar a más de 93 especies del orden Decápoda, siendo el grupo de hospederos más abundante y con especies de importancia comercial como los *Callinectes* sp., (jaibas), *Cherax* sp., *Macrobrachium* sp., (langostinos), *Panulirus* sp., (langostas) y los peneidos entre ellos el camarón blanco *P. vannamei*. Además de los artrópodos, WSSV utiliza a algunos anélidos y rotíferos como hospederos, siendo este último alimento vivo para cultivos acuícolas (Sánchez-Paz, 2010).

La temperatura del agua es un factor importante para la proliferación de este patógeno, cuando los organismos infectados con WSSV se encuentran en temperaturas superiores a los 27 °C no se detectan los signos clínicos característicos. Sin embargo, al disminuir la temperatura del ambiente, la infección en el camarón procede severamente manifestando reducción en el consumo de alimento, letargo y manchas blancas en el exoesqueleto (no siempre aparecen). Los camarones moribundos presentan coloración que va de café-rojiza a rosada causada por la expansión de los cromatóforos subcuticulares, produciendo una rápida y creciente mortalidad hasta el 100% dentro de los tres a diez días posteriores a la aparición de los signos (Arredondo, 2002; Bustillo *et al.*, 2009; FAO, 2006; Godínez *et al.*, 2012; Lightner, 1996; Lyle-Fritch *et al.*, 2006; Morales y Cuéllar, 2008; Wu *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2007).

En 1999 se detectó el primer brote del WSSV en América, llegando a México a los estados de Sinaloa, Sonora y Nayarit en el periodo 2000-2001, afectando el 81.8% de las granjas de Sinaloa (el mayor productor del país), sufriendo pérdidas entre 80 y 100% de la producción; en el periodo 2010-2011 llegó a causar pérdidas estimadas en \$156 millones de dólares, clasificando esta enfermedad como una de las más devastadoras (Arredondo, 2002; Galaviz, 2014).

2.4 *Vibrio parahaemolyticus* toxigénico causante de la necrosis hepatopancreática aguda (*Vp*_{AHPND})

V. parahaemolyticus es una bacteria Gram negativa que habita naturalmente en ambiente estuario-marino y causa efectos negativos en el camarón en condiciones de estrés, por lo que se le considera oportunista. Esta bacteria, al igual que otras del género *Vibrio* y algunas del género *Photobacterium*, puede contener un plásmido que codifica homólogos de una toxina binaria (*PirA* y *PirB*) (Han *et al.*, 2015), causante del síndrome de mortalidad temprana (EMS por sus siglas en inglés), o también conocido como síndrome de la necrosis hepatopancreática aguda (AHPND, por sus siglas en inglés) (Feng *et al.*, 2017; Varela y Peña, 2014). Esta enfermedad afecta al camarón, especialmente a las especies *P. monodon* y *P.*

vannamei, por medio de la infección vía oral, ya que ingiere los detritos junto con la bacteria que se encuentran en el fondo de los estanques y en la columna de agua, colonizando el tracto digestivo y, se ha sugerido que es ahí donde la bacteria expresa la toxinas *PirA* y *PirB*, causando una disfunción de las células del hepatopáncreas, además del desprendimiento de las células epiteliales tubulares e inflamación hemocítica (Lightner, 2012; Varela y Peña, 2014). La infección causa signos clínicos como nado errático en la superficie de los estanques, crecimiento reducido, letargia, anorexia, decoloración del hepatopáncreas, cromatóforos expandidos, y melanización. Análisis histológicos muestran necrosis multifocal, inflamación hemocítica, formación de nódulos en el órgano linfoide y branquias. La bacteria ha causado mortalidades del 70-100% en las etapas de desarrollo temprano del camarón (entre 10 a 40 días después de la etapa de post-larva), los organismos sobrevivientes sufren retraso de crecimiento y atrofas (Cuéllar *et al.*, 2012; Cuéllar, 2013; Feng *et al.*, 2017; Lightner, 2012; Morales y Cuéllar, 2008; Varela y Peña, 2014). Esta cepa afectó los cultivos de camarón en China en el 2009, dispersándose hasta Tailandia en 2012, y en México se detectó por primera vez en el 2013, causando pérdidas estimadas en \$118 millones de dólares (FAO, 2013; Suong *et al.*, 2017).

2.5 Alimentos funcionales para mitigación de enfermedades

Como parte de una estrategia integral de manejo para la prevención y control de enfermedades en las granjas de camarón, se ha buscado implementar “Manuales de buenas prácticas de manejo”, que incluyen, como parte fundamental, la utilización de alimentos balanceados eco-eficientes y de alta calidad nutricional. Por ello se han desarrollado alimentos de nueva generación, también llamados *alimentos funcionales*, los cuales además de cubrir los requerimientos nutricionales para el óptimo crecimiento, buscan mitigar los efectos negativos ocasionados por patógenos o estrés propio de los sistemas acuícolas. Los alimentos funcionales contienen aditivos que le otorgan algún beneficio fisiológico al organismo, como mejorar la capacidad de respuesta del sistema inmune aumentando la

resistencia a patógenos (Berger, 2000; Lightner, 2012). Entre los componentes que causan este efecto positivo se encuentran: la vitamina C, que incrementan la inmunocompetencia y resistencia a enfermedades, además de incrementar la actividad fenoloxidasas y anión superóxido (Lee y Shiau, 2002); el β -glucano, que estimula la respuesta inmune protegiendo al organismo contra bacterias oportunistas (Zhao *et al.*, 2012); los probióticos, que pueden o no colonizar el tracto digestivo y actuar como antagonistas contra bacterias patógenas, o también mejorar la calidad del agua y fondo del estanque evitando brotes de bacterias nocivas, que además si es dosificado en una simbiosis con prebióticos como inulina puede mejorar su efectividad (Arisa *et al.*, 2015); las plantas cúrcuma (*Curcuma longa*) y maca (*Lepidium sp.*) que estimulan la actividad antioxidante, antiinflamatoria y antibacteriana (Chen *et al.*, 2013; Lawhavit *et al.*, 2011); las algas marinas, que son fuentes ricas de compuestos como los polisacáridos sulfatados y carotenoides que se utilizan como agentes anti estrés, promotores de crecimiento, inmunoestimulantes, antimicrobianos y antivirales (Declarador *et al.*, 2014; Lauzon *et al.*, 2015); y la arginina, que es un precursor del óxido nítrico el cual participa como antimicrobiano, se ha reportado que la arginina tiene un efecto beneficioso sobre el estrés oxidativo en el camarón (Cheng *et al.*, 2011). Diversos aditivos funcionales se han evaluado en camarón y otras especies de importancia acuícola, sin embargo, algunos ingredientes funcionales como la maca sólo se han evaluado en peces, presentando gran potencial para su aplicación en camarón por sus propiedades antivirales y antimicrobianas (Tabla I).

Tabla I. Ingredientes o aditivos con propiedades funcionales evaluados en alimentos para especies acuícolas.

Aditivo	Especie	Inclusión	Resultados	Referencia
Inulina	<i>P. vannamei</i>	5g kg ⁻¹	Incrementó la actividad de la fenoloxidasa y redujo la prevalencia de WSSV.	Luna <i>et al.</i> (2012)
Simbiótico	<i>P. vannamei</i>	0.8g kg ⁻¹	Redujo la prevalencia de WSSV.	Partida <i>et al.</i> (2013)
Alga <i>Eisenia sp</i>	<i>P. monodon</i>	0.5g kg ⁻¹	Mejóro la supervivencia contra <i>V. Harveyi</i> .	Traifalgar <i>et al.</i> (2009)
Alga <i>Eisenia sp</i>	<i>P. monodon</i>	0.2g kg ⁻¹	Redujo la mortalidad contra WSSV.	Chotigeat (2004)
Alga <i>Ulva sp.</i>	<i>P. vannamei</i> <i>P. monodon</i>	1.7g kg ⁻¹	Aumentó la actividad hemocítica y la actividad fenoloxidasa (PO)	Lauzon (2015)
Alga <i>Ulva sp.</i>	<i>P. monodon</i>	1.5g kg ⁻¹	Disminuyó la mortalidad contra WSSV	Declarador (2014)
Vitamina C	<i>P. monodon</i>	0.5g kg ⁻¹	Resistencia a estrés osmótico	Merchie <i>et al.</i> (1998)
Vitamina C	<i>P. vannamei</i>	1g kg ⁻¹	Incrementó la actividad PO, redujo la mortalidad contra WSSV	Molina <i>et al.</i> (2012)
β -glucano	<i>P. vannamei</i>	10g kg ⁻¹	Menor carga de WSSV	Rodríguez <i>et al.</i> (2000)
Arginina	<i>Sciaenops ocellatus</i>	10g kg ⁻¹	Aumentó la actividad anión superóxido y lisozima	Cheng (2011)
Cúrcuma	<i>P. vannamei</i>	15g kg ⁻¹	Aumentó la PROPO y disminuyó <i>Vibrio sp.</i>	Lawhavinit <i>et al.</i> (2011)
Maca	<i>Oreochromis myskiss</i>	15g kg ⁻¹	Aumentó las células de sistema inmune, la supervivencia y crecimiento	Lee (2005)
Maca	<i>Oreochromis sp.</i>	20g kg ⁻¹	Aumentó la supervivencia	Verastegui (2009)

Por otro lado, una deficiencia en la dieta puede llegar a causar alteraciones en los procesos fisiológicos del organismo, reflejándose en el crecimiento, respuestas de defensa (inflamatoria, oxidativa, inmune, entre otras), pudiendo llegar a causar mortalidades, debido a que los nutrientes no son suficientes para cubrir los requerimientos básicos para realizar actividades fundamentales. Carughi y Gronert (2010) mencionan que las dietas

deficientes en ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) omega-3 (Ω -3) se relacionan con problemas cardiovasculares y enfermedades inflamatorias en mamíferos, ya que datos recientes demuestran que los PUFA Ω -3 en la dieta, amplifica una ruta de resolución pro-inflamatoria, asegurando una inflamación saludable a través de la acción de las protectinas y resolvinas derivadas de EPA y DHA. En peces una dieta deficiente de fosfolípidos causa anomalías en esqueleto y sensibilidad al estrés (Coutteau *et al.*, 1998). En crustáceos, una dieta deficiente puede causar una disminución del crecimiento, aumento en mortalidad, además de mostrar mayor susceptibilidad a enfermedades y afecciones por estrés (Coutteau *et al.*, 1998; Ponce *et al.*, 2005). Un claro ejemplo de esto ocurre al presentarse una deficiencia en vitaminas como las C, D y K, las cuales generan un bajo crecimiento en el camarón. Una deficiencia en vitamina C en camarones causa deficiencia en la formación de colágeno, mala recuperación de las heridas, problemas con la muda o mudas incompletas, lo que lleva a un bajo crecimiento del organismo hasta llegar a la muerte del organismo (He-Haiqi y Lawrence-Addison, 1993). Los ácidos grasos altamente insaturados n-3 son componentes esenciales de las membranas biológicas en los organismos marinos, además de ayudar a resistir el estrés osmótico en el camarón; por lo tanto una deficiencia de ácidos grasos altamente poliinsaturados (HUFAs) en el alimento tendría un efecto negativo en el rendimiento productivo del camarón (Cahu-Chantal, 2000; Gong *et al.*, 2004).

2.6 Efecto del alimento sobre la expresión de genes

La dieta es un factor que afecta el metabolismo y el estado fisiológico de cualquier organismo, lo que puede repercutir en un aumento o disminución de la susceptibilidad a enfermedades. Estos cambios o alteraciones causados por el alimento, pueden modificar la expresión de genes (*nutrigenómica*) que pudieran estar relacionados directa o indirectamente con las capacidades de defensa del organismo en condiciones de estrés o

en presencia de un patógeno (Exadactylos, 2014; Gómez, 2007; Romero y Nicodemus, 2007).

Si bien existe información sobre los efectos de diversos alimentos sobre la expresión de genes de diversas especies acuícolas de interés comercial, el conocimiento de la relación dietas-genes en camarón es escaso.

Chen *et al.* (2015) utilizaron RNA-seq para comparar la respuesta transcriptómica del hepatopáncreas en *P. vannamei* juvenil alimentado con tres dietas de diferente fuente lipídica, logrando identificar modificaciones en distintas vías metabólicas lipídicas. Ngoh *et al.* (2015) realizaron un análisis transcriptómico, en el cual se evaluó el efecto de diferentes alimentos en especímenes juveniles de lubina asiática (*Lates calcarifer*), logrando aportar información sobre la expresión génica global de estos peces. Murray *et al.* (2010) realizaron un análisis nutrigenómico en juveniles del lenguado *Hippoglossus hippoglossus*, en el que se probó la utilización de harina de soya como fuente proteica para reemplazar la harina de pescado. Los resultados demostraron cambios significativos en la expresión de genes de respuesta inmune y genes implicados en el crecimiento. De Santis *et al.* (2015) realizaron un perfil transcriptómico de hígado e intestino distal en salmón del Atlántico, donde identificaron 133 genes expresados diferencialmente por efecto del estrés nutricional derivado del uso de harina de soya.

Existen trabajos donde se ha analizado el perfil transcriptómico de camarones en respuesta a enfermedades, por ejemplo, Robalino *et al.* (2007) analizaron la respuesta transcriptómica de camarón en un desafío con WSSV, indicando que la infección induce la sobre-expresión de genes que codifican efectores antimicrobianos, mientras que algunos genes implicados en la protección contra estrés oxidativo se sub-expresaron. Así mismo, Li *et al.* (2013) observaron diferencias transcriptómicas en camarones infectados con WSSV por medio de técnicas de secuenciación con Illumina y bioinformática, identificando genes expresados diferencialmente desde la etapa de infección latente hasta la etapa aguda.

Entre los genes que modificaron sus niveles de expresión se incluyen algunos de la cascada de profenol-oxidasa (proPO), genes codificantes de defensa contra el virus, así como genes utilizados por el WSSV para su rápida proliferación. Clavero *et al.* (2007) analizaron 872 genes de camarón *P. vannamei* infectado con WSSV, e identificaron el 87% de las secuencias como conocidas, clasificándolas en 12 grupos de acuerdo a sus funciones, siendo el más abundante las proteínas ribosomales.

A pesar de los esfuerzos realizados sobre el análisis masivo de expresión de genes en camarón, no hay información sobre la expresión de genes relacionado con la alimentación, previo a un reto infeccioso. Por lo tanto, este trabajo aportará información referente a la regulación de la expresión de transcritos del camarón por efecto de alimentos funcionales y su relación a la resistencia o susceptibilidad a WSSV y AHPND.

3. JUSTIFICACIÓN

Se ha demostrado que algunos alimentos funcionales disminuyen los efectos negativos de patógenos en camarón, sin embargo, se desconoce su efecto sobre la expresión génica, por lo que el análisis de la expresión diferencial a nivel transcripcional ayudará a identificar genes asociados a la resistencia a patógenos.

4. HIPOTESIS

Si la administración de alimentos funcionales al camarón blanco *Penaeus vannamei* confiere resistencia frente a patógenos tales como el virus del síndrome de la mancha blanca y la bacteria toxigénica *Vibrio parahaemolyticus*, causante del síndrome de la necrosis hepatopancreática aguda (Vp_{AHPND}), entonces estos alimentos tendrán un efecto sobre la expresión de genes en el camarón, haciendo posible identificar aquellos asociados a la resistencia de dichos patógenos.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de la administración de alimentos funcionales sobre la expresión de genes en camarón blanco *Penaeus vannamei*, y su relación con la resistencia al virus del síndrome de la mancha blanca y una cepa de *Vibrio parahaemolyticus* causante del síndrome de la necrosis hepatopancreática aguda.

5.2 Objetivos específicos

1. Evaluar el efecto y rendimiento productivo que genera la administración de alimentos funcionales en el camarón blanco *Penaeus vannamei*.
2. Evaluar el efecto de los alimentos funcionales sobre la supervivencia del camarón blanco *Penaeus vannamei* como respuesta a la infección experimental con el síndrome de la mancha blanca y una cepa de *Vibrio parahaemolyticus* causante del síndrome de la necrosis hepatopancreática aguda.
3. Identificar genes del camarón blanco *Penaeus vannamei* asociados a la resistencia al síndrome de la mancha blanca y a una cepa de *Vibrio parahaemolyticus* causante del síndrome de la necrosis hepatopancreática aguda, a partir de un análisis de expresión diferencial por efecto de los diferentes alimentos funcionales suministrados.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Elaboración de alimentos funcionales

Considerando los requerimientos nutricionales del camarón (Cuzon *et al.*, 2004) y los ingredientes o aditivos funcionales a utilizar en este trabajo, se formularon y elaboraron los siguientes alimentos experimentales, todos con 34% de proteína y 7% de lípidos (Tabla II):

1. Alimento referencia (*Ref*) que contiene la formula convencional.
2. Alimento deficiente en ácidos grasos altamente poliinsaturados o HUFAs específicamente EPA y DHA (*DefAG*), como control para generar una susceptibilidad a los patógenos a evaluar.
3. Alimento simbiótico (*Sim*) empleando un consorcio de probiótico/prebiótico; como probiótico se incluyeron 10^5 UFC g^{-1} de *Bacillus subtilis* y una misma concentración de *Lactobacillus acidophilus* microencapsulados con alginato de sodio de baja viscosidad (Bregni *et al.*, 2000) con la finalidad de proteger y mantener la viabilidad de las células en el alimento. Además, como prebiótico, se incluyeron 5 g de inulina por kg de alimento.
4. Alimento con extracto de 3 algas (*Alga*). Se incluyeron 30 g por kg de alimento de mezcla en partes iguales de extractos de las especies de macroalgas *Ulva lactuca*, *Eisenia sp.*, y *Porphyra sp.* Los extractos fueron obtenidos siguiendo la metodología de Serrano y Santizo (2014).
5. Alimento con antioxidantes (*VitC*). Se incluyeron 2 g de vitamina C por kg de alimento.
6. Alimento inmunoestimulante (*β -glu*). Se incluyeron 10 g de β -glucano de levadura *Saccharomyces cerevisiae* por kg de alimento.
7. Alimento con aminoácidos esenciales (*Arg*). Se adicionaron 10 g de arginina ligada a α -cetoglutarato por kg de alimento.

8. Alimento con plantas con actividad biológica (*CuMa*). Se adicionaron 20 g de harina de cúrcuma (*Curcuma longa*) y maca (*Lepidium sp.*) en partes iguales por kg de alimento.

Los alimentos se elaboraron en la planta de alimentos del CIBNOR. Las harinas de trigo, pescado y soya se molieron previamente en un pulverizador y se tamizaron a 0.45 mm de luz de maya. Para la elaboración de los alimentos, se mezclaron los macroingredientes (harinas >2% de la fórmula) en una batidora marca Kitchenaid modelo K45SSWH; posteriormente se incorporaron los micronutrientes (<2% de la fórmula) y se mezclaron hasta obtener una mezcla homogénea; se agregó la emulsión de aceites (pescado y lecitina de soya) repitiendo el procedimiento de mezclado, y finalmente se adicionó el agua necesaria para hidratar la mezcla (380 mL aprox.). La mezcla húmeda se pasó por un extrusor marca Torey (1/2 hp) con dado de 2 mm, se cortó con una espátula obteniendo trozos de ~1 cm y se distribuyeron en charolas de secado mantenidas en horno con flujo de aire a 40 °C por 12 h hasta que el alimento alcanzó una humedad de 10% (Benítez *et al.*, 2018).

Se realizó un análisis de composición proximal de los alimentos elaborados (Tabla III) de acuerdo con la siguiente metodología (AOAC, 1980): la materia seca se obtuvo por el método de secado a 100 °C durante 24 h. La ceniza se determinó por medio de combustión a 600 °C por 5 h. La energía bruta se determinó utilizando un calorímetro adiabático. La determinación cuantitativa de proteína en los alimentos se realizó utilizando un analizador de nitrógeno por medio del método de combustión de Dumas. El contenido de extracto etéreo se calculó mediante la extracción directa con éter en un sistema automático micro Foss Soxtec® Avanti 2050, con el método de Soxtec-Avanti. El contenido de fibra cruda en los alimentos se determinó mediante el método de hidrólisis sucesiva (ácido/base) utilizando un sistema Fiber Tec® M6.

Tabla II. Formulación para la elaboración de alimentos experimentales (g kg⁻¹).

Ingrediente	Ref	Sim	Alga	Vit c	β-glu	Arg	CuMa	DefAG
Harina de trigo ^a	392.4	387	362.4	391.4	382.4	382.4	372.4	392.4
Harina de pescado ^b	220	220	220	220	220	220	220	220
Harina de soya ^c	304	304	304	304	304	304	304	304
Aceite de pescado ^a	25	25	25	25	25	25	25	0
Lecitina de Soya ^d	35	35	35	35	35	35	35	35
CMC (aglutinante) ^e	15	15	15	15	15	15	15	15
Mezcla vitaminas y minerales ^f	5.3	5.3	5.3	5.3	5.3	5.3	5.3	5.3
Vitamina C ^g	1	1	1	2	1	1	1	1
Antioxidante BHT ^h	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
Inulina ⁱ	0	5	0	0	0	0	0	0
Consortio/encapsulado	0	0.4	0	0	0	0	0	0
Extracto de algas ^j	0	0	30	0	0	0	0	0
Plantas (Cúrcuma/maca) ^k	0	0	0	0	0	0	20	0
β-glucano ^h	0	0	0	0	10	0	0	0
L-arginina ^l	0	0	0	0	0	10	0	0
Cloruro de colina ^h	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
Fosfato monosódico ^h	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Aceite Canola ^m	0	0	0	0	0	0	0	25

Ref=Alimento referencia, Sim=Alimento simbiótico de probiótico/prebiótico, Alga=Alimento con extracto de 3 algas, Vit C=Alimento con mayor inclusión de vitamina C, β-glu=Alimento con β-glucanos, Arg=Alimento con arginina, CuMa=Alimento con inclusión de cúrcuma (especie) y maca (especie) (plantas), DefAG=Alimento deficiente en ácidos grasos altamente insaturados.

