



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

EFFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN DE
INMUNOESTIMULANTES SOBRE PARÁMETROS
INMUNOLÓGICOS, EXPRESIÓN DE GENES Y RESISTENCIA A
Vibrio parahaemolyticus EN CAMARÓN BLANCO *Penaeus
vannamei*.

T E S I S

Que para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

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

P r e s e n t a

Alan Bryan Licona Jain

La Paz, Baja California Sur, enero de 2022.

ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 12 horas del día 13 del Mes de enero del 2022, 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 la suplementación de inmunoestimulantes sobre parámetros inmunológicos, expresión de genes y resistencia a *Vibrio parahaemolyticus* en camarón blanco *Penaeus vannamei*".


Presentada por el alumno:

Alan Bryan Licona Jain

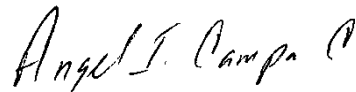
Aspirante al Grado de DOCTOR EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACIÓN EN **Acuicultura**

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.

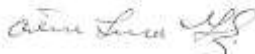
LA COMISIÓN REVISORA



Dr. Ilie Sava Racotta Dimitrov
Co-Director de Tesis



Dr. Ángel Isidro Campa Córdova
Co-Director de Tesis



Dr. Antonio Luna González
Co-Tutor de Tesis



Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez
Co-Tutor de Tesis



Dr. Edilmar Cortés Jacinto
Co-Tutor de Tesis



Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro,
Directora de Estudios de Posgrado y
Formación de Recursos Humanos

La Paz, Baja California Sur, a 13 de enero de 2022.

Los miembros del comité de tesis del estudiante Alan Bryan Licona Jain del Programa de Doctorado en el Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales, revisamos el contenido de la tesis y otorgamos el Vo.Bo. dado que la tesis no representa un plagio de otro documento como lo muestra el reporte de similitud realizado:

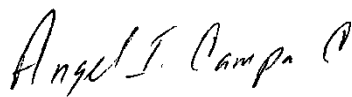
- Herramienta antiplagio: iThenticate
- Filtros utilizados: Citas y bibliografía excluidas
- Porcentajes de similitud: 16%
Máximo 20% para tesis Posgrado
Se muestra captura de pantalla

		Citas excluidas Bibliografía excluida	7% SIMILAR
Resumen de Coincidencias			
1	Internet 131 palabras doi.org		1%
2	Crossref 73 palabras Alan Licona-Jain, Ángel Campa-Córdova, Antonio Luna-González, Ilie S. Racotta, Marlene Tello, Carlos Angulo. "Dieta		<1%
3	Internet 73 palabras Copiado el 18-Jul-2020 tesis.ipn.mx		<1%
4	Internet 61 palabras eprints.uanl.mx		<1%
5	Internet 53 palabras Copiado el 13-Nov-2020 www.dspace.uce.edu.ec		<1%
6	Internet 51 palabras Copiado el 15-Jun-2021 1library.co		<1%
7	Internet 48 palabras Copiado el 12-Jun-2019 www.scribd.com		<1%
8	Internet 45 palabras idus.us.es		<1%

Firmas del comité



Dr. Ilie Sava Racotta Dimitrov
Co-Director de Tesis



Dr. Ángel Isidro Campa Córdova
Co-Director de Tesis



Dr. Antonio Luna González
Co-Tutor de Tesis



Dr. Edilmar Cortés Jacinto
Co-Tutor de Tesis



Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez
Co-Tutor de Tesis

Conformación de Comités

Comité Tutorial

Dr. Ilie Sava Racotta Dimitrov
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C.
Co-Director de Tesis

Dr. Ángel Isidro Campa Córdova
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C.
Co-Director de Tesis

Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C.
Co-Tutor de Tesis

Dr. Edilmar Cortés Jacinto
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.
Co-Tutor de Tesis

Dr. Antonio Luna Gonzáles
Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional
Co-Tutor de Tesis

Comité Revisor de Tesis

Dr. Ilie Sava Racotta Dimitrov
Dr. Ángel Isidro Cama Córdova
Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez
Dr. Edilmar Cortés Jacinto
Dr. Antonio Luna González

Jurado de Examen

Dr. Ilie Sava Racotta Dimitrov
Dr. Ángel Isidro Campa Córdova
Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez
Dr. Edilmar Cortés Jacinto
Dr. Antonio Luna González

Suplentes

Dr. Dariel Tovar Ramírez
Dra. Laurence Stephanie Mercier

Resumen

El camarón blanco *Penaeus vannamei* es una de las especies más cultivadas en el mundo. Sin embargo, los brotes de enfermedades infecciosas, causadas por virus y bacterias, han afectado la rentabilidad de la industria acuícola. Por lo tanto, una acción para incrementar la resistencia a enfermedades en el cultivo de camarón es el uso de levaduras, las cuales confieren beneficios en nutrición y protección contra patógenos. El presente estudio se evaluó el potencial inmunoestimulante y la protección contra patógenos de las levaduras marinas *Yarrowia lipolytica* y *Debaryomyces hansenii* CBS8339 en el camarón blanco *Penaeus vannamei*. Primeramente, se evaluó el potencial inmunoestimulante de las cepas (D1 y N6) de la levadura *Y. lipolytica* en juveniles de *P. vannamei*. Las levaduras se incorporaron al 1.1% en un alimento comercial para camarón y se administraron durante 21 días. Semanalmente se realizaron determinaciones en parámetros inmunológicos en hemolinfa y expresión de genes en tejido. En postlarvas, se determinó el efecto inmunoestimulante del uso individual y combinado de las levaduras *Y. lipolytica* y *D. hansenii* a través de diversas rutas de administración. Adicionalmente, se determinó la frecuencia de administración y la protección a largo plazo de las levaduras ante una infección experimental con *V. parahaemolyticus* IPNGS16-AHPND. Un incremento en parámetros inmunológicos se observó en camarones alimentados con levaduras, con respecto del grupo control. *Y. lipolytica* proporcionó un incremento en los parámetros inmunes (THC, SOD, CAT, LYZ) y expresión de genes inmunes (PEN3, LYZ, proFO). En postlarvas, la expresión de genes (PEN3 y Lectinas) y la supervivencia a *V. parahaemolyticus* incrementó significativamente con la administración individual y combinada de levaduras por vía oral; sin embargo, la mayor supervivencia se observó con la combinación de levaduras administradas diariamente por vía oral e inmersión. En este estudio se demostró que *Y. lipolytica* presenta un efecto inmunoprotector e inmunoestimulante en *P. vannamei*. La suplementación de la combinación de levaduras por más de una vía de administración incrementa la protección de postlarvas ante *V. parahaemolyticus*. La protección de las levaduras contra *V. parahaemolyticus* se prolongó siete días posteriores a su aplicación con 77% de supervivencia. Los resultados obtenidos en el presente estudio abren el camino para la potencial aplicación de inmunoestimulantes basados en la levadura *Y. lipolytica* en el cultivo de camarón.