^a Molino San Cristóbal, Sonora, MX

^b Proteínas Marinas y Agropecuarias SA de CV, Jalisco, MX

^c Promotora industrial acuasistemas SA de CV (PIASA), BCS, MX

^d Central de drogas, SA de CV, Edo. México, MX

^e CMC= Carboximetilcelulosa. IMSA SA de CV, México DF, MX

^f Vit. A, 4000 IU g⁻¹; B1, 24,000 mg kg⁻¹; B2, 16,000 mg kg⁻¹; DL Ca pantotenate, 30,000mg kg⁻¹; B6, 30,000 mg kg⁻¹; B12, 80 mg kg⁻¹; K3, 16,000 mg kg⁻¹; D3, 3200 IU g⁻¹; E, 60,000 mg kg⁻¹; H, 400 mg kg⁻¹; niacin 20,000mg kg⁻¹; folic acid, 4000 mg kg⁻¹; Co 2000 mg kg⁻¹; Mn, 16,000 mg kg⁻¹; Zn, 40,000 mg kg⁻¹; Cu 20,000 mg kg⁻¹; Fe, 1 mg kg⁻¹; Se, 100 mg kg⁻¹; I 2000 mg kg⁻¹. Sigma-Aldrich, USA

^g Rovimix Stay C 35%, DSM, Netherlands

^h Sigma Aldrich, USA

ⁱ Inulina orgánica de agave, marca Unicornio, Guadalajara, Jalisco, MX

^j *Ulva* sp., cultivada en CIBNOR, *Eisenia* sp. y *Porphyra* sp, de Baja Kelp Talasoterapia S.A. de C.V.

^k Cúrcuma Species of india, United Kingdom; Maca amarilla, Salud vida, Monterrey, Nuevo León, MX

^l Arginina alfa-cetoglutarato, UPN Ultra-Performance Nutrition, USA

^m Canoil, Aceites, Grasas y Derivados, SA de CV, Zapopan, Jalisco, MX

Tabla III. Composición proximal de alimentos experimentales.

%	Ref	Sim	Alga	VitC	β-glu	Arg	CuMa	DefAG
Materia seca	92.52	92.57	93.95	94.05	92.35	92.92	94.82	93.75
Proteína cruda	38.15	37.78	37.74	37.69	37.14	37.72	37.17	36.49
Extracto etéreo	7.73	7.91	8.10	8.03	7.85	8.10	8.05	7.91
Ceniza	8.44	8.42	9.86	8.38	8.48	8.54	8.40	8.39
Fibra Cruda	1.23	1.43	1.03	0.86	0.73	0.86	1.36	0.83
Extracto libre de N	44.44	44.46	43.28	45.03	45.80	44.79	45.02	46.38

6.2 Evaluación de crecimiento y parámetros zootécnicos de *P. vannamei* alimentados con dietas funcionales

Se realizó un ensayo de alimentación en camarón durante 28 días en el laboratorio de nutrición de CIBNOR, manejando un fotoperiodo de 12 h luz y 12 h oscuridad. Se utilizaron tanques con 60 L de agua de mar filtrada a 1 µm y esterilizada por luz UV, manteniendo el agua a una temperatura de 28±0.3 °C, oxigenación de 5±1.5 mg L⁻¹ y salinidad de 36±0.4 g L⁻¹. Se seleccionaron 10 camarones con un rango de peso inicial de 1.1±0.2 g para cada replica, considerando 3 para cada tratamiento, los organismos se distribuyeron de manera aleatoria en los tanques. La alimentación fue a saciedad en dos raciones, ajustando diariamente la tasa de alimentación considerando el consumo de alimento (Benítez *et al.*, 2018). Cada mañana se retiraron por sifoneo los restos de alimento no consumido, mudas y heces, para posteriormente realizar un recambio de agua del 50%. Al finalizar el ensayo se determinó la supervivencia y el peso a los organismos para calcular el crecimiento y eficiencia de utilización de alimento bajo los siguientes parámetros zootécnicos:

- **Ganancia de peso (GP):** ganancia en gramos por camarón (Álvarez *et al.*, 2003).

$$GP = pf - pi \quad (1)$$

Dónde: *pf* = peso final del organismo y *pi* = peso inicial del organismo.

- **Tasa de crecimiento (TC%):** La tasa de crecimiento de un animal es un índice sensitivo a la calidad del alimento, denota el crecimiento ponderal promedio, expresado en porcentaje (Flores, 2006).

$$TC(\%) = \frac{Pf - Pi}{Pi} \times 100 \quad (2)$$

Dónde: pf = peso final del organismo y pi = peso inicial del organismo.

- **Tasa de crecimiento específico (TCE % día):** Denota el crecimiento promedio del organismo al día (Luna, 2013).

$$TCE(\% \text{ día}) = \frac{100 \times (\ln pf - \ln pi)}{t} \quad (3)$$

Dónde: pf = peso final del organismo y pi = peso inicial del organismo y t = duración en días.

- **Alimento consumido (AC):** expresado en g/camarón/día (Flores, 2006).

$$AC = \frac{\text{Alimento total consumido}}{Ni + Nf \div 2 \times \text{tiempo (días)}} \quad (4)$$

Dónde: Ni = número de organismos iniciales y Nf = número de organismos finales.

- **Factor de conversión alimenticia (FCA):** Es la cantidad de alimento (g) necesaria para que el camarón aumente una unidad de peso (Álvarez *et al.*, 2003; Flores, 2006).

$$FCA = \frac{Aac(g)}{Ipc(g)} \quad (5)$$

Dónde: Aac = Alimento aparentemente consumido y Ipc = Incremento en peso corregido.

- **Supervivencia (S):** Es el porcentaje de organismos vivos durante el tiempo de experimentación (Álvarez *et al.*, 2003; Flores, 2006).

$$S = \frac{Nf}{Ni} \times 100 \quad (6)$$

Dónde: Nf = número final de organismos y Ni = número inicial de organismos.

Utilizando los programas STATISTICA versión 8.0 (StatSoft Inc., 2007) se realizó análisis de normalidad y homocedasticidad de los resultados con las pruebas de Shapiro-Wilk y Levene respectivamente, para posteriormente realizar un análisis de varianza de una vía (ANOVA) y finalmente una prueba de comparación múltiple de medias Tukey con un grado de confianza del 95 %.

6.3 Evaluación de la supervivencia de *P. vannamei* alimentados con dietas funcionales e infectados con virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV) y *Vibrio parahaemolyticus* (Vp_{AHPND})

Mil trecientos cincuenta camarones con un peso promedio de 1.6 ± 0.04 g provenientes de la granja Quinta San Fabián Acuicultores S.P.R. de R.L. de C.V., del Estado de Sonora, fueron transportados al Laboratorio de Referencia, Análisis y Diagnóstico en Sanidad Acuícola (LARADSA) del CIBNOR campus Hermosillo.

6.3.1 Diagnóstico de WSSV y Vp_{AHPND} .

6.3.1.1 Extracción de ADN

Previo al bioensayo, se realizó un análisis para la detección de WSSV y Vp_{AHPND} para determinar si los camarones a utilizar eran portadores de estos patógenos. A 200 camarones se les disectaron cuidadosamente las branquias para la extracción de ADN utilizando el kit de DNAzol[®] Reagent (Invitrogen). El tejido se colocó en microtubos de 1.7 mL con 0.5 mL de DNAzol, se homogenizaron utilizando un pistilo de teflón y se agitaron manualmente durante 20 s, se centrifugaron durante 10 min a $10,600 \times g$ a una temperatura de $4 \text{ }^\circ\text{C}$ y se recuperaron 250 μL del sobrenadante, a los que se agregó 1 mL de etanol absoluto y se agitó vigorosamente. El ADN precipitado se enrolló en un palillo de madera estéril y se dejó escurrir en el mismo microtubo decantando el alcohol residual. Se enjuagó el pellet con 1 mL de etanol al 75% agitando 6 veces y se dejó sedimentar por 60 s para después decantar el etanol residual, repitiendo este paso dos veces. En el último enjuague, se secó el pellet durante 30 min hasta no ver exceso de líquido. Se adicionaron 200 μL de agua libre de nucleasas para disolver el ADN obtenido. Una vez disuelto el ADN, se centrifugó durante 10 min a $12,000 \times g$ a una temperatura de $4 \text{ }^\circ\text{C}$, recuperando 150 μL del sobrenadante que contiene ADN para transferirlo a otro microtubo de 200 μL . Se cuantificó la concentración del ADN obtenido y se determinó su pureza de acuerdo a la relación (A_{260}/A_{280}) con un espectrofotómetro NanoDrop Lite (Thermo Scientific).

6.3.1.2 PCR en tiempo real

La detección de WSSV y Vp_{AHPND} se realizó mediante PCR en tiempo real (qPCR) de acuerdo a lo descrito por Mendoza-Cano y Sánchez-Paz (2013) y Sirikharin *et al.* (2014), respectivamente. Para el diagnóstico de WSSV, se prepararon seis diluciones seriales 1:10 de un control positivo (WSSV). Cada muestra se evaluó preparando la siguiente mezcla de reacción: 5 μ L de PowerUp™ SYBR® Green Master Mix, 3.4 μ L de agua libre de nucleasas y 0.3 μ L (10 pmol) de cada primer. Para el diagnóstico de WSSV se utilizaron los primers VP28-140Fw (5' -AGG-TGT-GGA-ACA-ACA-CAT-CAA-G-3') y VP28-140Rv (5' -TGC-CAA-CTT-CAT-CCT-CAT-CA-3') (Mendoza-Cano y Sánchez-Paz, 2013) y para el diagnóstico de Vp_{AHPND} se utilizaron los primers AP3Fw (5'-ATG-AGT-AAC-AAT-ATA-AAA-CAT-GAA-AC-3') y AP3Rv (5' -GTG-GTA-ATA-GAT-TGT-ACA-GAA-3') (Sirikharin *et al.*, 2014). En una microplaca de 96 pozos se adicionaron 9 μ L de la mezcla de reacción y 1 μ L de ADN (~100 ng/ μ L). Los ensayos de qPCR se realizaron en un termociclador LightCycler 480 II (Roche). La amplificación para WSSV se realizó de acuerdo al siguiente protocolo: un ciclo a 95 °C por 5 min, seguido de 30 ciclos a 94 °C por 30 s, 61 °C por 30 s, y 72 °C por 30 s, y una extensión final a 72 °C por 5 min; mientras que para el diagnóstico de Vp_{AHPND} se utilizó el siguiente protocolo de amplificación: un ciclo a 94 °C por 5 min, seguido de 30 ciclos a 94 °C por 30 s, 53 °C por 30 s, y 72 °C por 30 s, y una extensión final a 72 °C por 5 min.

6.3.2 Aclimatación al alimento

Se seleccionaron 150 camarones para cada tratamiento, considerando un rango de peso 1.65 ± 0.35 g. Se alimentaron durante 28 días con las 8 dietas experimentales, en tanques de 500 L (uno por tratamiento) con sistema de recirculación provisto de un filtro biológico para el control de calidad de agua, con una ración diaria de 5% de la biomasa (Fig. 5).



Figura 5. Tanques de 500 L para aclimatación de camarones al alimento.

6.3.3 Titulación de patógenos

Para la titulación de WSSV se utilizó un inóculo viral previamente obtenido a partir de organismos infectados naturalmente de granjas de Sonora. La titulación viral se realizó para obtener una DL_{50} /72 h. Se seleccionaron 6 camarones de 4 gr y se transfirieron a una tina de 60 L para cada dosis, a los cuales se les inyectaron 100 μ L de inóculo de WSSV conteniendo 4.5×10^5 , 4.5×10^4 , 4.5×10^3 y 4.5×10^2 copias/ μ L (Wu *et al.*, 2005; Escobedo *et al.*, 2006). Se estimó la supervivencia, el tiempo de mortalidad y se tomaron muestras para extracción de ADN, confirmando la presencia del virus mediante qPCR.

Para la titulación de Vp_{AHPND} se utilizó un inóculo previamente obtenido a partir de organismos infectados naturalmente de granjas de Sonora. Se utilizaron 3 camarones de 4 gr colocados en una tina de 60 L para cada dosis, las cuales fueron 7.9×10^6 , 7.9×10^5 y 7.9×10^4 UFC/ mL^{-1} , y se infectó a los organismos con 100 μ L mediante alimentación forzada con una jeringa de insulina adaptada con una cánula. Se determinó la supervivencia, tiempo de mortalidad y se tomaron muestras de ADN para confirmación de la presencia de las toxinas *pirA* y *pirB* mediante qPCR (Sirikharin *et al.*, 2014).

6.3.4 Retos de infección

Los camarones se trasladaron al laboratorio húmedo de aislamiento con temperatura controlada del LARADSA, distribuyéndolos en tanques de 60 L con un sistema de recirculación y filtrado (Fig. 6). Primero se realizó el reto con el WSSV por inyección, y posteriormente el reto con Vp_{AHPND} por vía de alimentación forzada. En ambos retos, los organismos se alimentaron de forma continua con la dieta experimental durante el periodo de observación. Se calculó el porcentaje de supervivencia, y posteriormente se realizaron análisis estadísticos de ANOVA, prueba *a posteriori* de Tukey con grado de confianza del 95% para calcular las diferencias significativas entre los tratamientos durante los diferentes tiempos post-infección. Se utilizó un modelo lineal generalizado y una prueba Probit para estimar el tiempo letal medio (TLM) determinando que alimentos generaron mayor resistencia o susceptibilidad en los camarones retados con patógenos.



Figura 6. Tanques de 60 L utilizados en retos patológicos.

6.3.4.1 Reto con el virus del síndrome de la mancha blanca

Se colocaron 25 camarones de 4 g en tinas de 60 L conteniendo 40 L de agua marina filtrada y estéril. Dos tinas se utilizaron para los camarones infectados y una tina para los camarones control (negativo) para cada alimento. Los camarones alimentados durante 28 días con las

8 dietas, fueron infectados vía inyección entre el tercer y cuarto segmento abdominal (Fig. 7), con una dosis de 50 μL del inóculo de WSSV (4.5×10^4 copias/ μL), evaluando la supervivencia a las 0, 6, 12, 24 h y cada doce horas hasta llegar a supervivencia del 0% en todos los tratamientos.



Figura 7. Infección de camarones con WSSV por el método de inyección.

6.3.4.2 Reto con *Vibrio parahaemolyticus*

Se utilizaron 13 camarones de 6 g para cada tina de 60 litros; considerando dos tinas para los camarones infectados y una tina de control (negativo) para cada tratamiento. Los camarones fueron infectados vía alimentación forzada (Fig. 8) de acuerdo a la metodología de López *et al.* (2016) con una dosis de 50 μL del inóculo bacteriano conteniendo 790 UFC/ μL de *V. parahaemolyticus* (Vp_{AHPND}), evaluando la supervivencia a las 0, 6, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108 y 120 h.



Figura 8. Infección de camarones con Vp_{AHPND} mediante alimentación forzada.

6.4 Análisis de expresión diferencial de camarones seleccionados por resistencia a patógenos.

6.4.1 Procesamiento de ARN

Al finalizar el ensayo de crecimiento por consumo de alimento en camarón, se obtuvieron muestras de músculo de camarón fresco para aislar ARN. Con ayuda de un kit de disección, se extrajo una parte del músculo del segundo segmento del organismo, y se conservó en solución RNAlater (Invitrogen). Para el análisis transcriptómico se seleccionaron muestras de los organismos alimentados con los tratamientos que mostraron un desempeño positivo para WSSV: CuMa, Alga, Sim y los que presentaron efectos negativos: VitC, β -glu, Ref; para Vp_{AHPND} los tratamientos positivos fueron CuMa, VitC y los negativos Sim, DefAG.

Se realizó la extracción de ARN utilizando una solución de TRIzol (Invitrogen) de acuerdo a la metodología de Chomczynski y Sacchi (1987). El ARN se cuantificó por fluorimetría en Qubit (Invitrogen) y su integridad se evaluó tanto en NanoDrop (relación 260/280) como en gel de agarosa. El ARN precipitado en acetato de sodio y etanol, fue enviado a la compañía GENEWISE (EUA). De cada tratamiento se generaron dos librerías Paired-end (PE) formada por pools de cuatro camarones por librería, con al menos un camarón de cada réplica del

bioensayo. Las librerías fueron secuenciadas en la plataforma de Illumina Hi-Seq 2500, obteniendo para cada librería 20 millones de lecturas de 2×150 pb.

6.4.2 Análisis bioinformático

6.4.2.1 Limpieza de lecturas

La calidad de las secuencias se verificaron con el programa FastQC Versión 0.11.7 (Andrews *et al.*, 2011), identificando los adaptadores usados en la secuenciación y delimitando los parámetros a considerar para la limpieza. Se utilizó el programa Trimmomatic (Bolger *et al.*, 2014) para eliminar los adaptadores, y las lecturas que no cumplieran con las especificaciones de calidad con $Q < 30$, se utilizaron las opciones *LEADING*, *TRAILING* y *HEADCROP*. Después de la limpieza, se corroboró que las librerías quedarán libres de adaptadores (Ver anexo A) en el programa FastQC (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>).

6.4.2.2 Ensamble *de novo* del transcriptoma de *P. vannamei*

Se realizó el ensamble *de novo* del transcriptoma debido a que el genoma del camarón blanco (*P. vannamei*) no está publicado. Todas las secuencias forward y reverse de los tres tratamientos fueron ensambladas utilizando el software Trinity v2.4.0 (Grabherr *et al.*, 2011; Haas *et al.*, 2013) normalizando la cobertura de lecturas en 50 repeticiones. (Script utilizado en anexo B.1). Se realizaron estadísticos del ensamble con el programa Trinity v2.4.0 (Ver anexo B.2).

6.4.2.3 Cuantificación de la abundancia

Se estimó la abundancia de transcritos por cada librería utilizando el programa de Trinity v2.4.0 con el método de RSEM (Ver anexo C).

6.4.2.4 Anotación

A cada contig del ensamble *de novo* se le determinó su homología siguiendo las instrucciones del programa Trinotate v3.1.1 (Bryant *et al.*, 2017). Para la anotación se utilizaron las bases de datos SwissProt y pfam mediante los programas blastx y blastp (Altschul *et al.*, 1990). Se identificaron las proteínas dominantes, se predijeron los péptido señales y regiones transmembranales, se identificaron transcritos de rRNA y se descargaron las regiones codificantes (Grabherr *et al.*, 2011) (Ver anexo D).

6.4.2.5 Análisis de expresión diferencial

Se elaboró una matriz de valores de expresión normalizados estimando la abundancia de cada transcrito para cada librería, utilizando el programa Trinity v2.4.0 y el método RSEM. Esta matriz fue utilizada para determinar los genes expresados diferencialmente entre tratamientos utilizando el paquete edgeR de Bioconductor. De las comparaciones por pares entre cada uno de los tratamientos y sus réplicas, se extrajeron los transcritos expresados de manera diferencial entre tratamientos. (Para mayor información sobre los scripts utilizados (Ver anexo E).

7. RESULTADOS

7.1 Evaluación de rendimiento productivo en camarón blanco alimentado con dietas funcionales

Los análisis de composición proximal de los alimentos demostraron un contenido de 34% y 7% de proteína y lípidos respectivamente (en base húmeda), similar en todos los alimentos.

De acuerdo a los datos obtenidos y a los análisis estadísticos realizados, se observaron diferencias significativas entre los tratamientos en los diferentes parámetros zootécnicos evaluados, a excepción de la supervivencia la cual no presentó diferencias significativas.

En la figura 9 se puede observar que el consumo individual de cada tratamiento presentó diferencias significativas ($p=0.001$), siendo el alimento referencia (Ref) el de mayor consumo, comparado con los tratamientos β -glu, Arg y DefAG, en donde los camarones alimentados con DefAG presentaron el menor consumo promedio individual. No se observaron diferencias significativas ($p > 0.05$) en cuanto al alimento consumido por los camarones alimentados con Ref, Sim, Alga, VitC y CuMa.