Palabras clave: Probióticos, Patógenos, Crustáceos, Acuicultura, Enfermedades infecciosas.

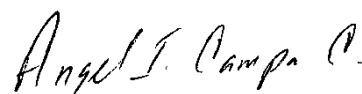
ORCID: 0000-0001-6699-9644

Vo. Bo.

Co-Directores de Tesis



Dr. Ilie Sava Racotta Dimitrov



Dr. Ángel Isidro Campa Córdova

Summary

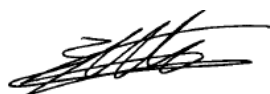
The whiteleg shrimp *Penaeus vannamei* is one of the most widely farmed shrimp species in the world. Nevertheless, outbreaks of infectious diseases, caused by viruses and bacteria, have severely affected the aquaculture industry. Therefore, a strategy to increase the resistance to pathogens in shrimp culture is the use of yeasts, which confer benefits in nutrition and protection against pathogens. The present study evaluated the immunostimulatory potential and protection against pathogens of the marine yeasts *Yarrowia lipolytica* and *Debaryomyces hansenii* CBS8339 in *Penaeus vannamei*. The immunostimulatory potential of two strains (D1 and N6) of the yeast *Y. lipolytica* in juveniles of *P. vannamei* was evaluated. Yeasts were incorporated at 1.1% into a commercial shrimp feed and administered for 21 days. Hemolymph and tissue samples were obtained weekly to determine immunological parameters and gene expression. In postlarvae, the immunostimulatory effect of individual and combined use of the yeasts *Y. lipolytica* and *D. hansenii* was determined through several administration routes. Additionally, the effect of the administration frequency and the long-term protection of yeasts against an experimental infection with *V. parahaemolyticus* IPNGS16 were evaluated. An increase in immunological parameters was observed in yeast-fed shrimp, in contrast to the control group. *Y. lipolytica* supply produced an increase in immune parameters (THC, SOD, CAT, LYZ) and the immune gene expression (PEN3, LYZ, proFO). In postlarvae, gene expression (PEN3 and Lectins) and survival to *V. parahaemolyticus* increased significantly with the individual and combined administration of yeast by oral route, however, the highest survival was observed with the yeast combination administered daily by oral and immersion routes. In this study it was demonstrated that *Y. lipolytica* has an immunoprotective and immunostimulatory effect on *P. vannamei*. Supplementation of yeast combination by more than one administration route increases postlarvae protection against *V. parahaemolyticus*. Yeast protection against *V. parahaemolyticus* extend at least seven days after application with 77% survival. The results obtained in the present study provide a promising strategy for the potential application of immunostimulants based on yeast *Y. lipolytica* in shrimp culture.

Keywords: Probiotic, Pathogen, Crustacean, Aquaculture, Infection disease.

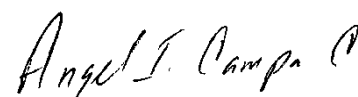
ORCID: 0000-0001-6699-9644

Vo. Bo

Co-Directores de Tesis



Dr. Ilie Sava Racotta Dimitrov



Dr. Ángel Isidro Campa Córdova

Dedicatoria

A mis padres

Agradecimientos

A Dios por su amor incondicional, por darme fuerzas para realizar mi trabajo de tesis y por todas sus bendiciones.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para realizar mis estudios de nivel Doctorado (#279783).

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. por las facilidades otorgadas para desarrollar mi trabajo de investigación.

Al Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional (CIIDIR-Guasave, Sinaloa), por la estancia realizada, por las instalaciones y hospedaje.

A los proyectos CONACyT PDCPN2014-01/248033 por el financiamiento de mi trabajo experimental

A mis Co-Directores Dr. Ilie Sava Racotta Dimitrov y Dr. Ángel Isidro Campa Córdova por aceptarme para realizar esta tesis Doctoral bajo su Co-Dirección, por el tiempo dedicado y conocimiento brindado.

A mis Co-Tutores Dr. Antonio Luna González, Dr. Edilmar Cortés Jacinto por su aporte, colaboración con sus comentarios y sugerencias oportunas en mi trabajo de tesis. De manera especial agradezco Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez por todo su apoyo, guía y por sus consejos. Gracias por sus enseñanzas y motivación, pero en especial le agradezco por su amistad.

Al personal del departamento de Posgrado, Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro, Lic. Osvelia Ibarra Morales, Lic. Leticia González Rubio, Tania Verónica Núñez Valdez y Horacio Sandoval Gómez por su asesoría en los trámites de becas y apoyos.

A los técnicos Biol. Sandra De la Paz y Biol. Gabriel Robles del Laboratorio Húmedo de Nutrición Acuícola del CIBNOR por su ayuda y apoyo técnico durante mis bioensayos.

A los técnicos Dr. Martín Ramírez Orozco, Dra. Rosa María Morelos y M. en C. Marlene del Laboratorio de Inmunogenómica Marina por su apoyo para el procesamiento de muestras de expresión de genes.

A los técnicos Dra. Ruth Escamilla y Dr. Arturo Fierro del Laboratorio de Biología Molecular y Bioquímica del CIIDIR-Guasave, por su apoyo técnico en los retos de infección.

A la Dra. Martha Reyes Becerril del Laboratorio de Inmunología y Vacunología por su asistencia y asesoría en la determinación de variables inmunológicas.

A la Dra. Norma Ochoa Alvarez del Laboratorio de Diagnóstico Microbiológico y al IBQ Kevin Guerra por su asesoría y consejos en el cultivo de levaduras y bacterias patógenas.

A la M en C. Olivia Arjona López del Laboratorio de Metabolismo de Lípidos por su ayuda para el procesamiento de levaduras.

A la Dra. Rosa Linda Salgado del Laboratorio de Metabolismo Energético por su asesoría para el manejo y procesamiento de muestras biológicas.

Al Dr. Dr. Roberto Civera y Dr. Ernesto Goytortua del Laboratorio de especialidades Bioquímicas y Biológicas por su asesoría para la fabricación de alimentos experimentales con levaduras.

A mi esposa Yazmin Duran por su apoyo incondicional durante la realización de mi tesis doctoral.

A mi Padre David Licona y a mi Madre Ma. Elena Jain por el esfuerzo y la confianza que depositaron en mí y su motivación para alcanzar mis metas.

A mi familia: Eder, Brytania, Axxel, Kenia, Roberto, Elvira, Rosa, Isaac, Israel, Betsabé, Elisa, gracias por impulsarme a seguir adelante, por su palabras de aliento y por su cariño.

A mis compañeros de GIV: Dr. Luis Adame, Dra. Elizabeth Monreal, Crystal, Miriam, Marlene, Verónica, Kevin, Goyo, Nancy, Oscar, Dante, Abel, Perla, Erika.

A mis compañeros de Metabolismo Energético: Saul, Nairobi, Eliza, Arlete.

A mis compañeros de Metabolismo de Lípidos: Olivia, Azahel, Eduardo, Celene, Yazmin, Julio, Libertad, Yahn, Erica.

A mis compañeros del CIIDIR: Karime, Paulina, Olga, Michey, Gabriela, Sofia, Fernanda, Pedro, Nicol, Mauro, Ana Karen, Griselda.

Contenido	
Resumen	i
Summary	ii
Dedicatoria	iii
Agradecimientos	iv
Contenido	vi
Lista de figuras	ix
Lista de tablas	x
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Enfermedades asociadas al de cultivo de camarón	3
2.1.1. <i>Vibrio parahaemolyticus</i> causante de AHPND	4
2.2 Sistema Inmune innato de crustáceos	5
2.2.1 Respuesta inmune celular	6
2.2.1.1 Fagocitosis.....	6
2.2.1.2 Encapsulamiento y formación de nódulos	7
2.2.1.3 Cascada profenoloxidasa	7
2.2.1.4 Respuesta antioxidante	8
2.2.2 Respuesta humoral.....	8
2.2.2.1 Moléculas de reconocimiento	8
2.2.2.2 Proteínas de reconocimiento de patrones (PRPs) y lipoproteínas de unión a β -1,3-glucanos (LGBPs).....	9
2.2.2.3 Péptidos antimicrobianos	10
2.2.3 Rutas de señalización del sistema inmune	11
2.3 Probióticos.....	12
2.3.1 Exclusión competitiva de bacterias patógenas	12
2.3.2 Producción de compuestos inhibitorios.....	13
2.4 Inmunoestimulantes	13
2.4.1 Levaduras.....	14
2.4.1.1 Levadura <i>Yarrowia lipolytica</i>	16
2.4.2 Glucanos	17
2.4.3 Vías de administración de inmunoestimulantes	18
3. JUSTIFICACIÓN	20
4. HIPÓTESIS	21
5. OBJETIVOS	22
5.1 Objetivo general.....	22
5.2 Objetivos particulares	22
6. MATERIAL Y MÉTODOS	23
6.1 Experimento I. Efecto inmunoestimulante de la levadura <i>Y. lipolytica</i> en <i>P. vannamei</i>	23
6.1.1 Cultivo de levadura.....	23
6.1.2 Elaboración de dietas experimentales	23
6.1.3 Condiciones de cultivo de camarón	24
6.1.4 Diseño experimental.....	24
6.1.5 Muestreo y preparación de muestras	24

6.1.5.1 Cultivo de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> y actividad bactericida del SHL contra <i>V. parahaemolyticus</i>	25
6.1.5.2 Parámetros inmunes y respuesta antioxidante.....	26
6.1.5.2.1 Conteo total de hemocitos (CTH).....	26
6.1.5.2.2 Actividad de lisozima.....	26
6.1.5.2.3 Actividad de superóxido dismutasa (SOD).....	26
6.1.5.2.4 Actividad de catalasa (CAT).....	26
6.1.5.2.5 Actividad de peroxidasa.....	27
6.1.5.3 Expresión de genes relevantes en la inmunidad.....	27
6.2 Experimento II. Ruta de administración de inmunoestimulantes.....	28
6.2.1 Expresión de genes del sistema inmune.....	29
6.2.2 Concentración letal media (CL ₅₀).....	30
6.2.3 Infección con <i>V. parahaemolyticus</i> IPNGS16.....	31
6.3 Experimento III. Frecuencia de administración de los inmunoestimulantes.....	31
6.4 Experimento IV. Efecto de duración de la protección de levaduras.....	31
6.5 Análisis estadísticos.....	32
7. RESULTADOS	33
7.1 Experimento I. Efecto inmunoestimulante de la levadura <i>Y. lipolytica</i> en <i>P. vannamei</i>	33
7.1.1 Lisado de hemocitos de camarones suplementados con <i>Y. lipolytica</i> presentan actividad bactericida contra <i>V. parahaemolyticus</i>	33
7.1.2 <i>Yarrowia lipolytica</i> N6 incrementó el conteo de hemocitos en camarón.....	33
7.1.3 <i>Yarrowia lipolytica</i> y β -glucanos incrementaron la actividad de lisozima.....	34
7.1.4 <i>Yarrowia lipolytica</i> y β -glucanos estimularon la actividad enzimática de la superóxido dismutasa.....	35
7.1.5 Actividades de catalasa (CAT) y peroxidasa fueron a corto plazo incrementadas por la levadura <i>Y. lipolytica</i>	36
7.1.6 <i>Yarrowia lipolytica</i> sobre reguló la expresión de genes relacionados a inmunidad después de dos semanas de administración oral.....	37
7.2 Experimento II. Ruta de administración de inmunoestimulantes.....	40
7.2.1 Incremento en peso.....	40
7.2.2 Expresión de genes asociados a la inmunidad en <i>P. vannamei</i>	41
7.2.3 La ruta de administración de los inmunoestimulantes influencia la supervivencia de postlarvas infectadas con <i>V. parahaemolyticus</i> IPNGS16.....	43
7.3 La aplicación de frecuencias de administración de inmunoestimulantes afectó la supervivencia ante una infección con <i>V. parahaemolyticus</i>	44
7.4 Duración del efecto protector de levaduras en camarón contra una infección con <i>V. parahaemolyticus</i>	45
8. DISCUSIÓN	47
8.1 Efecto inmunoestimulante de la levadura <i>Y. lipolytica</i> en <i>P. vannamei</i>	47
8.2 Experimento II. Efecto de la ruta de administración de inmunoestimulantes.....	51
8.2.1 Crecimiento.....	51
8.2.2 Expresión de genes relacionados con la inmunidad en camarones.....	52
8.2.3 Efecto de la ruta de administración de inmunoestimulantes en la supervivencia de postlarvas infectadas con <i>V. parahaemolyticus</i> IPNGS16.....	54
8.3 Frecuencia de administración de inmunoestimulantes.....	55