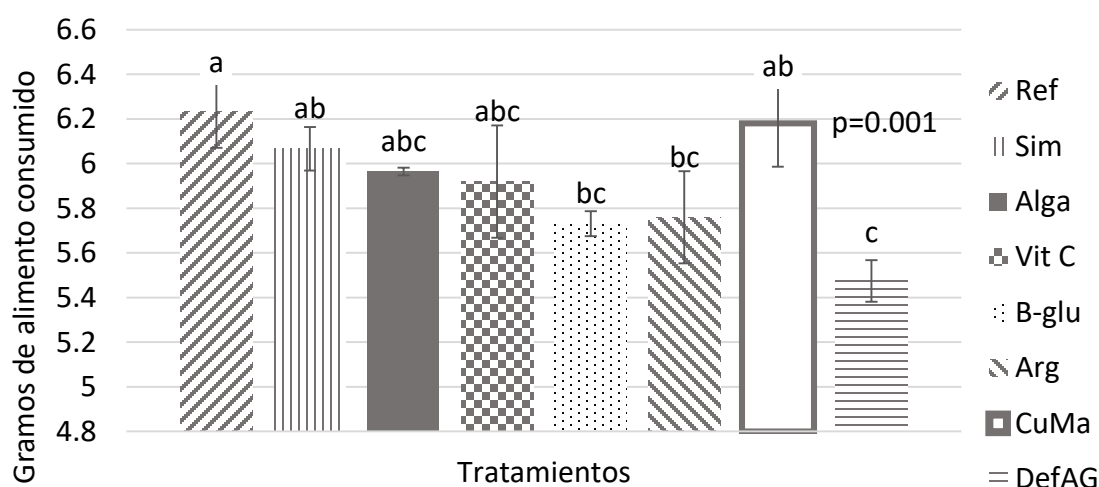


Figura 9. Consumo individual total de cada uno de los diferentes alimentos en gramos.

El alimento funcional con el que se obtuvo mayor ganancia de peso fue el simbiótico (Fig. 10). Los camarones alimentados con DefAG fueron significativamente menor que la ganancia en peso observada en camarones alimentados con Sim ($p=0.026$).

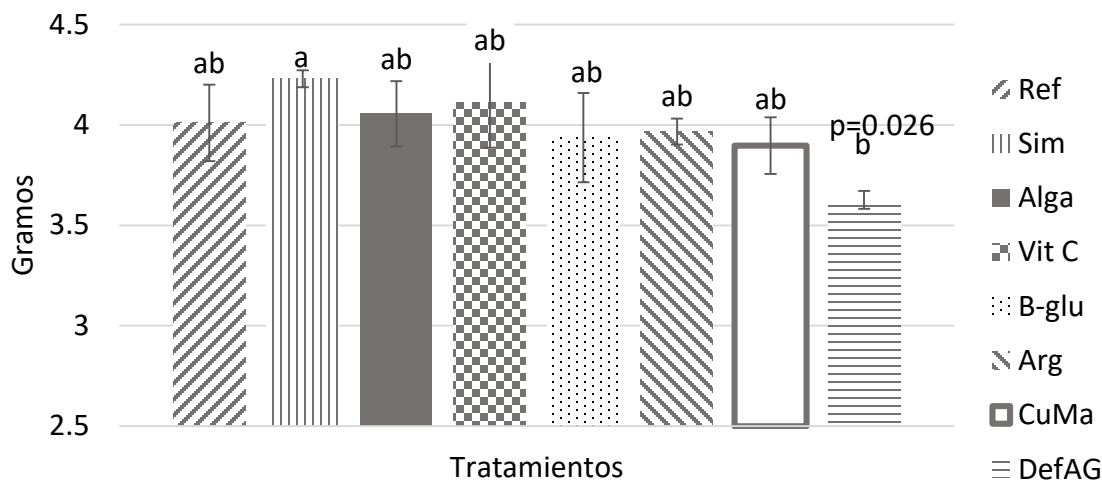


Figura 10. Ganancia de peso total en gramos por tratamiento.

En cuanto al factor de conversión alimenticia, los valores estuvieron entre 1.42 y 1.58, presentando diferencias significativas entre los tratamientos ($p=0.028$), mostrando tres diferentes agrupaciones de los cuales sobresalen los tratamientos Sim y Vit C con los valores más bajos y el alimento CuMa con el valor más alto (Fig. 11).

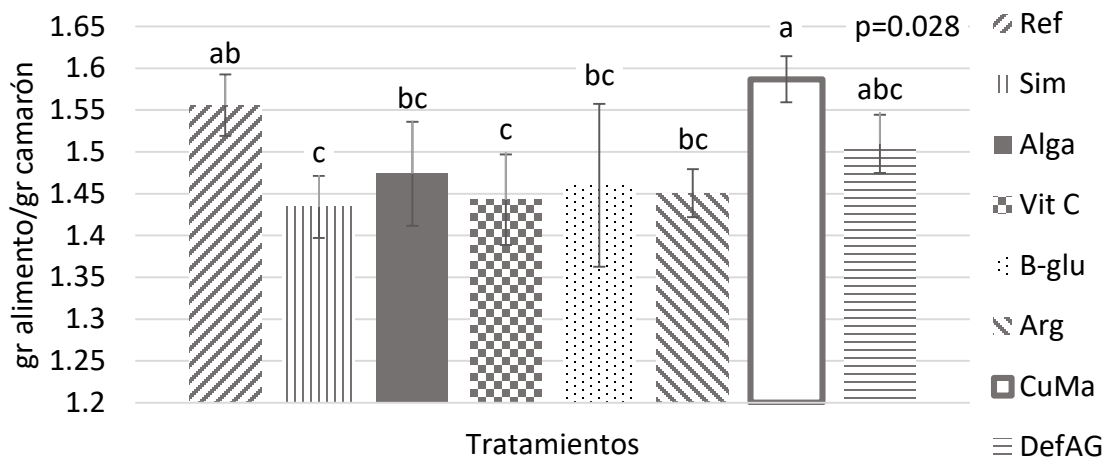


Figura 11. Factor de conversión alimenticia de los tratamientos.

Al finalizar el ensayo de crecimiento en camarón, los organismos que presentaron el mayor peso promedio, fueron los alimentados con Sim y el menor crecimiento lo obtuvo el alimento DefAG; lo que coincide con los valores de ganancia de peso, tasa de crecimiento y tasa de crecimiento específico (Tabla IV). En cuanto a la tasa de sobrevivencia, no se observaron diferencias significativas ($p > 0.05$).

Tabla IV. Parámetros de rendimiento del alimento en crecimiento.

	Peso Final (g)	Tasa Crecimiento (%)	Tasa de crecimiento especifico (% día ⁻¹)	Supervivencia (%)
Referencia	5.06±0.21 ^{ab}	380±13 ^{ab}	5.61±0.10 ^{ab}	97±6 ^a
Simbiótico	5.28±0.04 ^b	403±4 ^b	5.77±0.03 ^b	95±7 ^a
Extracto de 3 algas	5.11±0.16 ^{ab}	382±17 ^{ab}	5.62±0.13 ^{ab}	100±0 ^a
Vitamina C	5.16±0.21 ^b	391±23 ^b	5.68±0.17 ^b	100±0 ^a
β-glucano	4.99±0.23 ^{ab}	373±19 ^{ab}	5.55±0.14 ^{ab}	97±6 ^a
Arginina	5.03±0.08 ^{ab}	373±0.4 ^{ab}	5.55±0.01 ^{ab}	93±6 ^a
CuMa	4.95±0.14 ^{ab}	371±13 ^{ab}	5.53±0.10 ^{ab}	90±0 ^a
DefAG	4.67±0.05 ^a	348±5 ^a	5.36±0.04 ^a	100±0 ^a
ANOVA	0.027	0.021	0.019	0.116

7.2 Evaluación de alimentos funcionales en respuesta a infecciones con WSSV y Vp_{AHPND} en camarón blanco

7.2.1 Reto infeccioso con WSSV

7.2.1.1 Titulación de virus

El inóculo conteniendo 4.5×10^4 copias virales de WSSV por microlitro resultó el más adecuada para el reto, ya que la mortalidad del 50% de los organismos fue la mejor distribuida en el tiempo (Fig. 12); obteniendo una dosis calculada de 12.5 μL de inóculo por gramo de camarón.

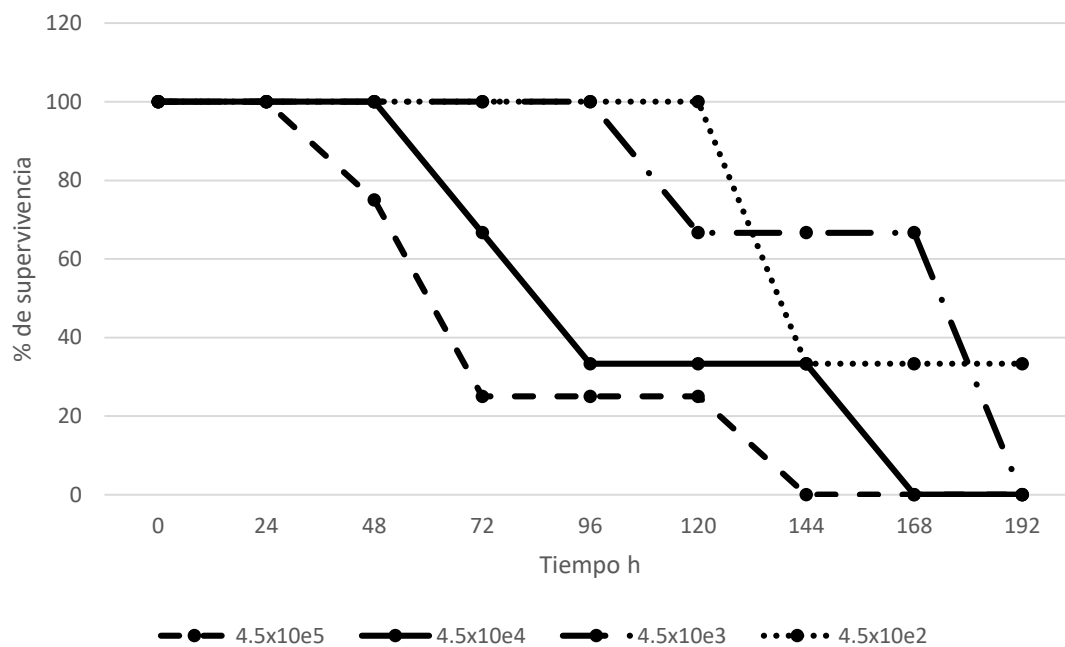


Figura 12. Porcentaje de supervivencia en camarón blanco en la titulación con virus de WSSV.

7.2.1.2 Supervivencia de camarones retados con WSSV

La mortalidad inició las 24 h, sin embargo, el mayor porcentaje de mortalidad se presentó entre las 48 y 60 h, estabilizándose a las 72 h (Fig. 13), en donde los camarones alimentados con CuMa presentaron la mayor supervivencia (60%), seguido de los alimentados con extracto de algas (45%). Por el contrario, los camarones a los que se les suministraron el alimento referencia (Ref), vitamina C (Vit. C), y β -glucano (β -glu) presentaron mortalidades del 100% a las 72 h.

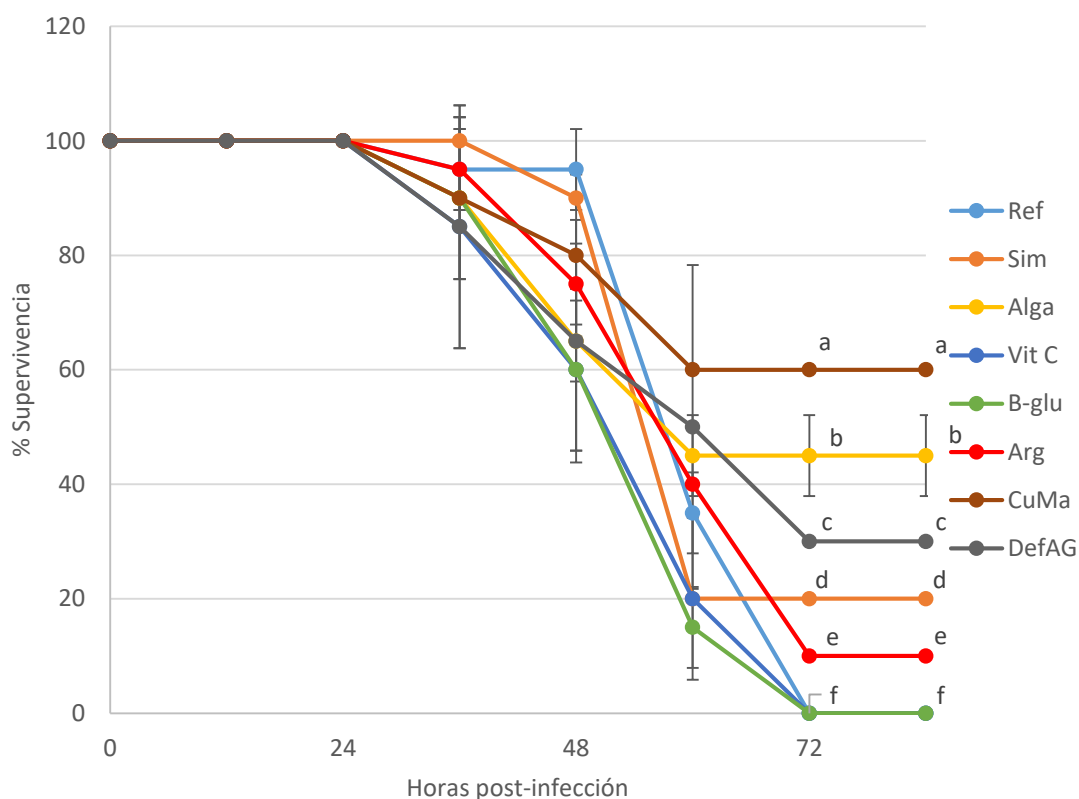


Figura 13. Porcentaje de supervivencia de camarones alimentados con dietas funcionales e infectados con WSSV.

El tiempo letal medio (Tabla V) el cual es el tiempo que toma el virus en provocar una mortalidad del 50% de los camarones infectados, fue calculado con la prueba de PROBIT,

obteniendo que los camarones alimentados con CuMa presentaron un valor de TLM de 70 h, siendo el tratamiento de mayor resistencia al virus, mientras que los camarones más susceptibles a la infección fueron los alimentados con vitamina C y β -glucano con una TLM de 48 h.

Tabla V. Tiempo letal medio en morir para camarones infectados con WSSV.

Alimento	TL 50
Referencia	54.7
Simbiótico	59.9
Extracto 3 algas	65.3
Vitamina C	48.7
β -glucano	48.8
Arginina	55.9
Plantas (Cúrcuma /maca)	70.7
Deficiente ácidos grasos	60.6

De acuerdo a la regresión GML (Fig. 14) se puede observar que los camarones alimentados con los tratamientos vitamina C y β -glucanos son los que presentaron mayor mortalidad por WSSV, por el contrario, los camarones alimentados con el alimento cúrcuma/maca y extracto de algas son los menos susceptibles.

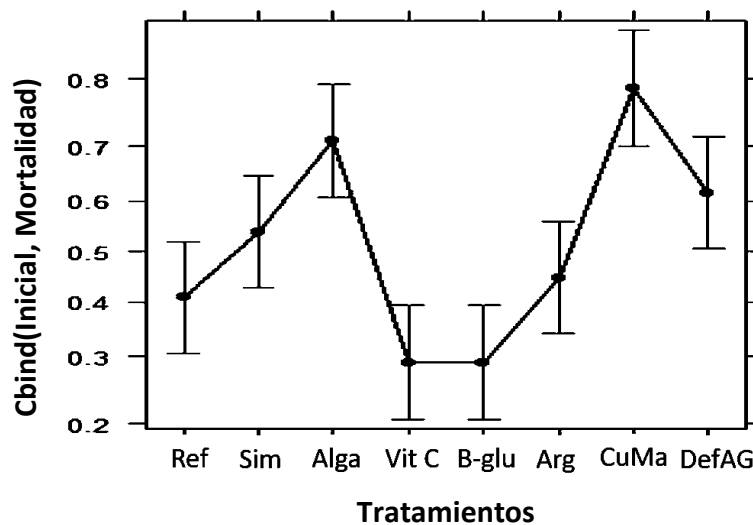


Figura 14. Regresión de Modelo Lineal Generalizado de mortalidad en camarón *P. vannamei* infectado con WSSV.

7.2.2 Reto con Vp_{AHPND}

7.2.2.1 Titulación de Vp_{AHPND}

La dilución 7.9×10^5 UFC/mL⁻¹ de la bacteria *V. parahaemolyticus* resultó la más adecuada para el reto, ya que la mortalidad del 50% de los organismos fue la mejor distribuida en el tiempo (Fig. 15).

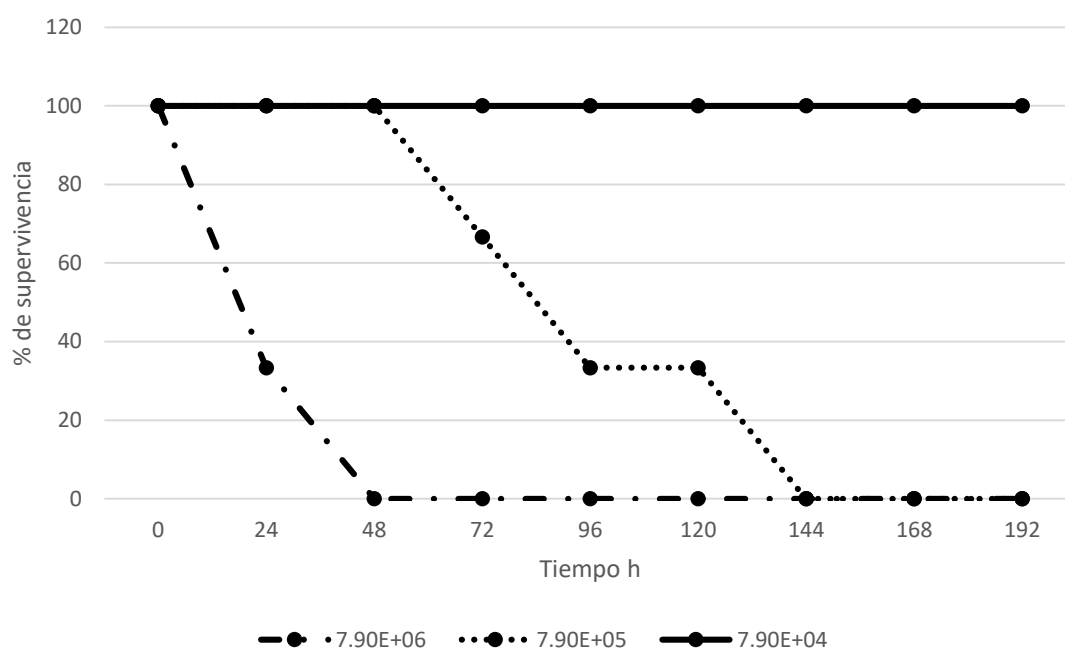


Figura 15. Porcentaje de supervivencia en camarón blanco en la titulación con Vp_{AHPND} .

7.2.2.2 Supervivencia de camarones retados con Vp_{AHPND}

De acuerdo con los datos obtenidos de supervivencia en este reto, se pudo observar que a las 120 h los tratamientos deficientes en ácidos grasos y el tratamiento simbiótico presentaron menos del 40 % de supervivencia, en contraste con los camarones alimentados con CuMa que presentaron el mayor porcentaje de organismos vivos (85%) (Fig. 16).

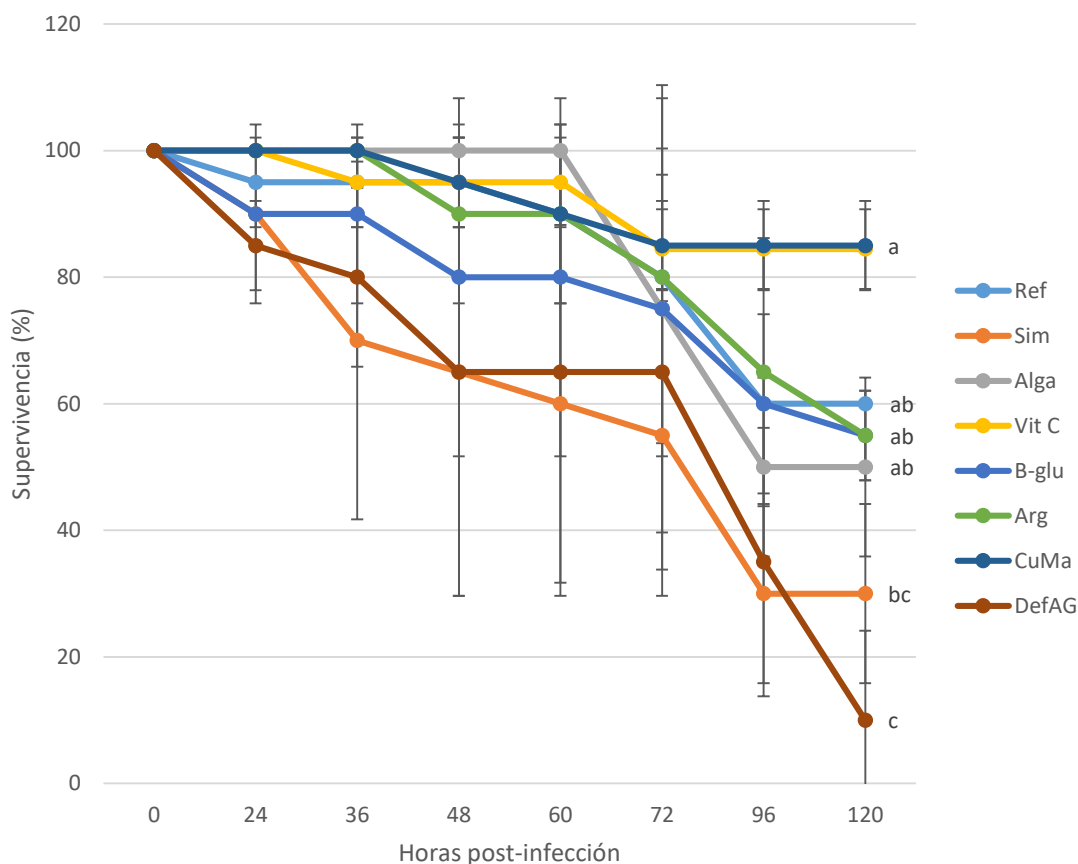


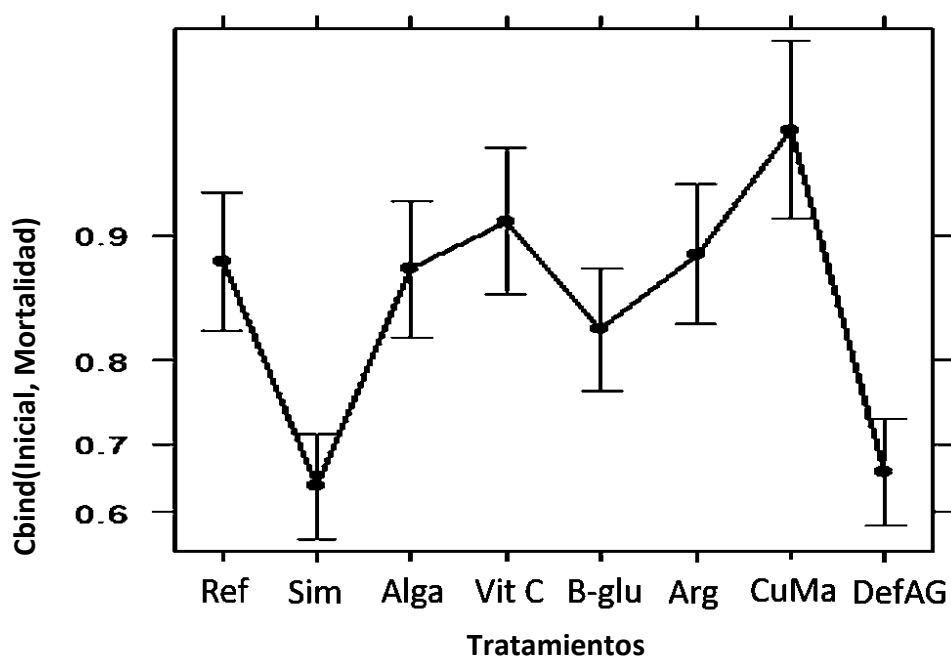
Figura 16. Porcentaje de supervivencia en horas post-infección con Vp_{AHPND} .

Para los camarones alimentados con CuMa se obtuvo un valor de TLM de 377 h (Tabla VI), siendo el tratamiento de mayor resistencia al patógeno, mientras que los camarones más susceptibles a la infección fueron los alimentados con Sim y DefAG con valores de TLM menores a 66 h.

De acuerdo a la regresión GML (Fig. 17), se puede observar que los camarones alimentados con los tratamientos Sim y DefAG son los que presentaron mayores tasas de mortalidad por WSSV, y los camarones alimentados con el alimento cúrcuma/maca son los menos susceptibles.

Tabla VI. Tiempo letal medio en morir para camarones infectados con AHPND.

Alimento	TL 50
Referencia	171.5
Simbiótico	62.6
Extracto 3 algas	104.9
Vitamina C	280
β -glucano	183
Arginina	132
Plantas (Cúrcuma /maca)	377
Deficiente ácidos grasos	65.3

**Figura 17.** Regresión de Modelo Lineal Generalizado de mortalidad en camarón *P. vannamei* infectado con Vp_{AHPND} .

7.3 Genes expresados diferencialmente en camarones (*P. vannamei*) resistentes y susceptibles a patógenos

7.3.1 Transcriptoma de *novo*

Limpieza de lecturas

Como se puede observar de ejemplo en la figura 18 las secuencias del tratamiento Ref presentaron valores de calidad mayores a 30 en el rango de coloración verde, indicando que se obtuvieron lecturas de buena calidad y con longitud de 151 pares de bases. Para todas las librerías de los distintos tratamientos se obtuvieron valores similares.

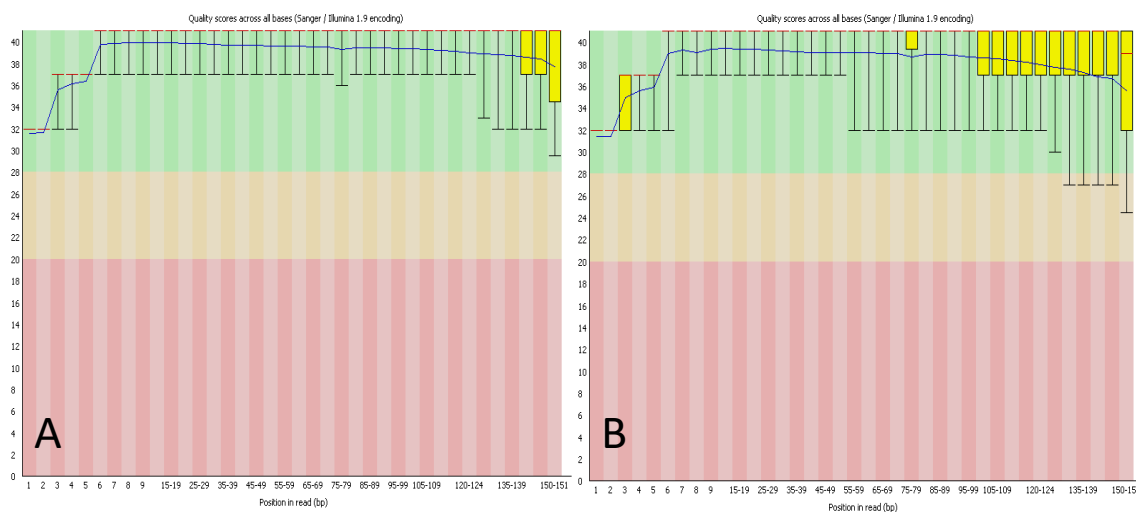


Figura 18. Calidad de lecturas de las librerías de camarones diferencialmente alimentados con el alimento de referencia. Forward (A), reverse (B), eje Y es valor Q, eje X es la posición de los nucleótidos en pares de bases.

Ensamble de librerías

Como se muestra en la tabla VII, el ensamble del transcriptoma *de novo* presentó un total de 126,031 genes compuestos de 198,899 transcritos, con un N50 de 1623 pb, una longitud promedio de 359 y un promedio de 791.90 pb por contig. Se ensamblaron 157 millones de bases. Las isoformas presentaron un N50 de 884 pb, con longitudes medias de 317 pb, y longitudes promedio de 593.69 pb, ensamblando 74 millones de bases.

Tabla VII. Genes ensamblados.

Total de genes: 126,031. Total de transcritos: 198,899.	
Contigs transcritos:	Isoforma más larga por gen:
Contig N10: 5627	Contig N10: 4529
Contig N20: 4029	Contig N20: 3016
Contig N30: 2976	Contig N30: 2081
Contig N40: 2218	Contig N40: 1396
Contig N50: 1623	Contig N50: 884
Longitud media de contig: 359	Longitud media de contig: 317
Promedio contig: 791.90	Promedio contig: 593.69
Total bases ensambladas: 157 507 253	Total bases ensambladas: 74 822 995

Expresión diferencial

Como se puede observar en la figura 19, al momento de comparar un tratamiento con otro, los genes resultantes expresados diferencialmente se muestran en coloración roja. El *heatmap* que agrupa clusters con expresión similar, indica que las replicas se agrupan en clusters (Fig. 20).

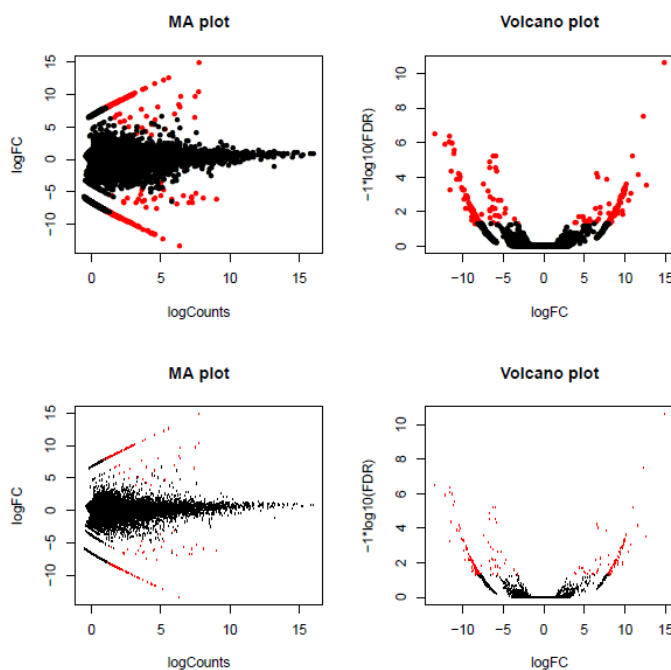


Figura 19. Gráfica de volcán que muestra los genes expresados diferencialmente entre los tratamientos Alga vs Ref.

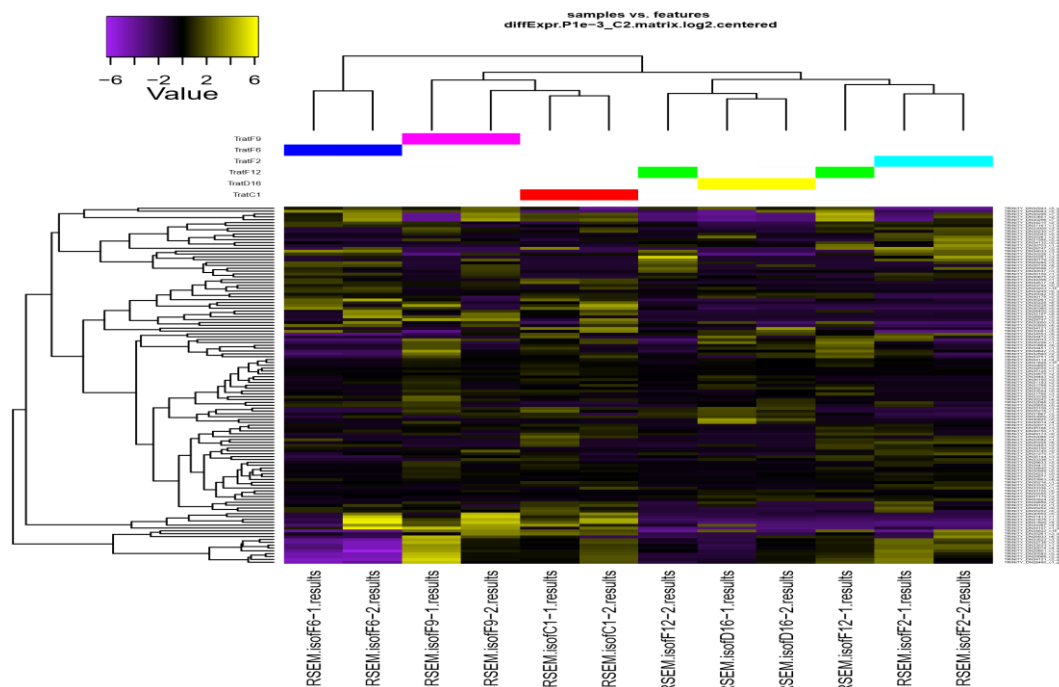


Figura 20. Agrupamiento de librerías en relación a los genes sobre-expresados y sub-expresados entre los distintos tratamientos.

7.3.2 Genes identificados en camarones que presentaron resistencia a WSSV.

Los genes expresados diferencialmente relacionados a la resistencia a WSSV se obtuvieron de múltiples comparaciones entre los tratamientos CuMa y Alga (resistentes) y los tratamientos Bglu, Ref y Vit C (susceptibles). Se observaron 61 genes sobre-expresados en organismos resistentes y susceptibles entre los cuales 65% de ellos están anotados. Catorce de estos genes (Tabla VIII) se expresan en más de dos tratamientos que presentaron mejor resistencia al WSSV, lo que indica su posible utilización como marcadores de resistencia. Un ejemplo es el Twitchin el cual se sobre-expresa en los tratamientos Alga y CuMa (resistentes) respecto a los tratamientos Bglu, Ref y VitC (susceptibles) (Fig. 21).

En cuanto a los genes sub-expresados se encontraron 166, de los cuales el 77% fueron anotados, 37 genes (Tabla IX) se sub-expresan en tres o más tratamientos que presentaron resistencia, por lo que también se pueden llegar a considerar marcadores, como la cinasa

de la cadena ligera de miosina la cual se reprime en los tratamientos Alga y CuMa respecto a los tratamientos mas susceptibles (Ref, Bglu y VitC) (Fig. 22).

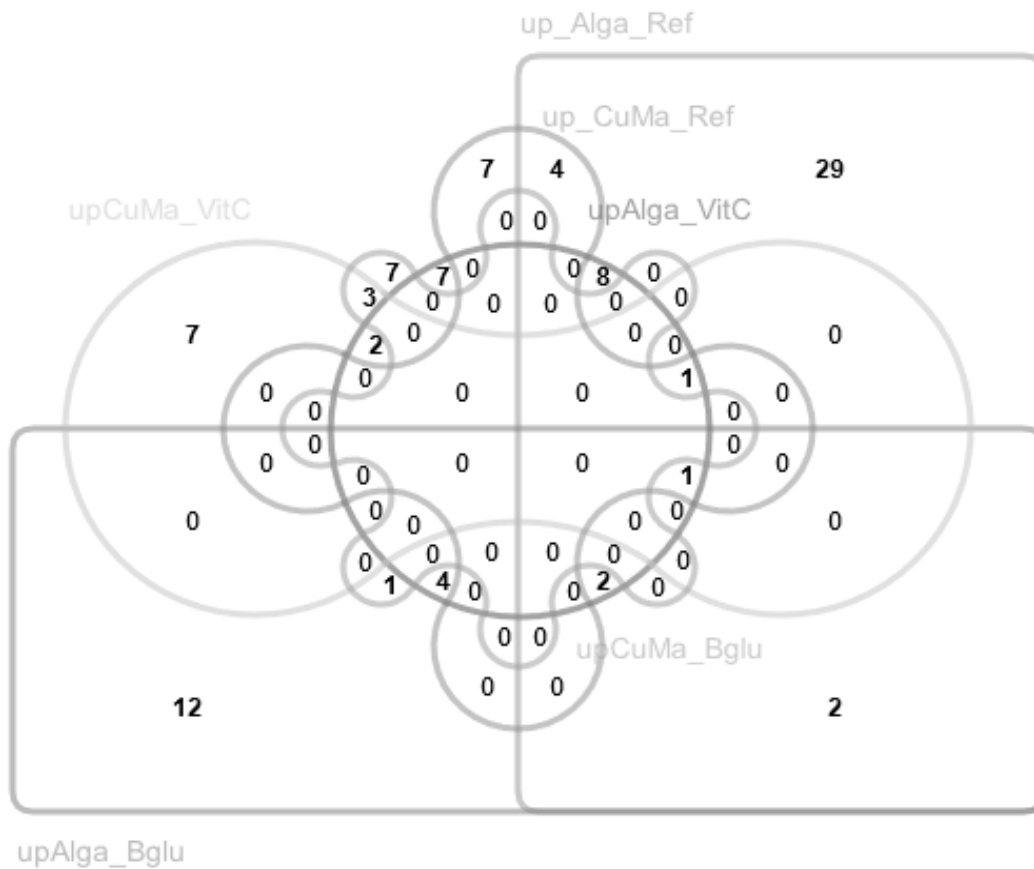


Figura 21. Número de genes sobre-expresados en común en camarones alimentados con tratamientos que confieren resistencia a la infección con WSSV (CuMa y Alga).

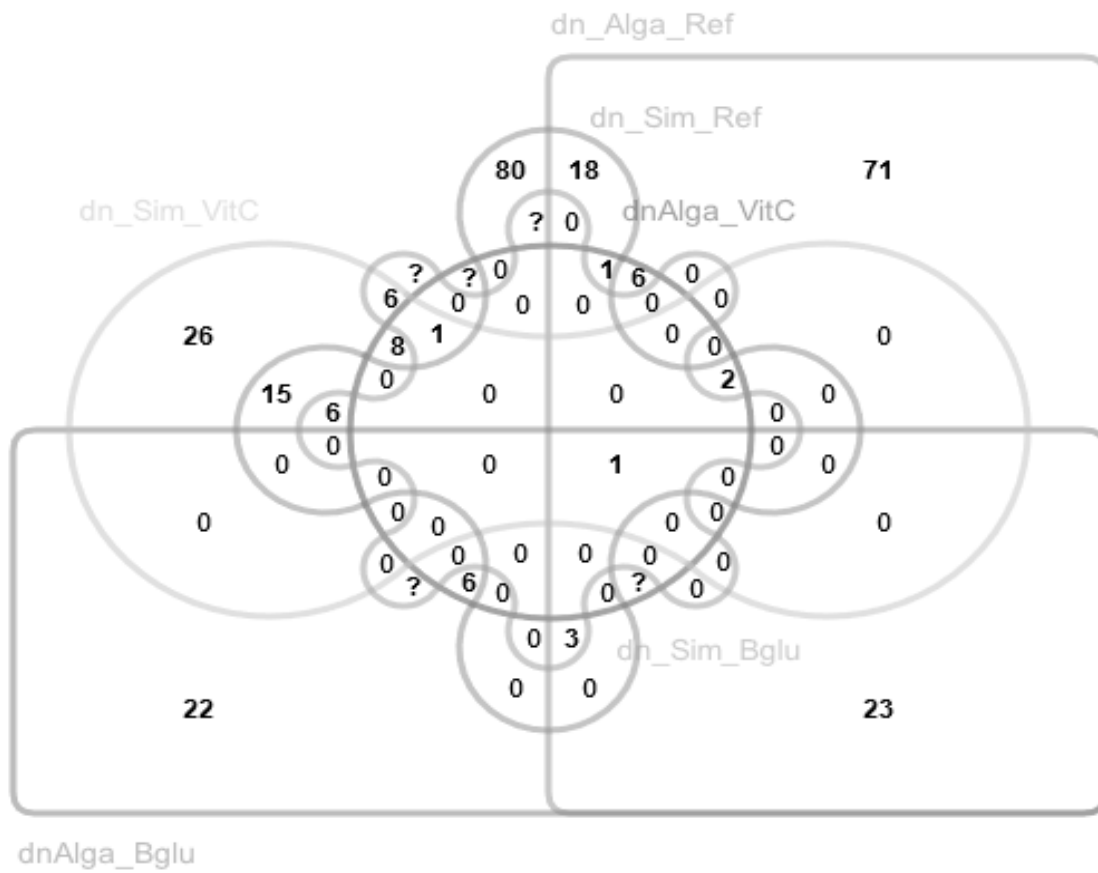


Figura 22. Número de genes sub-expresados en común en camarones alimentados con tratamientos que confieren resistencia a la infección con WSSV (CuMa y Alga).

Tabla VIII. Genes sobre-expresados diferencialmente asociados a resistencia a WSSV.

GENES SOBRE-EXPRESADOS		14
ID_Gen	Nombre	Gen
Proteínas estructurales		
P82119	Proteína cuticular 6	N/A
P81580	Proteína cuticular CP1158	N/A
O80839	Proteína que contiene el dominio LIM	PLIM2A
Q28685	Distroglicano	DAG1
Contracción muscular		
Q23551	Twitchin	unc-22
Q15746	Cinasa de cadena ligera de la miosina, músculo liso	MYLK
Reguladoras de traducción		
Q6GVM3	Factor de iniciación de la traducción eucariótica 1A, cromosómico Y	EIF1AY
Reguladoras de transcripción		
P68037	Ubiquitina conjugando la enzima E2 L3	Ube2I3
Adhesión celular		
P49024	Paxilina	PXN
Metabolismo de lípidos		
Q5R439	Vigilina	HDLBP
Desconocido		
Desconocido28605_c0_g1_i6		
Desconocido30292_c0_g2_i2		
Desconocido30703_c1_g2_i1		
Desconocido34132_c0_g1_i3		

Tabla IX. Genes sub-expresados diferencialmente asociados a resistencia a WSSV

GENES SUB-EXPRESADOS		GENES SUB-EXPRESADOS	
ID_Gen	Nombre	ID_Gen	Nombre
Proteínas estructurales		Respuesta inmune	
Q11002	Calpaina-A	P45521	Actina
P81384	Proteína cuticular AMP1A	Q05086	Ubiquitina-proteína ligasa E3A
Q7JZV0	Proteína cuticular 47Eg	Q5RD73	Proteína de especificidad dual fosfatasa 3
Q9ERGO	Dominio LIM y proteína de unión a actina 1	Q9JMH9	Miosina no convencional-XVIIIa
Q29GR8	Moesina/ezrina/homólogo de radixina 1	Reparación ADN	
Q7TPW1	Nexilina	Q80TP3	Ubiquitina E1 – proteína ligasa
Q00963	Cadena beta de la espectrina	Metabolismo de carbohidratos	
Q8N2Y8	Iporina	P52034	ATP - dependiente 6 - fosfofructoquinasa
Q9HCD6	Proteína TANC2	Metabolismo de Proteínas	
Reguladores de apoptosis		P00504	Aspartato aminotransferasa, citoplasmática
Q9TZM3	Serina de repetición rica en leucina / treonina-proteína quinasa 1	Enzimas	
Q863I2	Serina / treonina-proteína quinasa OSR1	P40301	Subunidad alfa tipo 2 del proteasoma
Q6SJE0	Receptor de la familia GDNF tipo alfa	Ciclo celular	
Reguladores de transcripción		Q9I7U4	Titina
Q00492	Factor de transcripción SUM-1	Contracción muscular	
Q9VC61	Proteína homóloga CREBRF	Q28824	Cinasa de cadena ligera de la miosina, músculo liso
Adhesión celular		Reparación membranar	
P49024	Paxilina	Q69ZN7	Mioferlina
Q00174	Subunidad alfa de laminina	Desconocido	
Transportadores		B4MTY2	Proteína UPF0518
Q13439	Miembro de la subfamilia golgin A 4	Q27421	Proteína extendida
Q95V25	Canal de potasio activado por calcio	Desconocido30053_c2_g1_i1	
Migración celular		Desconocido30887_c1_g2_i3	
P05661	Cadena pesada de miosina, músculo	Desconocido31800_c8_g4_i1	
		Gen	
		N/A	
		UBE3A	
		DUSP3	
		Myo18a	
		Ubr5	
		Pfk	
		GOT1	
		Prosalpha2	
		sls	
		MYLK	
		Myof	
		GK23746	
		osp	

Los genes se clasificaron de acuerdo al proceso biológico en el que participan (Fig. 23), encontrando mayor abundancia en los sobre-expresados de las proteínas estructurales (4 genes), desconocidos (4) y contracción muscular (2). En sub-expresados los grupos más abundantes son proteínas estructurales (9 genes), desconocidos (7), respuesta inmune (3) y reguladores de apoptosis (3).