8.4 La administración de levaduras confiere una protección extensa contra <i>V. parahaemolyticus</i>	56
9. CONCLUSIONES	57
10. LITERATURA CITADA	58
11. ANEXOS	76
Anexo A. Artículo publicado. -Dietary supplementation of marine yeast <i>Yarrowia lipolytica</i> modulates immune response in <i>Litopenaeus vannamei</i>	76
Anexo B. Artículo sometido. -Marine yeast immunostimulatory and protective effects on white shrimp (<i>Penaeus vannamei</i>) postlarvae against <i>Vibrio parahaemolyticus</i> IPNGS16	86

Lista de figuras

Figura 1. Esquema de la respuesta inmune innata de camarones peneidos.	5
Figura 2. Esquema de reconocimiento de patógenos del sistema inmune del camarón.....	9
Figura 3. Inmunomodulación causada por cepas probióticas en peces y camarones.	14
Figura 4. Actividad bactericida en sobrenadante de lisado de hemocitos de <i>P. vannamei</i> (HLS) alimentado con diferentes inmunoestimulantes dietarios por tres semanas.....	33
Figura 5. Conteo total de hemocitos (CTH) de <i>Penaeus vannamei</i> alimentado con diferentes inmunoestimulantes dietarios por tres semanas.	34
Figura 6. Actividad de lisozima en sobrenadante de lisado de hemocitos de <i>P.- vannamei</i> (HLS) alimentado con diferentes inmunoestimulantes dietarios por tres semanas.....	35
Figura 7. Actividad de SOD en suero de <i>P. vannamei</i> alimentado con diferentes inmunoestimulantes dietarios por tres semanas..	36
Figura 8. Actividad de catalasa (CAT) en suero de <i>P. vannamei</i> alimentado con diferentes inmunoestimulantes dietarios por tres semanas..	36
Figura 9. Actividad de peroxidasa en suero de <i>P. vannamei</i> alimentado con diferentes inmunoestimulantes dietarios por tres semanas..	37
Figura 10. Expresión relativa ARNm del gen de profenoloxidasa (proFO) en hemocitos de <i>P. vannamei</i> alimentados con diferentes dietas con inmunoestimulantes durante tres semanas. La línea punteada indica el expresión del grupo control (calibrador).....	38
Figura 11. Expresión relativa ARNm del gen de penaeidina (PEN4) en hemocitos de <i>P. vannamei</i> alimentados con diferentes dietas con inmunoestimulantes durante tres semanas. La línea punteada indica el expresión del grupo control (calibrador)..	39
Figura 12. Expresión relativa ARNm del gen de lisozima (LYZ) en hemocitos de <i>P. vannamei</i> alimentados con diferentes dietas con inmunoestimulantes durante tres semanas. La línea punteada indica la expresión del grupo control (calibrador)..	40
Figura 13. Expresión relativa de ARNm del gen de penaeidina en postlarvas de <i>P. vannamei</i> expuestas a diferentes inmunoestimulantes dietarios. Dh= <i>Debaryomyces hanseii</i> , Yl= <i>Yarrowia lipolytica</i> , O=vía oral, I= vía inmersión..	42
Figura 14. Expresión relativa de ARNm del gen de lectinas en postlarvas de <i>P. vannamei</i> expuestas a diferentes inmunoestimulantes dietarios. Dh= <i>Debaryomyces hanseii</i> , Yl= <i>Yarrowia lipolytica</i> , O=vía oral, I= vía inmersión..	42
Figura 15. Efecto de la ruta de administración de inmunoestimulantes en la supervivencia de postlarvas de <i>P. vannamei</i> retadas con <i>V. parahaemolyticus</i> IPNGS16. Dh= <i>Debaryomyces hanseii</i> , Yl= <i>Yarrowia lipolytica</i> , O=vía oral, I= vía inmersión.	44
Figura 16. Supervivencia posterior al reto de infección con <i>V. parahaemolyticus</i> IPNGS16 en postlarvas de <i>P. vannamei</i> después de aplicar diferentes frecuencias con una mezcla de levaduras por dos vías de administración (oral e inmersión). F1= alimentados diariamente, F2= alimentados cada dos días y F3 alimentados cada tres días.....	45
Figura 17. Duración del efecto protector de levaduras administradas en postlarvas de <i>P. vannamei</i> retadas con <i>V. parahaemolyticus</i> IPNGS16.....	46

Lista de tablas

Tabla 1. Levaduras con actividad inmunoestimulante en camarones.	16
Tabla 2. Estudios de inmunoestimulación en camarones con β -glucanos obtenidos a partir de distintos microorganismos.	18
Tabla 3. Secuencia de los primers utilizados en el análisis de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR).	28
Tabla 4. Secuencia de primers utilizados en el análisis de qPCR en experimento II	30
Tabla 5. Crecimiento en postlarvas de <i>P. vannamei</i> alimentadas con dietas individuales o combinadas de levaduras por dos diferentes rutas.	41
Tabla 6. Niveles de la expresión relativa de genes asociado a la inmunidad de camarones.	43

1. INTRODUCCIÓN

A nivel mundial, la acuicultura representa uno de los sectores de producción de alimento que mayor crecimiento ha presentado en los últimos años (FAO, 2020). Entre los crustáceos, el cultivo de camarón consiste en diversas especies de peneidos de importancia comercial, entre los cuales *Penaeus vannamei* es la especie que más cultivada en el mundo (Qin *et al.*, 2018). Sin embargo, la intensificación de las prácticas de cultivo en camarón ha incrementado la vulnerabilidad a diversas enfermedades (Flegel, 2012; López-León *et al.*, 2016; Campa-Córdova *et al.*, 2017). *Vibrio parahaemolyticus* es una bacteria causante de enfermedades y grandes pérdidas económicas en la industria acuícola (Soto-Rodríguez *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2014). *Vibrio parahaemolyticus* alberga al plásmido pVA1 que contiene los genes PirAB, los cuales codifican para una toxina binaria, que es responsable del síndrome de la necrosis hepatopancreática aguda o AHPND por sus siglas en inglés, que afecta a los camarones cultivados en etapas tempranas de su desarrollo (Letchumanan *et al.*, 2014; Hong *et al.*, 2016). Para resolver este problema, diversas alternativas han sido propuestas, incluyendo el uso de microorganismos benéficos que modulen el sistema inmune de los camarones (Ringø, 2020).