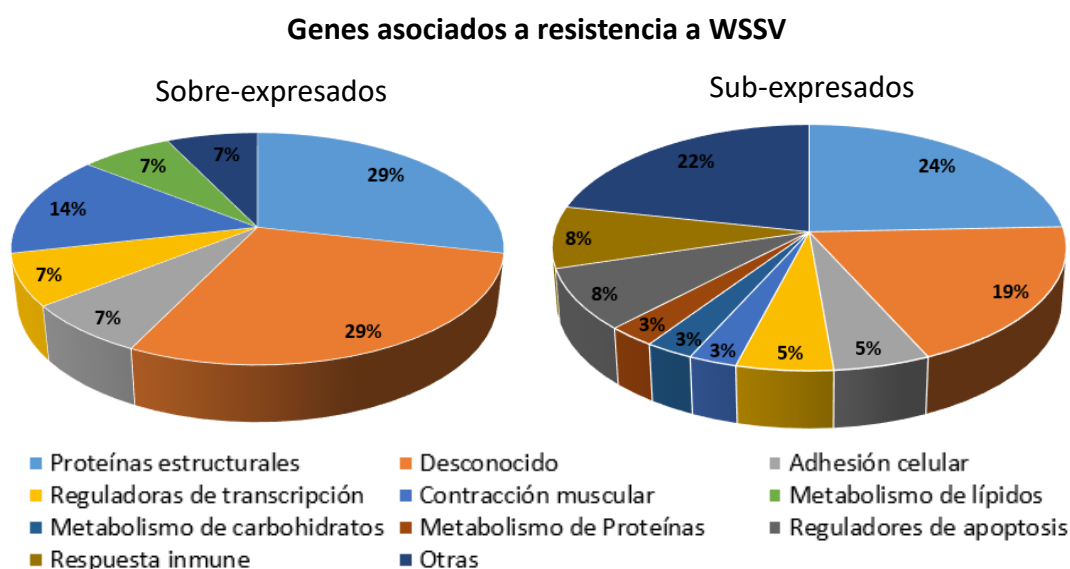


Figura 23. Clasificación de genes asociados a resistencia a WSSV por su proceso biológico.

7.3.3 Genes asociados a resistencia con Vp_{AHPND} .

Los genes expresados diferencialmente relacionados a la resistencia a Vp_{AHPND} se obtuvieron de múltiples comparaciones entre los tratamientos CuMa y Vit C (resistentes) y los tratamientos Sim y DefAG (susceptibles) (Fig. 24). Se identificaron 18 genes sobre-expresados en organismos resistentes (Tabla X), entre los cuales 83% de ellos presentaron anotación.

En cuanto a los genes sub-expresados (Tabla XI), se encontraron 11 de los cuales 54% de ellos están anotados. Para considerar los genes como potencialmente relacionados a la resistencia a Vp_{AHPND} se consideró que el gen estuviera expresado diferencialmente en los 2

tratamientos seleccionados como resistentes en comparación con los tratamientos susceptibles (Fig. 25).

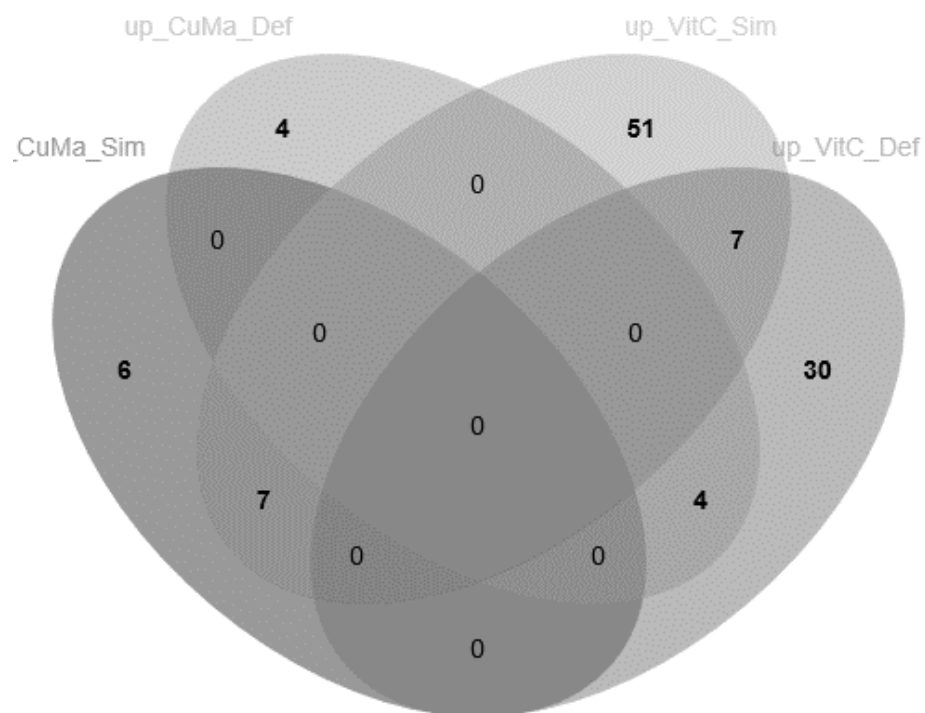


Figura 24. Número de genes sobre-expresados en común en camarones alimentados con tratamientos que confieren resistencia a la infección con *Vp_{AHPND}* (CuMa y VitC).

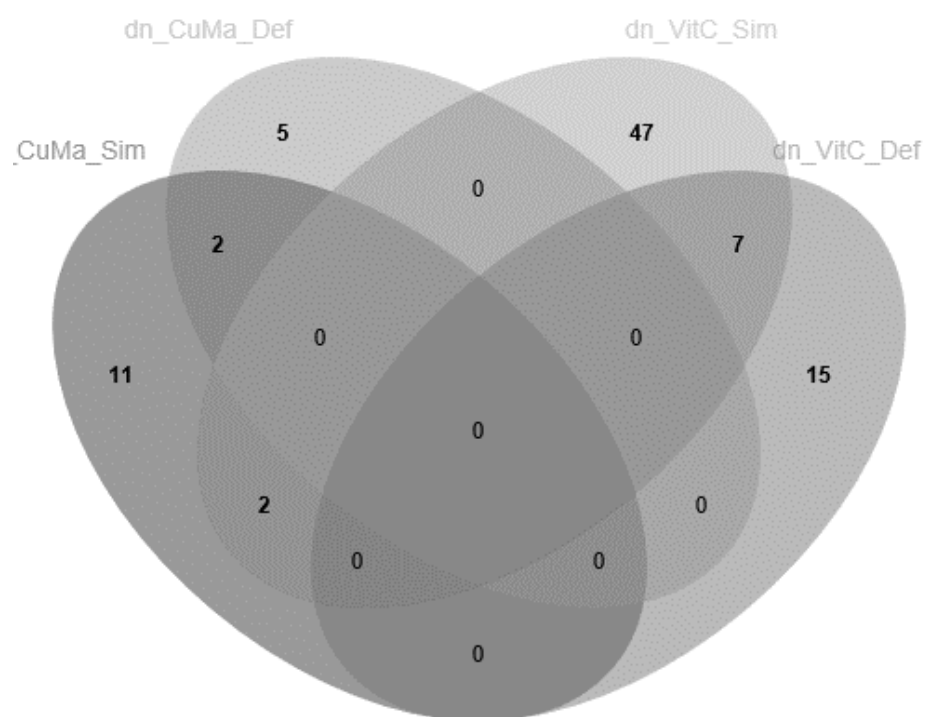


Figura 25. Número de genes sub-expresados en común en camarones alimentados con tratamientos que confieren resistencia a la infección con *Vp_{AHPND}* (CuMa y VitC).

Tabla X. Genes sobre-expresados diferencialmente asociados a resistencia a *Vp_{AHPND}*.

GENES SOBRE-EXPRESADOS		18
ID_Gen	Nombre	Gen
Ciclo celular		
B1H2T2	Homólogo de proteína 1 suprimido en autismo	N/A
Q9I7U4	Titina	sls
P54612	Serina/treonina - proteína fosfatasa 2A 65 kDa subunidad reguladora A isoforma alfa	PPP2R1A
Proteínas estructurales		
A8DYP0	Oscurina	Unc-89
P81388	Proteína cuticular AMP4	N/A
Q25009	Cadena de tubulina beta-1	N/A
Q9HCD6	Proteína TANC2	Tanc2
Metabolismo de lípidos		
P27615	Proteína de membrana lisosomal 2	Scarb2
Metabolismo de carbohidratos		
Q6P7A9	Lisosoma alfa-glucosidasa	Gaa
Q17GM7	Probable citrato sintasa 1, mitocondrial	AAEL002956
Metabolismo de Proteínas		
Q7SY23	Delta-1-pirrolina-5-carboxilato deshidrogenasa, mitocondrial	aldh4a1
Transportador		
P15381	Subunidad alfa-1C del canal de calcio voltaje-dependiente tipo L	CACNA1C
Reparación ADN		
F1MKX4	Complejo activador subunidad 4 proteasoma	PSME4
Respuesta inmune		
Q9JMH9	Miosina no convencional-XVIIIa	Myo18a
Contracción muscular		
Q28824	Cinasa de cadena ligera de la miosina, músculo liso	MYLK
Desconocido		
	Desconocido_32943_c5_g1_i4	
	Desconocido_33945_c11_g3_i1	
	Desconocido_33009_c3_g1_i2	

Tabla XI. Genes sub-expresados diferencialmente asociados a resistencia a Vp_{AHPND}

GENES SUB-EXPRESADOS		11
ID_Gen	Nombre	Gen
Metabolismo de carbohidratos		
Q16851	UTP-glucosa-1-fosfato uridililtransferasa	UGP2
Metabolismo de Proteínas		
Q7SY23	Delta-1-pirrolina-5-carboxilato deshidrogenasa, mitocondrial	aldh4a1
Q9Y2Q3	Glutación S-transferasa kappa 1	GSTK1
Señalización		
Q24423	Proteína NOC dedo de zinc	N/A
Contracción muscular		
Q15746	Cinasa de cadena ligera de la miosina, músculo liso	MYLK
Respuesta inmune		
P98092	Hemocitina	N/A
Desconocido		
Desconocido_33098_c4_g1_i6		
Desconocido_33336_c1_g3_i7		
Desconocido_34751_c3_g2_i4		
Desconocido_35097_c5_g2_i4		
Desconocido_31797_c4_g2_i3		

Los genes se clasificaron de acuerdo al proceso biológico en el que participan (Fig. 26), encontrando en mayor abundancia en sobre-expresados las proteínas estructurales (4 genes), desconocidos (3) y ciclo celular (3), en sub-expresados los grupos más abundantes son desconocidos (5 genes) y metabolismo de proteínas (2).

Genes asociados a resistencia a *Vp*.

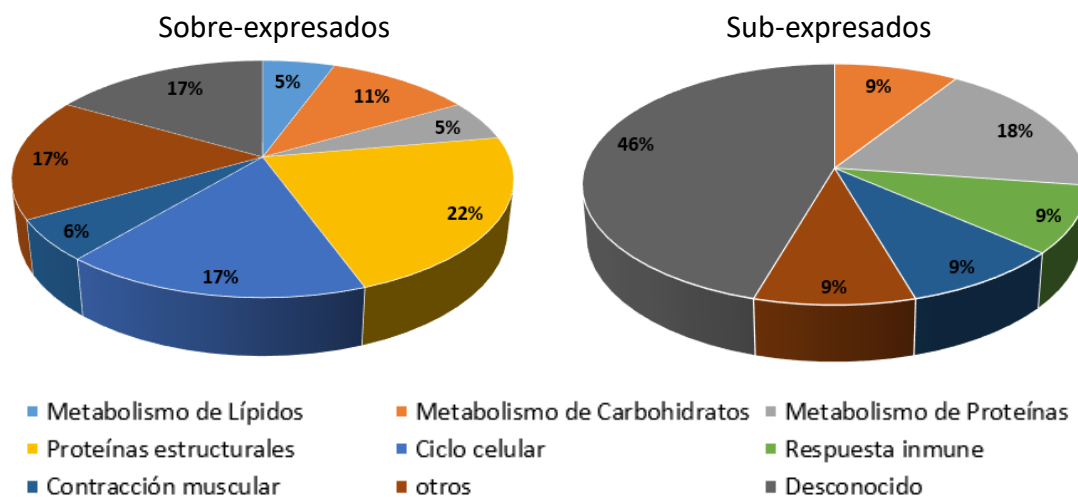


Figura 26. Clasificación de genes asociados a resistencia a *Vp_{AHPND}*.

Se identificaron cinco genes de resistencia en el camarón (Tabla XII) los cuales se presentaron en las dos condiciones de infección. Cabe mencionar que en algunos genes, como en el caso de MYLK, se presentaron diferentes isoformas expresadas diferencialmente entre los tratamientos.

Tabla XII. Genes expresados diferencialmente en las dos condiciones de infección (WSSV y *Vp_{AHPND}*).

ID Gen	Nombre	Gen
Ciclo celular		
Q9I7U4	Titina	sls
Proteínas estructurales		
Q9HCD6	Proteína TANC2	Tanc2
Respuesta inmune		
Q9JMH9	Miosina no convencional XVIIIa	Myo18a
Contracción muscular		
Q28824	Cinasa de cadena ligera de la miosina.	MYLK
Metabolismo de proteínas		
Q7SY23	Delta-1-pirrolina-5-carboxilato deshidrogenasa, mitocondrial	aldh4a1

8. DISCUSIÓN

8.1 Evaluación de rendimiento productivo en camarón blanco alimentado con dietas funcionales.

Las condiciones del experimento se mantuvieron de manera adecuada de acuerdo con diferentes autores (Álvarez *et al.*, 2003; Benítez *et al.*, 2018; Casas *et al.*, 2006; Cruz *et al.*, 2000; Flores, 2006), manteniendo la temperatura, oxígeno y salinidad de manera estable.

En el ensayo de crecimiento se observó que los alimentos más consumidos fueron en primer lugar el alimento Ref, seguido de CuMa y en tercer lugar el Sim, y tomando en cuenta que la fórmula del alimento Ref se utilizó como base para elaborar el resto de los alimentos, se considera que los diferentes aditivos funcionales influyeron en la atractabilidad y/o palatabilidad de los alimentos. En el caso del alimento DefAG, que fue el menos consumido, el bajo consumo se atribuye a la ausencia de aceite de pescado que actúa como atrayente del alimento.

En cuanto a la ganancia de peso y tasa de crecimiento el alimento más eficiente fue el simbiótico, esto se debe a que los probióticos incrementan la biodisponibilidad de nutrientes en el sistema digestivo, activan enzimas digestivas como proteasa y amilasa, además de mejorar el tránsito intestinal permitiendo aprovechar mejor el alimento, viéndose reflejado en la mejora del rendimiento en el crecimiento (Silveira *et al.*, 2003; Adel *et al.*, 2017). Por su lado el prebiótico ayuda a proliferar bacterias benéficas como las contenidas en el probiótico adicionado en el alimento, mejorando la digestibilidad de los nutrientes y potenciando el crecimiento (Gainza-Oreste y Romero-Jaime, 2017). En cambio el alimento menos eficiente en ganancia de peso y tasa de crecimiento fue el DefAG, ya que este alimento contenía 0.8% de HUFAs n-3 totales y, de acuerdo con Alonso *et al.* (2004), se necesita un mínimo de 1% de HUFAs n-3 para el crecimiento adecuado del camarón. González *et al.* (2002) mencionan que se mejoró la tasa de crecimiento de los camarones mediante la adición de HUFAs n-3 (416 mg de EPA y 237 mg de DHA) logrando un óptimo

crecimiento, que en caso contrario con menores HUFAs sería perjudicial para el crecimiento.

Los valores de FCA observados en el presente trabajo (entre 1.42 y 1.58), son valores comúnmente observado en las granjas de camarón, Sin embargo, de acuerdo con la tasa de crecimiento y el factor de conversión alimenticia, el alimento Sim fue el más efectivo en cuanto a aprovechamiento, ya que tuvo un consumo de alimento considerable, su crecimiento fue el mejor y su FCA fue el más cercano a 1, lo cual, según Martínez *et al.* (2009) el valor de FCA mas óptimo es cercano a 1, lo que significa que un gramo consumido de alimento el camarón es convertido en un gramo de masa.

La supervivencia de los tratamientos durante el periodo experimental fue igual o superior al 90%, atribuyendo la mortalidad al manejo y características de la especie y no a los tratamientos dietarios.

8.2 Evaluación de alimentos funcionales en respuesta a infecciones con WSSV y Vp_{AHPND} en camarón blanco.

8.2.1 Titulación de patógenos.

Para poder realizar el reto de infección con WSSV se realizó la titulación del inóculo buscando una dosis que permitiera una mortalidad paulatina de mínimo 6 días. La mortalidad observada por las titulaciones 4.5×10^5 y 4.5×10^4 alcanzaron 100% dentro de 6-8 días, lo que es similar a los resultados reportados por Wu *et al.* (2005), obteniendo una mortalidad del 100% de camarones infectados por inyección entre 8-10 días con diluciones 10^4 , 10^5 y 10^6 . Cabe mencionar que el factor temperatura es primordial en la infección de este organismo (Departamento de pesca y acuicultura de la FAO, 2006; Morales y Cuéllar, 2008; Godínez *et al.*, 2012), es por eso que pueda existir una variación entre infecciones y tasa de mortalidad entre lo presentado en este trabajo y lo obtenido por Wu *et al.* (2005).

La mejor concentración obtenida en la titulación y la que se utilizó en este reto, fue de 4.5×10^4 con una mortalidad del 100% a las 168 h (7 días).

Para la titulación de la bacteria *Vp*_{AHPND}, el número de células estimado de 7.9×10^5 UFC/mL resultó la óptima para la DL50 en la infección en este caso, ya que otros autores como Feng *et al.* (2017) y Traifalgar *et al.* (2009) utilizaron números celulares más elevados (1×10^7 UFC/mL) de *Vibrio harveyi* y *Vibrio parahaemolyticus*. De igual forma, Lawhavinit *et al.*, (2011) utilizaron 1.5×10^8 UFC/mL de *Vibrio parahaemolyticus* y Taho *et al.* (2017) utilizaron 6×10^6 UFC/mL de *Vibrio parahaemolyticus* obteniendo una DL50 en 96 h.

8.2.2 Reto infeccioso con WSSV

Una vez aplicado el inóculo con la concentración de 4.5×10^4 , se observó una reacción al inóculo mayor a la esperada, ya que en la titulación se obtuvo una tasa de mortalidad del 100% a las 168 h y en el reto infeccioso se observó la misma mortalidad en menor tiempo que en la titulación, ya que el tratamiento control (alimento Ref) alcanzó el 100% de mortalidad en 72 h, esto puede estar relacionado con factores físicos como la temperatura, la cual es un factor que influye en el momento de la infección del virus, como lo menciona el Departamento de pesca y acuicultura de la FAO (2006) y Morales y Cuéllar, (2008). Aun así, los camarones alimentados con CuMa tuvieron el mejor desempeño en supervivencia además de ser más resistente al patógeno de acuerdo con el tiempo letal medio y la regresión de modelo lineal generalizado (MLG), logrando tener una supervivencia del 60% a las 84 h, tiempo en el que los demás tratamientos alcanzaron una supervivencia entre 0 y 50%.