Los probióticos son microorganismos vivos, los cuales, al ser administrados en cantidades adecuadas, confieren beneficios a la salud del huésped (FAO, 2016). En especies acuáticas, la administración de levaduras ha ayudado al control de enfermedades causadas por patógenos a través de su actividad inmunoestimuladora (Scholz *et al.*, 1999; Burgents *et al.*, 2004; Flores-Miranda *et al.*, 2011; Biswas *et al.*, 2012). Por ejemplo, la administración de diversas especies de levaduras, como *Saccharomyces cerevisiae*, *Debaryomyces hansenii*, *Candida* sp. y *Rhodotorula* sp., han incrementado la inmunidad en camarones (Burgents *et al.*, 2004; Sajeevan *et al.*, 2009; Sarlin y Philip, 2011; Babu *et al.*, 2013; Nimrat *et al.*, 2019). En este sentido, las levaduras y sus componentes estructurales de la pared celular (glucanos) incrementan la respuesta del sistema inmune y la protección de camarones contra infecciones bacterianas y virales (Scholz *et al.*, 1999; Chang *et al.*, 2003; Burgents *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2010; Biswas *et al.*, 2012; Babu *et al.*, 2013; Wilson *et al.*, 2015).

La administración de levaduras y glucanos activa el sistema inmune en camarones, promoviendo las funciones celulares, efectores humorales y la expresión de genes asociados a la inmunidad (Campa-Córdova *et al.*, 2002; Miao *et al.*, 2020; Pooljun *et al.*, 2020). Sin embargo, para la óptima activación del sistema inmune y la protección por inmunoestimulantes se debe considerar la vía de administración, la dosis y la frecuencia de administración (Sajeevan *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2012). Notablemente, la dosis y frecuencia de administración de inmunoestimulantes son parámetros críticos para evitar la supresión del sistema inmune y baja resistencia a enfermedades (Chang *et al.*, 2000; Sajeevan *et al.*, 2006).

Yarrowia lipolytica es una levadura no patogénica, aeróbica y dimórfica, la cual ha sido aislada de una amplia variedad de ambientes marinos y costeros (Liu *et al.*, 2015). Debido a su perfil de ácidos grasos, *Y. lipolytica* ha sido utilizada como suplemento dietario en acuicultura (Berge *et al.*, 2013). En peces, *Y. lipolytica* incorporada en dietas estimuló la respuesta inmune y mejoró la condición de salud (Hatlen *et al.*, 2012; Berge *et al.*, 2013; Alamillo *et al.*, 2017). Sin embargo, su efecto inmunomodulador ha sido escasamente estudiado en crustáceos. Por otra parte, *Debaryomyces hansenii* CBS8339 es una levadura que incrementa la respuesta inmune y la protección contra patógenos en animales acuáticos (Tovar *et al.*, 2004; Caruffo *et al.*, 2016; Angulo *et al.*, 2017).

Tomando en cuenta el conocimiento previo, este estudio tiene como objetivos evaluar el efecto inmunomodulador de levaduras en camarón blanco *P. vannamei* a través de la medición de efectores humorales, actividad de enzimas antioxidantes y la expresión de genes de relevancia para la inmunidad. Además, se evaluará el efecto de la dosis, vía de administración, frecuencia y tiempo de protección en la administración de levaduras en postlarvas de camarón mediante la expresión de genes relevantes en la inmunidad y la supervivencia ante un reto de infección con *Vibrio parahaemolyticus* IPNGS16 (AHPND).

2. ANTECEDENTES

2.1 Enfermedades asociadas al de cultivo de camarón

La salud de los organismos en cultivo está determinada por las interacciones entre los parámetros ambientales, las comunidades microbianas y el huésped (Le Moullac y Haffner, 2000; Cheng *et al.*, 2005). Sin embargo, alteraciones en las condiciones de cultivo (densidad de siembra y manejo de los especímenes), los parámetros ambientales (salinidad, pH, oxígeno y temperatura) o mutaciones de las cepas patógenas, puede originar enfermedades infecciosas, que causen pérdidas significativas en la industria (Li y Chen, 2008). La industria del cultivo de camarón reporta anualmente considerables pérdidas económicas causadas por brotes de enfermedades infecciosas, particularmente, enfermedades causadas por bacterias (vibriosis) las cuales han sido asociadas con 40% de pérdidas económicas en granjas de camarón a nivel mundial (Morales-Covarrubias *et al.*, 2011; De Schryver *et al.*, 2014; Figueroa-Pizano *et al.*, 2014).

Se ha reportado que el síndrome de mortalidad temprana o EMS por sus siglas en inglés, causa alta mortalidad en etapas tempranas del cultivo de camarón (10-30 días en etapa de engorda) (Tran *et al.*, 2013; Enríquez-Espinoza *et al.*, 2016; López-León *et al.*, 2016). Diversos autores comentan que esta enfermedad afecta también a camarones en etapa de juveniles y adultos (De la peña *et al.*, 2015; Raja *et al.*, 2017). Los primeros registros de esta enfermedad se realizaron en los países de China (2009), Vietnam (2010), Malasia (2011) y Tailandia (2012) (Restrepo *et al.*, 2018). En México, los primeros brotes ocurrieron en la región Noroeste del país, en el estado de Nayarit, y posteriormente en Sinaloa y Sonora, donde se reportaron pérdidas del 95% en los cultivos (Restrepo *et al.*, 2018; Yu *et al.*, 2020). El grado de afectación en la industria del cultivo de camarón derivado del brote de EMS, condujo a los investigadores a encontrar al agente causal de esta enfermedad, identificando a *Vibrio parahaemolyticus* como el patógeno responsable (Kondo *et al.*, 2015; López-León *et al.*, 2016). Una vez que se identificó al patógeno causante de la enfermedad, el síndrome de mortalidad temprana (EMS) fue renombrado como enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda (AHPND) (Lightner *et al.*, 2012; Tran *et al.*, 2013).