La administración del alimento CuMa presentó una tasa de mortalidad más baja respecto a los demás tratamientos. A pesar de que no hay muchos trabajos sobre el uso de las plantas cúrcuma y maca en la acuicultura, y los que hay se encuentran orientados a crecimiento de peces (Rios y Ubidia, 2014; Salazar y Flores, 2013); se sabe que la cúrcuma posee

propiedades antivirales. Estudios previos sugieren que la curcumina afecta la envoltura lipídica del virus de la septicemia hemorrágica de salmón (Moya-Gonzalvez, 2016), ya que al tratar la línea celular embrionaria de salmón (*Oncorhynchus tshawytscha*) CHSE con extracto de cúrcuma en concentraciones entre 15 y 120 μ M se obtuvo una viabilidad superior al 90% de diferencia con los no tratados. Estos resultados sugieren que el pretratamiento con cúrcuma es capaz de inducir algún tipo de efecto antiviral en las células, de forma que se produce una reducción de la replicación del virus VHSV. Kim *et al.* (2009) encontraron que un extracto acuoso de cúrcuma reprime la replicación del virus de la Hepatitis B al incrementar los niveles de la proteína p53. Chen *et al.* (2013) demostraron que la curcumina afecta la integridad de las membranas de diversos virus, como es el caso de WSSV (Wu *et al.*, 2005), lo que disminuyó la replicación viral en cultivo de células de riñón de perro y mono.

En cuanto a la maca (el segundo componente del alimento CuMa, el más efectivo contra WSSV en este trabajo), posee alta actividad antioxidante como menciona Lee *et al.* (2005), ellos observaron una alta actividad antioxidante en la eliminación del radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH); Valentová y Ulrichová (2003) atribuyen esta actividad antioxidante a sus compuestos flavonoides e isotiocinatos aromáticos, además de ser una buena fuente que induce la fenoloxidasa, la cual participa en la respuesta inmune del camarón. La maca también posee adaptógenos, que son sustancias las cuales solamente poseen unas cuantas especies de plantas, aumentando la resistencia al estrés, ayudando al cuerpo o a la célula a obtener un equilibrio de funcionamiento (Arenas, 2011; Montes, 1990), por medio del atenuado de la disminución de glucosa y ácidos grasos libres plasmáticos causado por el estrés, optimizando así el uso de energía celular ante esta situación (López *et al.*, 2004; Montes, 1990; Valentová y Ulrichová, 2003). Además, la maca ayuda a reducir el índice de estrés atenuando la corticosterona plasmática (también llamada hormona del estrés), como lo demostró López *et al.* (2004) en ratones, la cual actúa como inmunosupresor, mediante la disminución de citocinas y anticuerpos en respuesta a un virus (Espinosa y Bermudez,

2001) por lo tanto, si la cúrcuma atenúa el efecto de la corticosterona, no se disminuirán estas respuestas inmunes.

Los camarones alimentados con los tratamientos Ref, Vit C y β -glu presentaron el peor desempeño con una supervivencia de 0% a las 72 h, considerándose como los tratamientos más susceptibles a la infección por WSSV. En el presente trabajo se utilizó una inclusión de 0.1% de vitamina C en el alimento referencia y 0.2% de vitamina C en el tratamiento VitC, esperando en el caso del tratamiento VitC una mayor resistencia al virus. Estos resultados difieren de lo reportado por Molina *et al.* (2012), donde camarones *P. vannamei* alimentados con 0.1% de Vitamina C en la dieta resultaron en una disminución de la mortalidad ante la infección de WSSV. Para el caso del tratamiento con β -glucano, se utilizó una concentración de 10 g por kg de alimento, no encontrando un efecto sobre la mejora en la supervivencia ante la infección de WSSV respecto al alimento referencia, contrario a lo reportado por Rodríguez *et al.* (2000).

En el caso del alimento deficiente DefAG, se esperaba una supervivencia del 0% en un tiempo más corto que el resto de los tratamientos debido a la deficiencia nutricional inducida, sin embargo, resultó ser el tercer tratamiento de mayor supervivencia con un 30% a las 84 h. Esto puede deberse a que el virus del síndrome de la mancha blanca utiliza lípidos del hospedero para poder replicarse (Apún *et al.*, 2017; Mathew *et al.*, 2007; Zhou *et al.*, 2008), que también pudiera generar un efecto similar con el tratamiento con cúrcuma y maca que tienen propiedades que alteran el metabolismo lipídico y modifican la capa lipídica del virus evitando así su ciclo de propagación (Chen *et al.*, 2013; López *et al.*, 2004).

8.2.3 Reto con *Vibrio parahaemolyticus* (Vp_{AHPND}).

En este reto, la mortalidad entre los tratamientos fue más paulatina que en el reto con WSSV, donde para el caso del virus se observó una mortalidad marcada entre las 24 y 72 h, mientras que para el reto bacteriano se observó una mortalidad entre las primeras 24 y 120

h. En el caso de infección con la cepa de *Vp* causante de AHPND, los animales alimentados con CuMa y Vit C, tuvieron la mayor supervivencia (85%) a las 120 h. Como se mencionó anteriormente, la cúrcuma y maca tienen propiedades que le otorgan mayor resistencia al organismo frente a un patógeno por sus componentes inmunoestimulantes. Pero en este caso la cúrcuma, además de contar con propiedades antivirales, también se le atribuye actividad antibacteriana, como lo mencionan Niamsa y Sittiwet (2009) y Lawhavinit *et al.* (2010, 2011) los cuales trabajaron con diferentes cepas bacterianas en agar, logrando halos de inhibición con cúrcuma. Lawhavinit *et al.* (2010, 2011) al utilizar cúrcuma observaron diámetros de inhibición de 14.7-21.5 mm aproximadamente de vibrios aislados de camarón, como la especie *Vibrio parahaemolyticus*. Vanichkul *et al.* (2010) además de observar una resistencia en camarones contra *V. harveyi*, disminuyendo un 37% la mortalidad en comparación al control, también menciona un aumento en la actividad fenoloxidasa y una disminución de bacterias patógenas en el intestino al alimentarlos con cúrcuma. Sahu *et al.* (2008) controlaron *Aeromonas* (bacterias Gram negativas al igual que *Vibrio*) en peces, encontrando diferencias significativas en expresión de aspartato amino-transferasa, la cual es una enzima participante en el metabolismo de los aminoácidos y que además es un gen que se expresó de manera diferencial en este trabajo indicando resistencia a *Vp*_{AHPND}.

En cuanto a la maca, además de presentar cualidades antioxidantes y anti-estrés anteriormente mencionadas, otorgadas por sus compuestos adaptogénicos, flavonoides e isotiocianatos, los cuales preparan al organismo a regular procesos fisiológicos para encontrar el equilibrio a nivel celular (Espinosa y Bermudez, 2001; Lee *et al.*, 2005; López *et al.*, 2004; Montes, 1990; Valentová y Ulrichová, 2003), también tiene propiedades antibacterianas gracias a los isotiocianatos como lo menciona Delaquis y Mazza (1995) y Lin *et al.* (2000). Cabe mencionar que para este ingrediente, no hay muchos trabajos donde se identifiquen sus cualidades antibacterianas.

Por otra parte, la vitamina C también fue un tratamiento efectivo en este trabajo contra *Vp*_{AHPND}. Dentro de las propiedades de la vitamina C ó ácido ascórbico, se encuentra que

tiene actividad antioxidante que minimiza el daño causado por productos oxidativos, incluyendo radicales libres. De tal manera los grupos ya oxidados en los centros prostéticos de enzimas se reducen, y los oxidantes y radicales libres se eliminan (Padh, 1991; Sakhawat *et al.*, 2018), además el ácido ascórbico mejora la respuesta inmune logrando aumentar los niveles de anión superóxido y la actividad fenoloxidasa (Lee y Shiau, 2002; López *et al.*, 2003; Zhou *et al.*, 2012). Niu *et al.* (2009) menciona que a mayor cantidad de ácido ascórbico, se obtuvo mayor supervivencia en *P. vannamei* sometido a estrés por baja concentración de oxígeno disuelto en el agua. También se menciona que la falta de vitamina C puede causar pérdida de apetito, disminuye las mudas, causa alta mortalidad y menor tolerancia a condiciones de estrés, además de la llamada “muerte negra” en peneidos, causado por la deficiencia de colágeno lo que genera necrosis (Lightner *et al.*, 1979). El ácido ascórbico en poslarvas de camarón mejora la resistencia en condiciones de estrés o infecciones bacterianas (Merchie *et al.*, 1997). En camarones *P. vannamei* alimentados con aditivos como la vitamina C, se obtuvo una mejora en su estado nutricional en comparación con los alimentados con el inmunoestimulante β -glucano, que presentaron fatiga inmune (López *et al.*, 2003).

La mayoría de las investigaciones han sido orientadas al requerimiento básico de vitamina C en camarones, buscando economizar este recurso (Lavens *et al.*, 1999; Shiau, 1998) o frente a situaciones de estrés, pero no se han realizado investigaciones sobre cómo reacciona un organismo dosificado con vitamina C frente a un patógeno, que pueda explicar el efecto de la vitamina sobre el metabolismo del organismo.

Los camarones alimentados con el tratamiento DefAG, presentaron una mortalidad mayor como era de esperarse, ya que se sabe que la deficiencia de HUFAs en la dieta puede ocasionar un estrés fisiológico que incrementa la susceptibilidad a enfermedades (Coutteau *et al.*, 1998; Ponce *et al.*, 2005).

8.3 Genes expresados diferencialmente entre camarones (*P.vannamei*) resistentes y susceptibles a patógenos

De los genes expresados diferencialmente, se encontraron algunas isoformas en común en camarones retados con ambos patógenos. Como es el caso del gen que codifica la cinasa de cadena ligera de la miosina (MYLK, por sus siglas en inglés), que en camarones resistentes a WSSV se encontró sobre-expresada la isoforma anotada como MYLK de bovino (ID_Gen Q15746), mientras que la isoforma identificada como MYLK de humano (ID_Gen Q28824) se encontró sobre expresada en camarones asociados a la resistencia a *Vp_{AHPND}*, esto se debe a que son diferentes isoformas del gen identificados dentro del grupo de las miosinas de cadena ligera. La expresión de este gen está relacionada con la susceptibilidad a enfermedades inflamatorias y trastornos inflamatorios como apoptosis y permeabilidad vascular (Gao *et al.*, 2006; Han *et al.*, 2012; Lazar y García, 1999). Otras de las isoformas encontradas como genes indicadores de resistencia a estrés causado por virus o por bacteria son las de los genes Aldh4a1, Myo18a, Sls y Tanc2.

8.3.1 Genes asociados a resistencia con WSSV

Algunos genes asociados a la resistencia a WSSV identificados en el presente estudio, han sido reportados por otros autores, como es el caso del gen que codifica la cadena ligera de miosina (MYLK) el cual se sub-expresó (en camarones alimentados con las dietas Alga y Sim) otorgando resistencia contra WSSV, coincidiendo con lo que obtuvieron Leu *et al.* (2007); Wang *et al.* (2006); Pan *et al.* (2005) y Rojtinnakorn *et al.* (2002). Esta proteína además de regular la interacción actina-miosina, también participa en la respuesta inflamatoria como apoptosis, permeabilidad vascular, migración celular, además de ser requerida para la cicatrización de heridas epiteliales; de igual forma el gen de cadena pesada de la miosina el cual se sub-expresó en los camarones (alimentados con alga) resistentes a WSSV coincidiendo con lo mencionado por Pan *et al.* (2005) y Rojtinnakorn *et al.* (2002) quienes mencionan que antes de la infección con WSSV estos genes se sub-expresan en camarones que resultan con resistencia al patógeno.

Otros genes que se sub-expresan en camarones resistentes a WSSV son: serina de repetición rica en leucina (identificado en camarones alimentados con Sim y Alga), el cual Zhao *et al.* (2007) reportan resultados opuestos a los obtenidos en este estudio, ya que ellos encontraron que este gen se sobre-expresó en el hepatopáncreas de *P. vannamei* resistentes a WSSV; la moesina/ezrina/radixina homóloga 1 (en camarones alimentados con Alga) y la actina (en camarones alimentados con Sim y Alga) también son genes indicadores de resistencia coincidiendo con lo reportado con Rojtinnakorn *et al.* (2002) en *P. japonicus*, sin embargo, no coincide con lo que mencionan Leu *et al.* (2007), ya que ellos observaron una sobre-expresión de actina en *P. monodon* resistentes. El gen que codifica el factor de iniciación de la traducción eucariótica 1A, cromosómico Y que se sobre-expresó en camarones (alimentados con Sim) resistentes a WSSV, también coincide con lo encontrado por Rojtinnakorn *et al.* (2002). Se ha visto también que genes relacionados con la resistencia a WSSV, se expresan por efecto del consumo de plantas como en el caso del alimento CuMa; el cual hizo que se sub-expresara el gen que codifica la enzima aspartato aminotransferasa por efecto de la cúrcuma, lo cual coincide con lo mencionado por Sahu *et al.* (2008).

Algunos de los genes observados en camarones retados en este estudio resistentes a WSSV, se han reportado como indicadores de resistencia a otras enfermedades como en lo mencionado en Lorgeril *et al.* (2005), los cuales lograron identificar en camarones (*L. stylirostris*) sobrevivientes a una vibriosis, genes involucrados en la diferenciación hematopoyética como el gen serina/treonina proteína quinasa (sobre-expresado) y reguladores del ciclo celular como radixina (sub-expresado), genes que también se expresaron en el reto con WSSV.

8.3.2 Genes asociados a resistencia con Vp_{AHPND} .

Se ha demostrado que el camarón, además de contar con un sistema inmune innato, también logra sintetizar algunos tipos de proteínas las cuales le ayudan a adquirir resistencia a enfermedades causadas por algunas bacterias como las del género *Vibrio sp.*

Algunos autores han descrito una sobre-expresión de genes en camarón relacionados a la resistencia a Vibriosis, como las peneidinas (Muños *et al.*, 2004) y LvSpz4 (Yuan *et al.*, 2016), genes los cuales no se identificaron en el presente trabajo. Sin embargo, de los genes identificados en este estudio han mostrado ser indicadores de resistencia a otros patógenos en otros organismos, como el Pkinase o también llamado oscurina, se ha reportado como una proteína que confiere resistencia a *Pseudomonas syringae* en tomate (Zhou *et al.*, 1997). Por otro lado, algunos de estos genes asociados a la resistencia a Vp_{AHPND} en el presente trabajo, se han reportado como indicadores de resistencia para WSSV por otros autores, como el gen glutatión-S-transferasa el cual se sub-expresó en este estudio por efecto de los alimentos CuMa y VitC en el reto patológico con Vp_{AHPND} , sin embargo Pan *et al.* (2005) observaron que se sobre-expresa de manera diferencial en camarones (*P. japonicus*) supervivientes a WSSV; otro gen es el Delta-1-pirrolin-5-carboxilato deshidrogenasa mitocondrial el cual en este estudio se encontró una isoforma del gen que se sub-expresaron en los camarones alimentados con VitC resistentes a Vp_{AHPND} , al igual que lo reportado por Dhar *et al.* (2003) pero en camarones infectados con WSSV; otros genes reportados por Rojtinnakorn *et al.* (2002) como resistentes a WSSV son los genes de proteína NOC dedo de zinc (sub-expresado) y Tubulin beta-1 chain (sobre-expresado), los cuales no fueron encontrados expresados diferencialmente en los camarones resistentes a WSSV pero si en los resistentes a Vp_{AHPND} , lo que sugiere que estos genes pueden ser buenos indicadores de resistencia a diversos patógenos.

Después de una extensa búsqueda bibliográfica, no se logró encontrar más información sobre genes de resistencia a AHPND en camarón, ya que los trabajos encontrados están orientados a la identificación y caracterización del patógeno *Vibrio sp.*, y las toxinas *PirA* y *PirB*. Por lo tanto, este trabajo aporta información novedosa sobre los genes de resistencia en camarón blanco *P. vannamei* a la bacteria *V. parahaemolyticus* toxigénica causante de AHPND.

9. CONCLUSIONES

El óptimo crecimiento del camarón blanco *P. vannamei*, se obtuvo con el alimento funcional Simbiótico (Sim), y el alimento con menor rendimiento fue el deficiente en ácidos grasos altamente insaturados (DefAG).

El alimento con cúrcuma y maca (CuMa) confirió mayor resistencia en el camarón a los patógenos evaluados, seguido en el caso de WSSV por el alimento con extractos de alga (Alga) y en el caso de VP_{AHPND} el alimento con vitamina C (VitC).

La alta supervivencia de camarones alimentados con el tratamiento deficiente en HUFAs (DefAG) en el reto con WSSV, sugieren que la replicación viral no sólo está ligada al metabolismo de lípidos del hospedero, sino también al tipo de lípidos.

Se identificaron 51 genes asociados a la resistencia a WSSV, de los cuales siete de ellos han sido reportados por otros autores, siendo abundantes genes de proteínas estructurales.

Este trabajo aportará información novedosa sobre genes de resistencia en camarón a VP_{AHPND} . Se identificaron 22 genes asociados a la resistencia a VP_{AHPND} , siendo abundantes genes de proteínas estructurales y metabolismo de proteínas, de los cuales dos genes están reportados en camarones resistentes a vibriosis.

Se identificaron cinco genes marcadores de resistencia para ambos patógenos.

Es necesario realizar otros estudios para conocer más a fondo el funcionamiento y rutas metabólicas en las que se involucran los genes de resistencia encontrados en este trabajo, además de considerar el efecto de diferentes líneas genéticas de camarón, para poder identificar con más certidumbre marcadores genéticos de resistencia a patógenos.

10. LITERATURA CITADA

Adel, M., S. Yeganeh, M. Dawood, R. Safari, S. Radhakrishnan. 2017. Effects of *Pediococcus pentosaceus* supplementation on growth performance, intestinal microflora and disease resistance of white shrimp, *Penaeus vannamei*. *Aquaculture Nutrition*. 23(6):1401-1409.

Aguilar-Padilla, J. A., J. Kondo López, R. Arosemena Villarreal, C. A. Avila Hach, V. H. Preciado Rubio. 2009. Plan maestro de camarón de altamar del estado de Sinaloa. ISA. Culiacan, Sin. 344p.

Alonso-Rodríguez, R., F. Páez-Osuna, I. Gárate-Lizárraga. 2004. El fitoplancton en la camaronicultura y larvicultura: importancia de un buen manejo. Editorial UNAM. México, D.F. 147p.

Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, D. J. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology*. 215(3):403-410.

Álvarez, J. S., J. Galindo, B. Jaime, E. Pelegrín. 2003. Evaluación de diferentes alimentos artificiales en el engorde de juveniles de Camarón Blanco *Penaeus schmitti*. Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura pp. 998–1005.

Alvídrez-Morales, A., B. E. González-Martínez, Z. Jiménez-Salas. 2002. Tendencias en la producción de alimentos: alimentos funcionales. *Revista Salud Pública y Nutrición*, 3(3):293–301.

Andrews, S., P. Lindenbaum, B. Howard, P. Ewels. 2011. FastQc hig throughput sequence Qc Report. V 0.11.7. Cambridge, UK: Babraham Bioinformatics.

AOAC Association of Official Analytical Chemists 1980 official methods of analysis. AOAC, Washington, DC.

Apún-Molina, J. P., A. Robles-Romo, P. Alvarez-Ruiz, A. Santamaria-Miranda, O. Arjona, I. S. Racotta. 2017. Influence of stocking density and exposure to White Spot Syndrome Virus in biological performance, metabolic, immune, and bioenergetics response of whiteleg shrimp *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*. Elsevier. 479:528–537.

Arenas, P. M., J. Puentes, F. Buet, J. Hurrel, M. Pochettino. 2011. Adaptógenos: plantas medicinales tradicionales comercializadas como suplementos dietéticos en la conurbación buenos aires-La Plata (argentina). *JSTOR*. 20(2):251-264.

Arisa, I. , W. Widanarni, M. Yuhana, Z. A. Muchlisin, A.A. Abdullah. 2015. The application of probiotics, prebiotics and synbiotics to enhance the immune responses of vannamei shrimp (*Penaeus vannamei*) to *Vibrio harveyi* infection. *AAFL Bioflux* 8(5):772–778.

Arredondo, J. 2002. El cultivo de camarón en México, actualidades y perspectivas. La acuicultura en México: de los conceptos a la producción. Instituto de Biología. UNAM. México, D.F. 41–54.

Benítez-Hernández, A., S. L. Jiménez-Bárceñas, E. Y. Sánchez-Gutiérrez, J. C. Pérez-Urbiola, D. Tovar-Ramírez, E. Palacios, R. Civera-Cerecedo. 2018. Use of marine by-product meals in diets for juvenile longfin yellowtail *Seriola rivoliana*. *Aquaculture Nutrition* 24 (1):562–570.

Berger, C. 2000. Aportes de la bio-tecnología a la alimentación y a la inmuno-estimulación de camarones peneidos. Av. en Nutr. Acuícola. Memorias del V Simp. Int. Nutrición Acuícola. Mérida, Yucatán. pp. 102–110.

Bolger, A. M., M. Lohse, B. Usadel. 2014. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*. 30(15):2114-2120.

Bregni, C., J. Degrossi, R. García, M. C. Lamas, R. Firenstein, M. D'Aquino. 2000. Alginate microspheres of *Bacillus subtilis*. *Ars Pharmaceutica*. 41(3):245–248.

Bryant DM, K. Johnson, T. DiTommaso, T. Tickle, M. B. Couger, D. Payzin, T. J. Lee , N. D. Leigh, T. H. Kuo, F. G. Davis, J. Bateman, S. Bryant, A. R. Guzikowski, S. L. Tsai, S. Coyne, W. W. Ye, R. M. Freeman, L. Peshkin, C. J. Tabin, A. Regev, B. J. Haas, J. L. White. 2017. A tissue-mapped axolotl de novo transcriptome enables identification of limb regeneration factors. *Cell Rep*. 18(3):762-776.

Bustillo-Ruiz, M. I., C. M. Escobedo-Bonilla, R. R. Sotelo-Mundo. 2009. Revisión de patogénesis y estrategias moleculares contra el virus del síndrome de la mancha blanca en camarones peneidos. *Revista de biología marina y oceanografía* 44(1):1–11.

Cahu, C. 2000. Dietas para reproductores de camarón y su efecto en la calidad larvaria. pp 65-72 *Avances en Nutrición Acuícola IV. Memorias del IV Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. La Paz, B.C.S. pp. 15-18.

Carughi, A., K. Gronert. 2010. *Inflamación: los ácidos grasos omega-3 y su relación salud/enfermedad*. GNLD, California.

Casas-Valdez, M., G. Portillo-Clark, N. Aguila-Ramírez, S. Rodríguez-Astudillo, I. Sánchez-Rodríguez, S. Carrillo-Domínguez. 2006. Efecto del alga marina *Sargassum* spp. sobre las variables productivas y la concentración de colesterol en el camarón café, *Farfantepenaeus californiensis* (Holmes, 1900). *Revista de biología marina y oceanografía*. 41(1):97–105.

Chen, K., E. Li, Z. Xu, T. Li, C. Xu, J. G. Qin, L. Chen. 2015. Comparative transcriptome analysis in the hepatopancreas tissue of pacific white shrimp *Penaeus vannamei* fed different lipid sources at low salinity. *Plos one*. 10(12):1–22.

Chen, T. Y., D. Y. Chen, H. W. Wen, J. L. Ou, S. S. Chiou, J. M. Chen, M. L. Wong, W. L. Hsu. 2013. Inhibition of enveloped viruses infectivity by curcumin. *Plos one*. 8(5):1–11.

Cheng, Z., A. Buentello, D. M. Gatlin. 2011. Effects of dietary arginine and glutamine on growth performance, immune responses and intestinal structure of red drum, *Sciaenops ocellatus*. *Aquaculture*. Elsevier. 319 (1-2):247–252.

Chomczynski, P., N. Sacchi. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical biochemistry*. 162(1):156-159.

Chotigeat, W., S. Tongsupa, K. Supamataya, A. Phongdara. 2004. Effect of fucoidan on disease resistance of black tiger shrimp. *Aquaculture*. 233(1–4):23–30.

Clavero-salas, A., R. Sotelo-Mundo, T. Gollas-Galván, J. Hernandez-López, A. Peregrino-Uriarte, A. Muhlia-Almazán. G. Yepiz-Plascencia. 2007. Transcriptome analysis of gills from the White shrimp *Penaeus vannamei* infected with White spot syndrome virus. *Fish & Shellfish immunology*. 23(2):459-472.

CONAPESCA. 2016. Anuario Estadístico de Acuicultura y pesca 2016 de la Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca. SAGARPA. México. 293 p.

Cortés, M., A. Chiralt, L. Puente. 2005. Alimentos funcionales: una historia con mucho presente y futuro. *Vitae*. 12(1):5-14.

Coutteau, P., I. Geurden, E. Kontara, M. R. Camara, P. Sorgeloos. 1998. Revision de los efectos de fosfolípidos dietarios en dietas para acuicultura. *Avances en Nutrición Acuícola III*. UANL. 3(9):135-149.

Cruz-Suárez, L. E., D. Ricque-Marie, M. Tapia-Salazar, C. Guajardo-Barbosa. 2000. Uso de harina de kelp (*Macrocystis pyrifera*) en alimentos para camarón. *Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola V*. Mérida, Yucatán. pp. 227–266.

Cuéllar-Anjel, J., C. Lara, V. Morales, A. De Garcia, O. García-Suárez. 2010. Manual de buenas prácticas de manejo para el cultivo del camarón blanco *Penaeus vannamei*. Oirsa-Ospesca. El Salvador, C. A. pp.132

Cuéllar-Anjel, J. 2013. Síndrome de mortalidad temprana (EMS), enfermedad de la necrosis aguda del hepatopáncreas (AHPND). *Institute for international cooperation in animal biologics*. pp. 1–7.

Cuéllar-Anjel, J., D. V. Lightner, C. Pantoja. 2012. Síndrome de mortalidad temprana o síndrome de necrosis hepatopancreática aguda. *Panorama Acuícola*. 17:42–43.

- Cuzon, G., A. Lawrence, G. Gaxiola, C. Rosas, J. Guillaume. 2004. Nutrition of *Penaeus vannamei* reared in tanks or in ponds. *Aquaculture*. 235(1–4):513–551.
- De Santis, C., K. L. Bartie, R. E. Olsen, J. B. Taggart, D. R. Tocher. 2015. Nutrigenomic profiling of transcriptional processes affected in liver and distal intestine in response to a soybean meal-induced nutritional stress in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*. 15:1–11.
- Declarador, R. S., A. E. Serrano, V. L. Corre, A. E. Serrano. 2014. Ulvan extract acts as immunostimulant against White Spot Syndrome Virus (WSSV) in juvenile black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *AAFL Bioflux*. 7(3):153–161.
- Delaquis P.J. y G. Mazza. 1995. Antimicrobial properties of isothiocyanates in food preservation. *Food Technol* 49(11):73-84.
- Dhar, A. K., A. Dettori, M. M. Roux, K. R. Klimpel, B. Read. 2003. Identification of differentially expressed genes in shrimp (*Penaeus stylirostris*) infected with White Spot Syndrome Virus by cDNAmMicroarrays. *Archives of Virology*. 148(12):2381–2396.
- Escobedo-Bonilla, C. M., L. Audoorn, M. Wille, V. Alday-Sanz, P. Sorgeloos, M. B. Pensaert, H. J. Nauwynck. 2006. Standardized White Spot Syndrome Virus (WSSV) inoculation procedures for intramuscular or oral routes. *Diseases of Aquatic Organisms*. 68(3):181–188.
- Espinosa, E., F. Bermúdez-Rattoni. 2001. Relación conducta-inmunidad: el papel de las citocinas. *Revista de Investigación Clínica*. 53(3):240–253.
- Exadactylos, A. 2014. Nutrigenomics in aquaculture research. *Fisheries and Aquaculture Journal*. 5(2):1.
- FAO. 1995. Guía FAO Para la identificación de especies para los fines de pesca. Pacífico Centro-Oriental. *Vertebrados*. 1:418-537.
- FAO. 2006. *Penaeus vannamei* (Boone, 1931). Programa Inf. Especies acuáticas 11–15.
- FAO. 2013. Report of the FAO/MARD technical workshop on Early Mortality Syndrome (EMS) or Acute Hepatopancreatic Necrosis Syndrome (AHPNS) of cultured shrimp (under TCP/VIE/3304). FAO Fisheries and Aquaculture Report No. 1053. Hanoi, Viet Nam. 54 p.
- FAO. 2016. Resumen El estado mundial de la pesca y la acuicultura. Contribución a la seguridad alimentaria y la nutrición para todos. 34(7):23.
- Feng, B., H. Liu, M. Wang, X. Sun, Y. Pan, Y. Zhao. 2017. Diversity analysis of acute hepatopancreatic necrosis disease-positive *Vibrio parahaemolyticus* strains. *Aquac. Fish*. 2(6):278–285.

- Flores-Leyva, L. 2006. Evaluación de pigmentos carotenoides como aditivos alimentarios para la prevención de infecciones producidas por el virus de la mancha blanca (WSSV) y la bacteria *Vibrio harveyi* en el camarón blanco *Penaeus vannamei*. Tesis (Maestría en Ciencias en el uso, manejo y preservación de los recursos naturales con orientación en acuicultura). La Paz, B.C.S. CIBNOR. 112 p.
- Gainza, O., J. Romero. 2017. Manano oligosacáridos como prebióticos en acuicultura de crustáceos. Latin american journal of aquatic research. 45(2):246-260.
- Galaviz-Silva, L., Z. J. Molina-Garza. 2014. Patógenos, Parásitos y Vectores. S INV. 259-268.
- Gao, L., A. Grant, I. Halder, R. Brower, J. Sevransky, J. P. Maloney, M. Moss, C. Shanholtz, C. R. Yates, G. U. Meduri, M. D. Shriver, R. Ingersoll, A. F. Scott, T. H. Beaty, J. Moitra, S. F. Ma, S. Q. Ye, K. C. Barnes, J. G. Garcia. 2006. Novel polymorphisms in the myosin light chain kinase gene confer risk for acute lung injury. American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology. 34(4):487-495.
- Godínez-Siordia, D. E., O. Gonzalez-Ochoa, A. Hernandez-Diaz, A. Garcia-Triana, J. Gamboa-Delgado, J. G. Arce-Ibarra, E. Godínez-Siordia. 2012. Principales patógenos virales de camarón en América y su relación con ambientes de baja salinidad. Ra Ximhai. 8(3):61-69.
- Gómez, A. E. 2007. Nutrigenómica y nutrigenética. La relación entre la alimentación, la salud y la genómica. ORRARM: farmacia y sociedad. 26(4):78-85.
- Gong, H., D. H. Jiang, A. L. Lawrence, M. González-Félix, M. Perez-Velazquez. 2004. Nuevos avances en el estudio de fosfolípidos nutrimentales para camarón. Avances en Nutrición Acuícola VII. Memorias del VII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. Noviembre, 2004. Hermosillo, Sonora. 16-19.
- González-Félix ML, D. M. Gatlin, A. L. Lawrence, M. Perez-Velazquez. 2002. Effect of dietary phospholipid on essential fatty acid requirements and tissue lipid composition of *Penaeus vannamei* juveniles. Aquaculture. 207(1-2):151-167.
- Grabherr MG, B. J. Haas, M. Yassour, J. Z. Levin, D. A. Thompson, I. Amit, X. Adiconis, L. Fan, R. Raychowdhury, Q. Zeng, Z. Chen, E. Mauceli, N. Hacohen, A. Gnirke, N. Rhind, F. Di Palma, B. W. Birren, C. Nusbaum, K. Lindblad-Toh, N. Friedman, A. Regev. 2011. Full-length transcriptome assembly from RNA-seq data without a reference genome. Nature Biotechnology. 29(7):644-652.
- Haas, B. J., A. Papanicolaou, M. Yassour, M. Grabherr, P. D. Blood, J. Bowden, M. B. Couger, D. Eccles, B. Li, M. Lieber, M. D. MacManes, M. Ott, J. Orvis, N. Pochet, F. Strozzi, N. Weeks, R. Westerman, T. William, C. Dewey, R. Henschel, R. LeDuc, N. Friedman, A. Regev. 2013. De novo transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. Nat. Protoc. 8(8):1494-1512.

- Han, J. E., K. F. Tang, L. H. Tran, D. V. Lightner. 2015. Photorhabdus insect-related (Pir) toxin-like genes in a plasmid of *Vibrio parahaemolyticus*, the causative agent of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) of shrimp. *Diseases of aquatic organisms*, 113(1):33-40.
- Han, Y. J., S. F. Ma, M. S. Wade, C. Flores, J. G. Garcia. 2012. An intronic MYLK variant associated with inflammatory lung disease regulates promoter activity of the smooth muscle Myosin Light Chain Kinase isoform. *Journal of Molecular Medicine* 90(3):299–308.
- Hasler, C. M. 1998. Functional Foods: Their role in disease prevention and health promotion. *Food technology-champaign then chicago*. 52(11):63–70.
- He, H., A. L. Lawrence. 1993. Vitamin C requirements of the shrimp *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*. 114(3-4):305-316.
- Jiménez, R., R. Barniol, L. De Barniol, M. Machuca. 1999. Infection of IHHN virus in two species of cultured penaeoid shrimp *Penaeus vannamei* (Boone) and *Penaeus stylirostris* (Stimpson) in Ecuador during El Niño 1997–98. *Aquaculture research*. 30(9):695-705.
- Kim, H. J., H. S. Yoo, J. C. Kim, C. S. Park, M. S. Choi, M. Kim, H. Choi, J. S. Min, Y. S. Kim, S. W. Yoon, J. K. Ahn. 2009. Antiviral effect of *Curcuma longa* linn extract against hepatitis b virus replication. *Journal of Ethnopharmacology* 124(2):189–196.
- Lauzon, Q. D., A. E. Serrano. 2015. Animal biology & animal husbandry international journal of the bioflux society enhances immune responses in *Penaeus vannamei* and *Penaeus monodon* juveniles. *Animal Biology & Animal Husbandry*. 7(1):1–11.
- Lavens, P., G. Merchie, X. Ramos, A. Leon-Hing Kujan, A. Van Hauwaert, A. Pedrazzoli, H. Nelis, A. De Leenheer. 1999. Supplementation of ascorbic acid 2-monophosphate during the early postlarval stages of the shrimp *Penaeus vannamei*. *Aquaculture Nutrition* 5(3):205–209.
- Lawhavinit, O. A., P. Sincharoenpokai, P. Sunthornandh. 2011. Effects of ethanol tumeric (*curcuma longa* linn.) extract against shrimp pathogenic *vibrio spp.* and on growth performance and immune status of white shrimp (*Penaeus vannamei*). *Kasetsart Journal - Natural Science*. 45(1):70–77.
- Lawhavinit, O. A., N. Kongkathip, B. Kongkathip. 2010. Antimicrobial activity of curcuminoids from *Curcuma longa* L. on pathogenic bacteria of shrimp and chicken. *Kasetsart Journal - Natural Science*. 44(3):364–71.
- Lazar, V., J. G. Garcia. 1999. A Single Human Myosin Light Chain Kinase Gene (MLCK; MYLK). *Genomics*. 57(2):256–67.

- Lee, K. J., K. Dabrowski, M. Sandoval, M. J. Miller. 2005. Activity-guided fractionation of phytochemicals of maca meal, their antioxidant activities and effects on growth, feed utilization, and survival in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) Juveniles. *Aquaculture*. 244(1–4):293–301.
- Lee, M. H., S. Y. Shiau. 2002. Dietary vitamin C and its derivatives affect immune responses in grass shrimp, *Penaeus monodon*. *Fish and Shellfish Immunology*. 12(2):119–29.
- Leu, J. H., C. C. Chang, J. L. Wu, C. W. Hsu, I. Hirono, T. Aoki, H.F. Juan, C. Lo, G. H. Kou, H. C. Huang. 2007. Comparative analysis of differentially expressed genes in normal and White Spot Syndrome Virus Infected *Penaeus monodon*. *BMC Genomics*. 8(1):1-14.
- Li, S., X. Zhang, Z. Sun, F. Li, J. Xiang. 2013. Transcriptome analysis on chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* during WSSV acute infection. *PLOS ONE*. 8(3): e58627.
- Lightner, D. 2012. Alimentos funcionales como estrategia efectiva contra EMS. *Nutriad International*. :1.
- Lightner, D. V. 1996. Epizootiology, distribution and the impact on international trade of two penaeid shrimp viruses in the Americas. *Rev. Sci. Tech*. 15:579–601.
- Lightner, D.V., B. Hunter, P. C. Magarelli, L. B. Colvin. 1979. Ascorbic acid: nutritional requirement and role in wound repair in penaeid shrimp. *Proc. World Maric. Soc*. 10(1-4):513–528.
- Lin, C. M., J. Kim, W. X. Du, C. I. Wei. 2000. Bactericidal activity of isothiocyanate against pathogens on fresh produce. *Journal of Food Protection*. 63(1):25–30.
- López-Elias, J. A., D. Medina-Felix, A. I. Campa-Cordova, L. R. Martinez-Cordova, J. Hernandez-Lopez, J. F. Mendoza-Cano, M. E. Rivas-Vega. 2016. Optimizacion de la supervivencia y respuesta inmune de *Penaeus vannamei* alimentado con dietas ricas en carotenos e infectado con el síndrome de mancha blanca. *Latin American Journal of Aquatic Research*. 44(2):305–312.
- López, N., G. Cuzon, 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 *Penaeus vannamei* juveniles. *Aquaculture*. 224(1-4):223–43.
- López-Fando, A., M. P. Gómez-Serranillos, I. Iglesias, O. Lock, U. P. Upamayta, M. E. Carretero. 2004. *Lepidium peruvianum* chacon restores homeostasis impaired by restraint stress. *Phytotherapy Research*. 18(6):471–474.
- Lorgeril, J., D. Saulnier, M. G. Janech, Y. Gueguen, E. Bachère. 2005. Identification of genes that are differentially expressed in hemocytes of the pacific blue shrimp (*Penaeus*

stylirostris) surviving an infection with *Vibrio penaeicida*. *Physiological Genomics*. 21(2): 174–183.

Lu, J. k., Y. T. Hsiao, J. L. Wu. 2011. Applications of shrimp immune DNA microarray in aquaculture. pp. 241–252.

Luna-González, A., J. C. Almaraz-Salas, J. A. Fierro-Coronado, M. M. Del Carmen-Flores, H. A. González-Ocampo, V. Peraza-Gómez. 2012. The prebiotic inulin increases the phenoloxidase activity and reduces the prevalence of WSSV in whiteleg shrimp (*Penaeus vannamei*) cultured under laboratory conditions. *Aquaculture*. 362:28–32.

Luna-González, A., J. T. Moreno-Herrera, Á. I. Campa-Córdova, H. A. González-Ocampo, J. A. Fierro-Coronado, P. Álvarez-Ruiz, M. A. Bueno-Ibarra. 2013. Respuesta inmune y expresión de genes en el camarón blanco (*Penaeus vannamei*) inducida por inmunoestimulantes microbianos. *Latin American Journal of Aquatic Research*. 41(5):898–907.

Lyle-Fritch, L. P., E. Romero-Beltrán, F. Páez-Osuna. 2006. A survey on use of the chemical and biological products for shrimp farming in Sinaloa (NW Mexico). *Aquacultural Engineering*. 35(2):135-146.

Martínez-Córdova, L. R., M. Martínez-Porchas, E. Cortés-Jacinto. 2009. Camaronicultura mexicana y mundial: ¿actividad sustentable o industria contaminante?. *Revista Internacional de Contaminacion Ambiental*. 25(3):181–196.

Mathew, S., K. A. Kumar, R. Anandan, P. G. V. Nair, K. Devadasan. 2007. Changes in tissue defence system in White Spot Syndrome Virus (WSSV) infected *Penaeus monodon*. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*. 145(3):315–320.

Mayo, M. A. 2002. Virus taxonomy. *Virology Division News*. 147(5):1071–1076.

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). *Aquaculture Research*. 29:579–585.

Merchie, G., P. Lavens, P. Sorgeloos. 1997. Optimization of dietary vitamin c in fish and crustacean larvae: a review. *Aquaculture*. 155(1-4):165–181.

Molina, C., J. Rodríguez, J. I. Arango, F. Echeverría, M. Sotomayor. 2002. Efectos combinados de la vitamina C y E dietéticas en la inmunorespuesta del juvenil *Penaeus vannamei* antes y después de la suplementación con glucanos. Vi Congreso Ecuatoriano de Acuicultura. *Mundo Acuicola*. 8:29–33.

Montes-Guyot, M. A. 1990. Perspectivas de la fitoterapia. *Acta farm. Bonaerense* 9(2):131-138.

Morales, V., J. Cuéllar. 2008. Inmunología del camarón, guía técnica: patología e inmunología de camarones peneidos. Programa CYTED Red II-D *Vannamei*. Panamá, Rep. De Panamá. 270p.

Moya-Gonzalvez, E. M. 2016. Actividad antiviral de cúrcuma y extractos de plantas del género *Cistus sp.* efecto sobre el virus de la septicemia hemorrágica de salmón. Tesis (Grado en Biotecnología). Universidad Miguel Hernández de Elche, departamento de bioquímica y biología molecular. 38 p.

Muñoz, M., F. Vandenbulcke, J. Garnier, Y. Gueguen, P. Bulet, D. Saulnier, E. Bachere. 2004. Involvement of penaeidins in defense reactions of the shrimp *Penaeus stylirostris* to a pathogenic vibrio. *Cell. Mol. Life Sci.* 61(7-8):961-972.

Murray, H. M., S. P. Lall, R. Rajaselvam, L. A. Boutilier, B. Blamchard, R. M. Flight, S. Colombo, V. Mohindra, S. E. Douglas. 2010. A nutrigenomic analysis of intestinal response to partial soybean meal replacement in diets for juvenile Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus*, L. *Aquaculture*, Elsevier 298:282–293.

Ngo, S. Y., D. Tan, X. Shen, P. Kathiresan, J. Jiang, W. C. Liew, N. M. Thevasagayam, H. Y. Kwan, J. Saju, S. Prakki, C. Goh, H. Wong, T. Chan, M Mézes, L. Orbán. 2015. Nutrigenomic and nutritional analyses reveal the effects of pelleted feeds on asian seabass (*Lates calcarifer*). *PLoS ONE*. 10(12):1–26.