2.1.1. *Vibrio parahaemolyticus* causante de AHPND

V. parahaemolyticus es una bacteria perteneciente a la familia Vibrionaceae, de tipo Gram-negativa, halófila, móvil (1-2 flagelos polares), mesófila, con metabolismo fermentativo facultativo y con un tamaño de 1 a 3 μm (Letchumanan *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2015). De manera natural, los vibrios se encuentran en cuerpos de agua costeros de todo el mundo (Baffone *et al.*, 2003), o incluso dentro del tracto digestivo de peces, moluscos y crustáceos (Vandenberghe *et al.*, 2003). *V. parahaemolyticus* es una bacteria con la capacidad de atravesar el epitelio y colonizar tejidos a través de diversas rutas, como son por vía oral (alimento), branquias y por lesiones en el epitelio (Martin *et al.*, 2004). La introducción de *V. parahaemolyticus* por vía oral le confiere la habilidad de colonizar el tracto digestivo, produciendo y liberando toxinas, que en una fase aguda de infección pueden causar la degradación de células del hepatopáncreas, daño en las células epiteliales de los túbulos del hepatopáncreas, daño en hemocitos y necrosis de tejidos (hepatopáncreas) (Tran *et al.*, 2013; Khimmakthong y Sukkarun, 2017). La manifestación de la enfermedad ocurre cuando se presentan disturbios en el sistema inmune o cuando los organismos son expuestos a altas concentraciones de la bacteria (Khimmakthong y Sukkarun, 2017).

Diversas cepas de *V. parahaemolyticus* poseen factores de virulencia asociadas con gastroenteritis transmitida por alimentos en humanos que incluyen adhesinas, hemolisina termoestable directa (TDH) y hemolisina relacionada con TDH (TRH) (Raghunath, 2015). En contraste, las cepas de *V. parahaemolyticus* causantes de AHPND en crustáceos albergan un plásmido de 69-kb que posee genes de virulencia propios, como son los genes similares a la toxina relacionada con el insecto *Photobacterium* (Pir) y que codifican para dos toxinas Pir A y Pir B (Han *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2015). La administración individual (PirA o PirB) de estas toxinas no producen mortalidad en camarones; por el contrario, se ha reportado que la administración de la toxina recombinante PirA en camarones puede ser utilizada como inmunoestimulante (Campa-Córdova *et al.*, 2017). Contrariamente, se ha reportado que la administración de la toxina binaria PirAB produce alta patogenicidad y mortalidad (Lai *et al.*, 2015; Sirikharin *et al.*, 2015).

Entre la sintomatología de camarones infectados con AHPND se encuentran el nado errático, enanismo, movimiento letárgico, pérdida del apetito, así como necrosis y daño severo del hepatopáncreas (Zorriehzahra y Banaederakhshan, 2015).

2.2 Sistema Inmune innato de crustáceos

Debido a la ausencia de un sistema de respuesta inmune adaptativo, se cree que los invertebrados dependen únicamente del sistema inmune innato para la eliminación de patógenos (Xu *et al.*, 2014). Estudios recientes proponen que los camarones poseen un sistema inmune semi-específico, debido a la complejidad a nivel molecular de los componentes del sistema inmune (reacción, unión, y reconocimiento) (Kulkarni *et al.*, 2021). Sin embargo, hasta la fecha, no se han presentado pruebas contundentes que esclarezcan la función de la memoria inmunológica específica de crustáceos.

La activación de la inmunidad innata en camarones es realizada mediante receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), incluyendo los receptores tipo Toll (TLRs) (Kawai y Akira, 2010; Li y Xiang, 2013). La identificación de patógenos permite la activación de los mecanismos celulares y efectores humorales para la eliminación de patógenos (Fig. 1) (Vázquez *et al.*, 2009; Tassanakajon *et al.*, 2013).

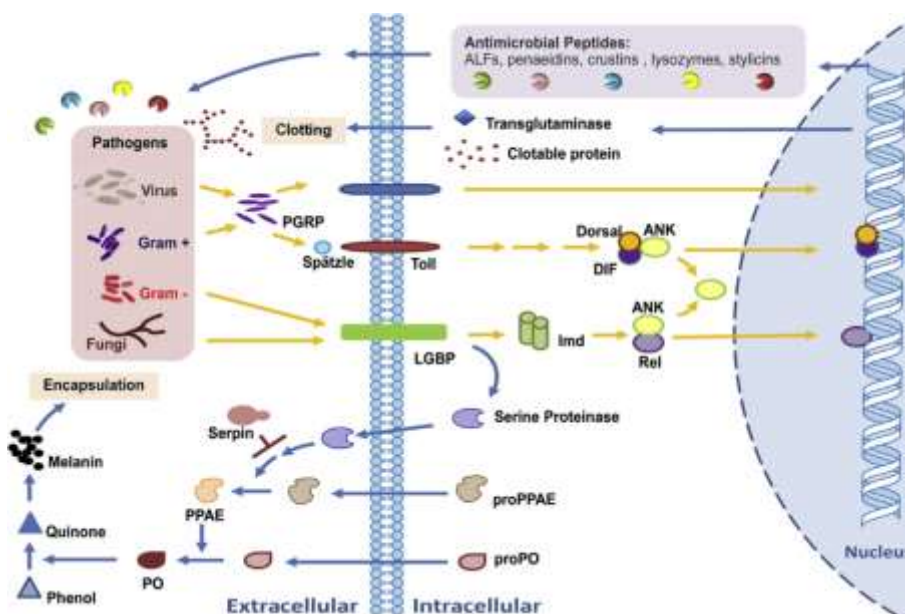


Figura 1. Esquema de la respuesta inmune innata de camarones peneidos (Tomado de Tassanakajon *et al.*, 2013).

2.2.1 Respuesta inmune celular

Los crustáceos poseen un sistema circulatorio abierto, con tres tipos celulares (hemocitos) que han sido identificados en este sistema, células hialinas carentes de gránulos, células semi-granulares con un número variable de pequeños gránulos y células granulares con abundante número de gránulos (Sung *et al.*, 1999; Smith *et al.*, 2010). Los hemocitos realizan la función como el principal sistema de reconocimiento de moléculas propias y extrañas, promueven la eliminación de patógenos y desatan diferentes mecanismos de defensa, tales como fagocitosis, aglutinación, encapsulación, activación del estallido respiratorio y producción de péptidos antimicrobianos (Bachere *et al.*, 2000; Xu *et al.*, 2014).

2.2.1.1 Fagocitosis

La fagocitosis es el principal mecanismo de defensa celular en invertebrados, por el cual los hemocitos eliminan patógenos. Los hemocitos granulares y semi-granulares envuelven e internalizan materiales extraños como bacterias, protozoarios, hongos, virus, así como restos celulares de células necróticas y apoptóticas (Stuart y Ezekowitz, 2008). El proceso de fagocitosis da inicio con el reconocimiento mediante receptores que reconocen partículas en la superficie de patógenos. Posteriormente, los fagosomas se fusionan con el endosoma y el lisosoma para generar el fagolisosoma, dentro del cual se destruirán los patógenos (Vargas-Albores y Yepiz-Plascencia, 2000; Stuart y Ezekowitz, 2008).