Niamsa, N., C. Sittiwet. 2009. Antibacterial activity of *Curcuma longa* aqueous extract. *Journal of Pharmacology and Toxicology*. 4(4):173-177.

Niu, J., L. X. Tian, Y. J. Liu, K. S. Mai, H. J. Yang, C. X. Ye, W. Gao. 2009. Nutrient values of dietary ascorbic acid (l-ascorbyl-2-polyphosphate) on growth, survival and stress tolerance of larval shrimp, *Penaeus vannamei*. *Aquaculture Nutrition*. 15(2):194–201.

Oakey, H. J. Y C. S. Smith. 2018. Complete genome sequence of a white spot syndrome virus associated with a disease incursion in Australia. *Aquaculture* 484:152–159.

Padh, H. 1991. Vitamin C: newer insights into its biochemical functions. *Nutrition Reviews*. 49(3):65-70.

Pan, D., N. He, Z. Yang, H. Liu, X. Xu. 2005. Differential gene expression profile in hepatopancreas of WSSV-resistant shrimp (*Penaeus japonicus*) by suppression subtractive hybridization. *Developmental and Comparative Immunology*. 29(2):103–12.

Partida-Arangure, B. O., A. Luna-González, J. A. Fierro-Coronado, C. Flores-Miranda, H. A. González-Ocampo. 2013. Effect of inulin and probiotic bacteria on growth, survival, immune response, and prevalence of white spot syndrome virus (WSSV) in *Penaeus vannamei* cultured under laboratory conditions. *African J. Biotechnol.* 12:3366–3375.

Ponce-Palafox, J. T., R. González-Salas, O. Romero-Cruz, I. Febrero-Toussaint, J. L. Arredondo-Figueroa, H. Esparza-Leal, G. M. García-Ulloa. 2005. Enfermedades del camarón de agua dulce *Macrobrachium tenellum* y *M. rosenbergii* durante el cultivo comercial en estanques rústicos, en empresas rurales. *Revista Electrónica de Veterinaria REDVET*®, ISSN 6(12):1695-7504.

Rios-Eraza, J. G., U. Lugo, W. patricio. 2014. Evaluación de los parámetros de crecimiento y supervivencia de alevines de trucha (*Oncorhynchus mykiss*) con dietas enriquecidas con tres aceites esenciales; jengibre (*Zingiber officinale*), cúrcuma (*Curcuma longa*) y hierba luisa (*Cymbopogon citratus*). Tesis (Ingeniería en biotecnología de los recursos naturales). Ecuador. Universidad Politécnica Salesiana Sede Cuenca. 88 p.

Robalino, J., J. S. Almeida, D. Mckillen, J. Colglazier, H. F. Trent-iii, Y. A. Chen, M. E. Peck, C. L. Browdy, R. W. Chapman, G. Warr, P. Gross. 2018. Insights into the immune transcriptome of the shrimp *Penaeus vannamei*: tissue-specific expression profiles and transcriptomic responses to immune challenge. *Physiological genomics.* 29(1):44–56.

Rodríguez, J., R. Cedeño, C. Molina, V. Otero, E. Valenzuela, M. A. Sotomayor. 2000. Efecto de la calidad de la dieta sobre la respuesta inmune del camarón *Penaeus vannamei*. *Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola.* Merida, Yucatán. pp. 19-22.

Rojtinnakorn, J., I. Hirono, T. Itami, Y. Takahashi, T. Aoki. 2002. Gene expression in haemocytes of kuruma prawn, *Penaeus japonicus*, in response to infection with WSSV by est approach. *Fish and Shellfish Immunology.* 13(1):69–83.

Romero, C., C. Blas, N. Nicodemus. 2007. Introducción a la nutrigenómica. *Rev. Complut. Ciencias Vet.* 1:22–29.

Sahu, S., B. K. Das, B. K. Mishra, J. Pradhan, S. K. Samal, N. Sarangi. 2008. Effect of dietary *Curcuma longa* on enzymatic and immunological profiles of rohu, *Labeo rohita* (Ham.), infected with *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture Research.* 39(16):1720–1730.

Sakhawat H. M., S. Koshio, M. Ishikawa, S. Yokoyama, N. M. Sony, S. Dossou, W. Wang. 2018. Influence of dietary inosine and vitamin C supplementation on growth, blood chemistry, oxidative stress, innate and adaptive immune responses of red sea bream, *Pagrus major* juvenile. *Fish and Shellfish Immunology, Elsevier.* 82:92–100.

Salazar-Almeida, C. y C. Flores-Vallejo. 2013. Evaluación de los parámetros de crecimiento de alevines de tilapia roja (*Oreochromis sp.*) con dietas enriquecidas con dos aceites esenciales: cúrcuma (*Curcuma longa*) y hierba luisa (*Cymbopogon citratus*). Tesis (Ingeniería en Biotecnología de los recursos naturales). Quito. Universidad Politécnica Salesiana Sede Quito. 100 p.

Sanchez-Paz, A. 2010. White Spot Syndrome Virus : an overview on an emergent concern. *Veterinary research*. 41(6):43.

Sanhueza, J. C., A. Valenzuela. 2012. Nutrigenomics : revealing molecular aspects. *Revista Chilena de Nutricion*. 39:71–85.

Serrano. A. E., R. B. Santizo. 2014. Dietary substitution of protein concentrate of *Ulva lactuca* for soybean meal in the black tiger shrimp *Penaeus monodon* fry. *Animal Biology and Animal Husbandry*. 6(2):140-147.

Shiau, S. Y. 1998. Nutrient requirements of penaeid shrimps. *Aquaculture*. 164(1–4):77–93.

Silveira-Rodríguez, M. B., S. Monereo-Megías, B. Molina-Baena. 2003. Alimentos funcionales y nutrición óptima. ¿Cerca o lejos?. *Revista Espanola de Salud Publica*. 77(3):317–331.

Sirikharin, R., S. Taengchaiyaphum, K. Sritunyalucksana, S. Thitamadee, T. W. Flegel, R. Mavichak. 2014. A new and improved PCR method for detection of AHPND bacteria. *Network of aquaculture centres in Asia-Pacific*. :7-9.

StatSoft inc. 2007. STATISTICA (data analysis software system). versión 8.0 www.statsoft.com

Suong, N. T., N. Hao, N. Sang, N. Hung, N. Tinh, L. Phuoc, D. Cuong, N. Luan, D. Phuong, T. Thom, P. Thao, P. Bossier, P. Sorgeloos, T. Defoirdt. 2017. The impact of catecholamine sensing on the virulence of *Vibrio parahaemolyticus* causing acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND). *Aquaculture*. 470:190–195.

Traifalgar, R. F., A. E. Serrano, V. Corre, H. Kira, H. T. Tung, F. R. Michael, M. A. Kader, A. Laining, S. Yokoyama, M. Ishikawa, S. Koshio. 2009. Evaluation of dietary fucoidan supplementation effects on growth performance and vibriosis resistance of *Penaeus monodon* postlarvae. *Aquaculture Sci*. 57(2):167–174.

Valentová, K. Y J. Ulrichová. 2003. *Smallanthus sonchifolius* and *Lepidium meyenii* - Prospective andean crops for the prevention of chronic diseases. *Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacký*. 147(2):119–130.

- Vanichkul, K., N. Areechon, N. Kongkathip, P. Srisapoom, N. Chuchird. 2010. Immunological and bactericidal effects of turmeric (*Curcuma longa* Linn.) extract in pacific white shrimps (*Penaeus vannamei* Boone). *Kasetsart Journal - Natural Science*. 44(5):850–858.
- Varela-Mejías, A. Y N. Peña-Navarro. 2014. Síndrome de la mortalidad temprana (EMS / AHPNS) en camarones cultivados : Una revisión. *Repert. Científico*. 17:25–30.
- Verástegui, M. A., J. Vargas, T. Loo. 2009. Uso de la harina de maca (*Lepidium peruvianum* G. Chacón) como insumo de la dieta de alevines de tilapia roja (*Oreochromis* spp.), criadas en condiciones de laboratorio. *Anales científicos* 70(1):66–72.
- Wang, B., F. Li, B. Dong, X. Zhang, C. Zhang, J. Xiang. 2006. Discovery of the genes in response to White Spot Syndrome Virus (WSSV) infection in *Fenneropenaeus chinensis* through cDNA microarray. *Marine Biotechnology*. 8(5):491–500.
- Wu, W., L. Wang, X. Zhang. 2005. Identification of white spot syndrome virus (WSSV) envelope proteins involved in shrimp infection. *Virology*. 332(2):578–583.
- Xu, J., F. Han, X. Zhang. 2007. Silencing shrimp white spot syndrome virus (WSSV) genes by siRNA. *Antiviral Research*. 73(2):126–131.
- Yuan K., F. H. Yuan, S. P. Weng, J. G. He, Y. H. Chen. 2016. Identification and functional characterization of a novel Spätzle gene in *Penaeus vannamei*. *Developmental & comparative immunology*. 68:46-57.
- Zhao, H. X., J. M. Cao, A. L. Wang, Y. H. Huang, G. L. Li, H. B. Lan. 2012. Effects of dietary β -1,3-glucan on expression of immune-related genes of *Penaeus vannamei* exposed to nitrite-N. *Journal of the World Aquaculture Society*. 43(3):400–410.
- Zhao, Z. Y., Z. X. Yin, S. P. Weng, H. J. Guan, S. D. Li, K. Xing, S. M. Chan, J. G. He. 2007. Profiling of differentially expressed genes in hepatopancreas of White Spot Syndrome Virus-resistant shrimp (*Penaeus vannamei*) by suppression subtractive hybridisation. *Fish and Shellfish Immunology*. 22(5):520–534.
- Zhou, Q., L. Wang, H. Wang, F. Xie, T. Wang. 2012. Effect of dietary vitamin C on the growth performance and innate immunity of juvenile cobia (*Rachycentron canadum*). *Fish and Shellfish Immunology*, Elsevier. 32(6):969–975.
- Zhou, Q., H. Li, Y. P. Qi, F. Yang. 2008. Lipid of White Spot Syndrome Virus originating from host-cell nuclei. *Journal of General Virology*. 89(11):2909–14.
- Zhou, J., X. Tang, G. B. Martin. 1997. The Pto kinase conferring resistance to tomato bacterial speck disease interacts with proteins that bind a cis - element of pathogenesis - related genes. *The EMBO Journal*, 16(11):3207-3218.

11. ANEXOS

ANEXO A Limpieza de lecturas

```
java -jar Trimmomatic-0.32/trimmomatic.jar PE -phred33 libreria_forward.fastq
libreria_reverse.fastq      Ref_fwr_out_pa.fastq      Ref_rvs_out_pa.fastq
ILLUMINACLIP:adapters.fa:2:30:10 LEADING:30 TRAILING:30 HEADCROP:13
```

ANEXO B Ensamble de *novo* del transcriptoma de *P. vannamei*

1. nohup perl trinityrnaseq-2.2.0/Trinity --normalize_reads --

normalize_max_read_cov 50 --seqType fq --max_memory 210G --left

Forwardlibreria.fastq --right Reverselibreria.fastq --CPU 30 &
2. perl trinityrnaseq-2.2.0/util/TrinityStats.pl Trinity.fasta

ANEXO C Cuantificación de la abundancia

```
perl trinityrnaseq-2.2.0/util/align_and_estimate_abundance.pl --transcripts
Trinitymoni.fasta --seqType fq --left libreriaforward.fq.gz --right libreriareverse.fq.gz
--samples_file archivo.txt --est_method RSEM --output_dir cuantificación --
aln_method bowtie --trinity_mode --prep_reference
```

ANEXO D Anotación

```
perl Trinotate-3.0.2/admin/Build_Trinotate_Boilerplate_SQLite_db.pl Trinotate
```

Para instalar:

```
Trinotate.sqlite
uniprot_sprot.pep
Pfam-A.hmm.gz
```

Prepara las bases de datos:

```
makeblastdb -in uniprot_sprot.pep -dbtype prot
```

Descomprime Pfam:

```
gunzip Pfam-A.hmm.gz
```

hmmcompress Pfam-A.hmm

Se extraen los marcos de lectura

TransDecoder.LongOrfs -t target_Trinitymoni.fasta

Se crea archivo: longest_orfs.pep

Se hace blastx y blastp

blastx -query Trinity.fasta -db uniprot_sprot.pep -num_threads 8 -max_target_seqs 1 -outfmt 6 > blastx.outfmt6

blastp -query transdecoder.pep -db uniprot_sprot.pep -num_threads 8 -max_target_seqs 1 -outfmt 6 > blastp.outfmt6

Identifica proteínas dominantes con HMMER

hmmscan --cpu 8 --domtblout TrinotatePFAM.out Pfam-A.hmm
/Trinitymoni.fasta.transdecoder_dir/longest_orfs.pep > pfam.log

Predice peptidoseñales

/signalp-4.1/signalp -f short -n signalp.out
/Trinitymoni.fasta.transdecoder_dir/longest_orfs.pep

Predice regiones transmembranales

/tmhmm-2.0/tmhmm-2.0c/bin/tmhmm -short <
/Trinitymoni.fasta.transdecoder_dir/longest_orfs.pep > tmhmm.out

Identifica transcritos de rRNA

perl Trinotate-3.0.2/util/rnammer_support/RnammerTranscriptome.pl --
transcriptome Trinitymoni.fasta --path_to_rnammer rnammer-1.2/rnammer
generará un archivo:

Trinitymoni.fasta.rnammer.gff

Para importar resultados

/Trinotate-3.0.2/Trinotate /Trinotate.sqlite init --gene_trans_map
Trinity.fasta.gene_trans_map --transcript_fasta Trinitymoni.fasta --


```

transdecoder_pep          /Trinitymoni.fasta.transdecoder_dir/longest_orfs.pep
LOAD_swissprot_blastp blastpmoni.outfmt6 LOAD_pfam pfam.log LOAD_tmhmm
tmhmm.out          LOAD_signalp          signalp.out          LOAD_swissprot_blastx
blastx_concaten.outfmt6 LOAD_rnammer Trinitymoni.fasta.rnammer.gff report -E
Descargar transcritos y regions codificantes
perl /trinityrnaseq-2.2.0/util/support_scripts/get_Trinity_gene_to_trans_map.pl
Trinitymoni.fasta > Trinity.fasta.gene_trans_map
Descargar blast homologies
/Trinotate-3.0.2/Trinotate          Trinotate.sqlite          LOAD_swissprot_blastp
blastpmoni.outfmt6
/Trinotate-3.0.2/Trinotate          Trinotate.sqlite          LOAD_swissprot_blastx
blastx_concatenado.outfmt6
Descargar Pfam dominantes
/Trinotate-3.0.2/Trinotate Trinotate.sqlite LOAD_pfam TrinotatePFAM.out
Descargar transmembranales dominantes
/Trinotate-3.0.2/Trinotate Trinotate.sqlite LOAD_tmhmm tmhmm.out
Descargar péptido señal predictions
/Trinotate-3.0.2/Trinotate Trinotate.sqlite LOAD_signalp signalp.out
Reporte de anotación
/Trinotate-3.0.2/Trinotate          Trinotate.sqlite          report          -e          >
Trinotate_annotation_report.xls

```

ANEXO E Expresión diferencial

Matriz

```

perl / trinityrnaseq-Trinity-v2.4.0/útil/abundance_ estimates _to_matrix.pl --
est_method RSEM RSEM.isofC1-1.results RSEM.isofC1-2.results RSEM.isofD16-
1.results RSEM.isofD16-2.results RSEM.isofF12-1.results RSEM.isofF12-2.results

```

RSEM.isofF2-1.results RSEM.isofF2-2.results RSEM.isofF6-1.results RSEM.isofF6-2.results RSEM.isofF9-1.results RSEM.isofF9-2.results --out_prefix DE_RetoMONI

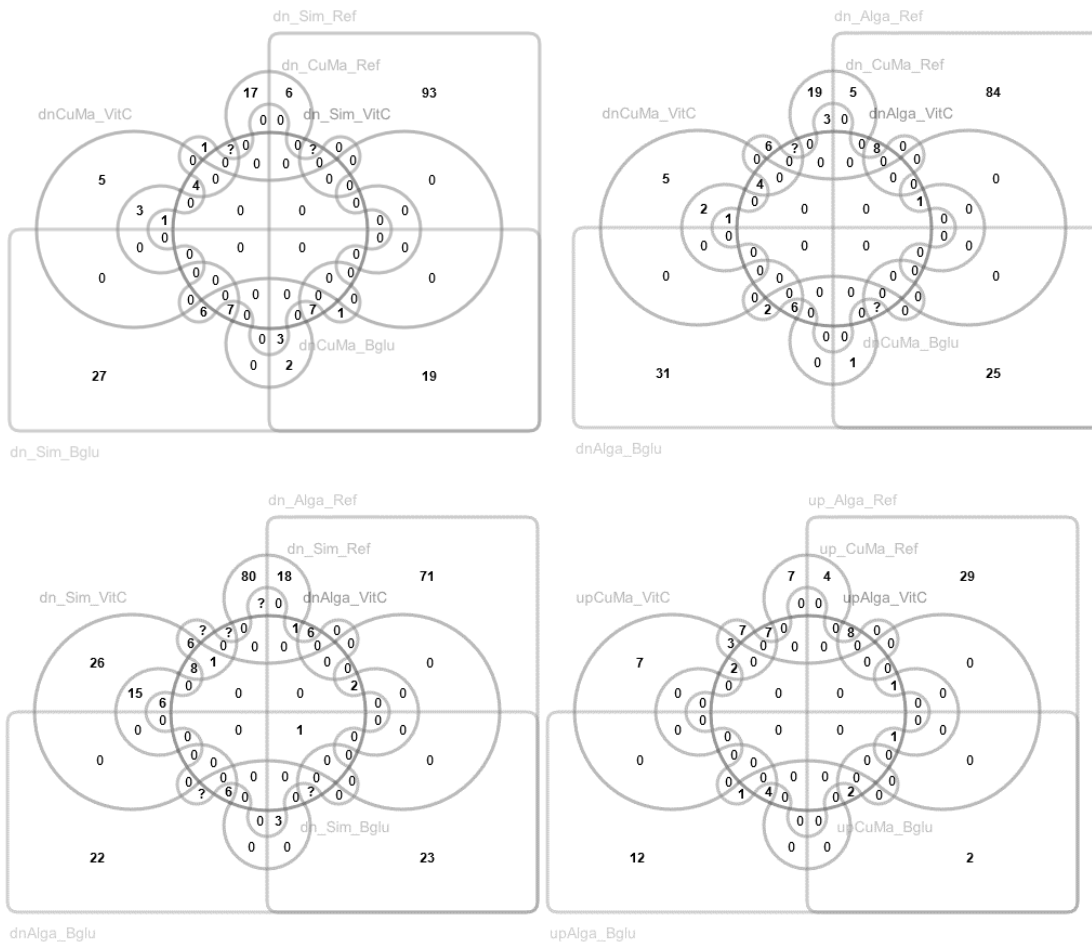
Expresión diferencial

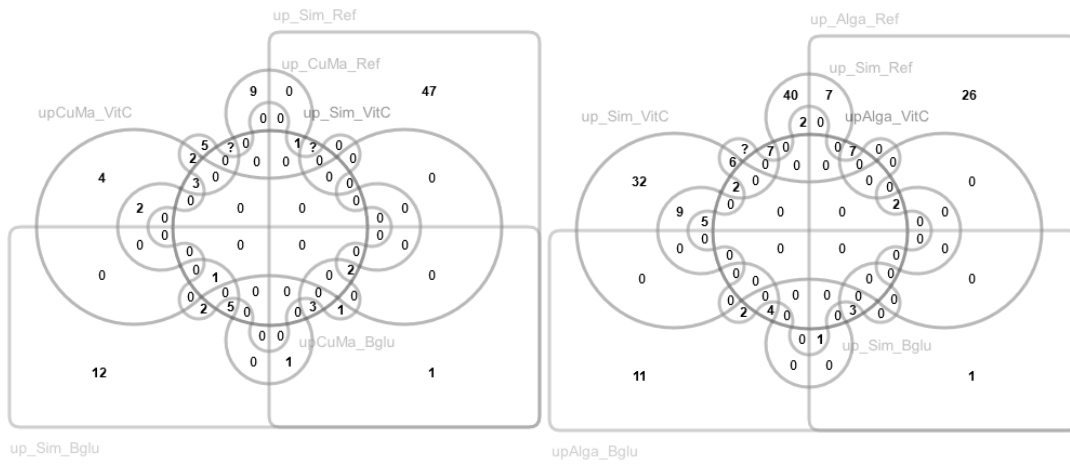
```
perl /trinityrnaseq-2.2.0/Analysis/DifferentialExpression /run_DE_analysis.pl --matrix DE_RetoMONI.counts.matrix --method edgeR --samples DE_matrizabundancias.txt --min_rowSum_counts 2 --output DE_RetoMONIlex
```

Extracción

```
perl /trinityrnaseq-2.2.0/Analysis/DifferentialExpression /analyze_diff_expr.pl --matrix DE_RetoMONI.TMM.EXPR.matrix -P 1e-3 -C 2 --output extrac --samples DE_matrizabundancias.txt
```

Diagramas de Venn, genes Sub-expresados y sobre-expresados(resistencia a WSSV)





Diagramas de Venn, genes Sub-expresados y sobre-expresados (resistencia a *VpAHPND*)