Las células fagocíticas llevan a cabo la destrucción del organismo internalizado por dos vías: la vía aeróbica en el cual el NADPH o NADH funcionan como donador de electrones, y reducen un electrón del oxígeno para formar ion superóxido. Este radical a su vez cambia a peróxido de hidrógeno (H₂O₂) mediante la acción de la enzima superóxido dismutasa, generando una molécula de oxígeno (Campa-Córdova *et al.*, 2002). En hemocitos de camarones peneidos, la activación del proceso por vía aeróbica ha sido demostrado mediante el uso de bacterias (*V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus*) y antígenos microbianos (β -1,3 glucanos, peptidoglucanos, LPS y zimosan), incrementando en ambos casos la capacidad fagocítica de los hemocitos para destruir patógenos (Itami *et al.*, 1998; Campa-Córdova *et al.*, 2002). El segundo, corresponde a la vía anaeróbica mediante la acción de enzimas con actividad bactericida, así como enzimas lisozimales y péptidos antimicrobianos (AMP) (Nappi y Ottaviani, 2000).

2.2.1.2 Encapsulamiento y formación de nódulos

Los hemocitos semi-granulares y granulares cumplen la función de reconocimiento de agentes invasores y su encapsulamiento con proteínas que desempeñan la función de opsoninas asociadas a la activación del sistema profenoloxidasa (proFO). Estas proteínas actúan como factores de adhesión, degranulación y promotores de encapsulamiento (Vargas-Albores y Yepiz-Plascencia, 2000). Los nódulos hemolíticos, detectados en branquias y hepatopáncreas, son formados por la agregación de un gran número de hemocitos actuando conjuntamente para capturar microorganismos de gran tamaño que no pueden ser removidos mediante la fagocitosis (Wang *et al.*, 2001, Van de Braak *et al.*, 2002). Este proceso de nodulación consiste en la formación de múltiples capas de hemocitos en las que los microorganismos quedan atrapados y eventualmente son eliminados por el proceso de melanización mediada por la fenoloxidasa (FO) derivada de la proFO (Dubovskiy *et al.*, 2016).

2.2.1.3 Cascada profenoloxidasa

La activación del sistema de proFO es controlada por una vía que consta de una cascada de eventos. El reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) por PRPs provocan que la proFO (proenzima) y la enzima activadora (proenzima) sean liberadas del hemocito al plasma, donde se activa la serin proteasa con el calcio presente, y eventualmente culminan en el rompimiento proteolítico del zimógeno proFO para la activación de la enzima FO (Amparyup *et al.*, 2013). La cascada de proFO es activada con el reconocimiento de PAMPs de diversos microorganismos. La activación de la cascada de serin proteasa por las interacción PAMPs-PRP, resulta en la producción de melanina, la cual se deposita en el sitio de infección o sobre la superficie de los microorganismos (Cerenius y Söderhäll, 2004).

Diversos autores reportan que la cascada de proFO se activa mediante la identificación de los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), al igual que los lipopolisacáridos (Iwanaga y Lee, 2005; Cerenius *et al.*, 2008), β -1,3 glucanos (Cerenius *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 2011) y peptidoglicanos (PGN) (Sumathipala y Jiang, 2010). Fagutao *et al.* (2009), reportaron una disminución de la actividad de la proFO, un precursor inactivo de la FO por ARN de interferencia (ARNi), resultando en un incremento significativo en la carga bacteriana en *M. japonicus*, aun en la ausencia de patógenos. Por lo tanto, el silenciamiento de la proFO produjo un incremento en la mortalidad por patógenos en camarón.

2.2.1.4 Respuesta antioxidante

Mecanismos antioxidantes protegen a los camarones de efectos citotóxicos causados por el metabolismo celular y estrés oxidativo generado por el exceso de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) y de nitrógeno (RNS), que son generadas durante el proceso de fagocitosis (Xu y Pan, 2014). Para prevenir el daño oxidativo, existen diversas estrategias de defensa antioxidante a nivel celular, las cuales incluyen enzimas (catalasa, glutatión peroxidasa (GPx) y superóxido dismutasa (SOD) y componentes no enzimáticos (pigmentos, carotenos y vitaminas), los cuales neutralizan los ROS y reparan el daño celular (Liu *et al.*, 2017). La SOD convierte radicales superóxido a peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y oxígeno, y posteriormente el H_2O_2 es eliminado de las células a través de la vía de glutatión peroxidasa (GPX) y catalasa (CAT) (Warner, 1994).

La actividad de la SOD es un mecanismo de defensa contra el estrés oxidativo causado por diversos factores como la contaminación, infecciones, hipoxia, temperatura e inmunoestimulantes (Duan *et al.*, 2015). La actividad de la SOD extracelular ha sido reportada en camarones penaeidos, la cual se ha asociado con fagocitosis, encapsulamiento y generación de compuestos microbicidas (Campa-Córdova *et al.*, 2002).

2.2.2 Respuesta humoral

2.2.2.1 Moléculas de reconocimiento

Las lectinas son proteínas no enzimáticas o glicoproteínas que actúan en la aglutinación, fagocitosis y encapsulación de patógenos. Las lectinas se consideran moléculas de reconocimiento capaces de detectar carbohidratos que promueven la activación de diversos componentes del sistema inmune en crustáceos, entre ellos la activación del sistema proPO (Wang *et al.*, 2001; Wang y Wang, 2013a).

Recientemente, un incremento en el número de funciones realizadas por lectinas tipo C (CTLs) en la respuesta inmune han sido identificadas y caracterizadas en crustáceos. Estas CTLs de crustáceos no solo participan en la unión y reconocimiento, además, estas involucradas en otras respuestas inmunes que incluyen la aglutinación de microorganismos, así como en otras funciones bactericidas y antivirales como el incremento en la opsonización y encapsulamiento celular (Wang *et al.*, 2013b). Por ejemplo, las CTLs de *Fenneropenaeus chinensis* puede

responder ante un reto infeccioso con *V. anguillarum* y enlazarse a PAMPS incluyendo lipopolisacáridos (LPS) y peptidoglicanos (PGN) (Wang *et al.*, 2009). Las lectinas de *F. chinensis* (FcLec) y *P. monodon* (PmLec) pueden incrementar la actividad fagocítica en hemocitos contra infecciones bacterianas (Wang *et al.*, 2009; Luo *et al.*, 2006). Además, las CTLs en el camarón *Marsupenaeus japonicus* pueden unirse a proteínas de WSSV, resaltando su actividad inmune antiviral (Song *et al.*, 2010).

2.2.2.2 Proteínas de reconocimiento de patrones (PRPs) y lipoproteínas de unión a β -1,3-glucanos (LGBPs)

Los lipopolisacáridos bacterianos (LPS) y fúngicos β -1,3-glucanos específicamente asociados a superficies de invertebrados por proteínas de reconocimiento de patrones (PRPs), desencadenan determinadas respuestas inmunes. Las proteínas de unión a β -1,3-glucanos (LGBP) son aquellas PRPs en crustáceos que activan la proFO, cascada de coagulación y la formación de péptidos antimicrobianos (AMPs, por sus siglas en inglés) (Fig. 2) (Cerenius *et al.*, 2008). Amparyup *et al.* (2013) caracterizaron la función de las LGBP en *P. monodon* en el sistema proFO y encontraron que transcritos de LGBP son expresados en hemocitos, incrementándose 24 horas posteriores a una infección con *V. harveyi*. Además, el silenciamiento génico mediado por interferencia de ARN (ARNi) demostró que la baja expresión del gen PmLGBP en el camarón disminuyó significativamente la actividad de la FO.

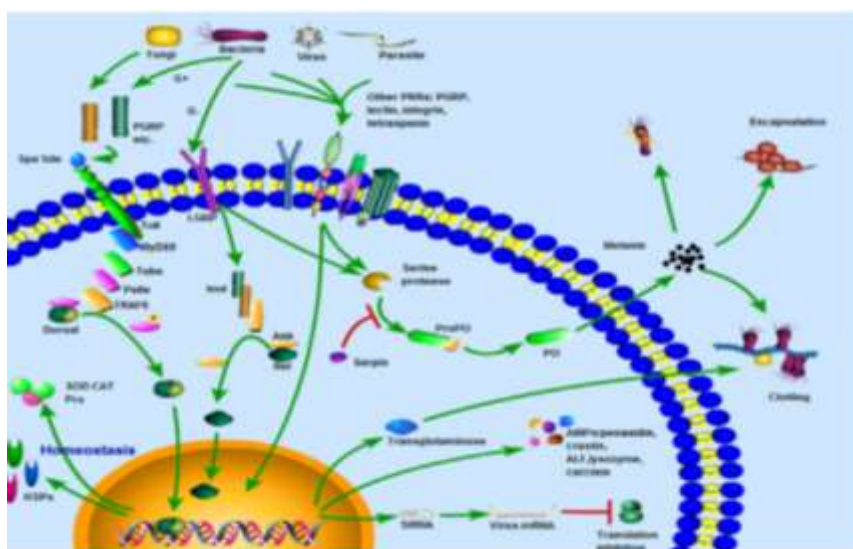


Figura 2. Esquema de reconocimiento de patógenos del sistema inmune del camarón (Tomado de Li y Xiang, 2013).

2.2.2.3 Péptidos antimicrobianos

La actividad de los AMPs en diversos grupos de invertebrados representa un mecanismo de importancia en la exterminación de agentes patógenos (Bachere *et al.*, 2000; Muñoz *et al.*, 2003). Los AMPs son proteínas de bajo peso molecular cruciales en organismos que no presentan inmunidad adaptativa, actuando como un mecanismo de defensa contra patógenos (Marshall y Arenas, 2003). Los AMPs tienen una amplia actividad, baja especificidad y son baja citotoxicidad en células animales. Algunos de los AMPs que han sido previamente descritos en camarones penaeidos son las penaeidinas, crustinas y factores anti-lipopolisacáridos (ALFs). Los AMPs presentan múltiples clases de isoformas y poseen actividad antibacteriana, antifúngica y antiviral contra diferentes patógenos en camarón (Tassanakajon *et al.*, 2013).

Los AMPs pueden ser liberados por exocitosis posterior a una estimulación con microorganismos (Tassanakajon *et al.*, 2018). La activación del sistema inmune (inmunoestimulación) aumenta la secreción de péptidos antimicrobianos circulantes y otras proteínas para combatir la infección (Tassanakajon *et al.*, 2018). En esta respuesta, se encuentran involucradas dos principales rutas de señalización del sistema inmune, conocidas como rutas Toll e Imd (Inmuno deficiencia), las cuales regulan la expresión de AMPs (Naitza y Ligoxygakis, 2004).

Las penaeidinas son una familia de AMPs que han sido específicamente caracterizadas e identificadas en camarones penaeidos (Destoumieux *et al.*, 2000; Tassanakajon *et al.*, 2013). Basado en la similitud de las secuencias de aminoácidos, las penaeidinas han sido identificadas en algunas especies de camarones penaeidos, incluidos *P. vannamei*, *L. setiferus*, *F. chinensis* y *P. monodon* (Tassanakajon *et al.*, 2013). Las penaeidinas se sintetizan y almacenan en los granulocitos, y presentan actividad bactericida contra bacterias Gram (+) y antifúngicas (Bachere *et al.*, 2000; Destoumieux *et al.*, 2000). Las penaeidinas tienen variadas isoformas, las cuales han sido clasificadas como penaeidina 2 (PEN2), penaeidina 3 (PEN3) y penaeidina 4 (PEN4) según su similitud de la secuencia de aminoácidos (Wang *et al.*, 2008).

Las crustinas se aislaron por primera vez del cangrejo *Carcinus maenas* y se caracterizaron como un péptido rico en cisteína con actividad antimicrobiana contra bacterias Gram (+). La presencia de homólogos de crustinas han sido determinadas en *P. vannamei* y en otras especies de penaeidos (Bartlett *et al.*, 2002). Estos péptidos antimicrobianos se sintetizan y se almacenan en

los hemocitos y su liberación es inducida principalmente por infecciones bacterianas (Vargas-Albores *et al.*, 2004). Okumura (2007) demostró mediante un análisis de expresión génica en péptidos antimicrobianos en camarones peneidos inoculados con *Vibrio*, una disminución en los niveles de expresión de penaeidina y crustina en hemocitos de *P. vannamei*. Adicionalmente, el suministro por vía oral de LPS y β -1,3-glucanos induce un aumento en la expresión de crustinas y otros péptidos antimicrobianos en diversas especies de penaeidos (Wilson *et al.*, 2015).

2.2.3 Rutas de señalización del sistema inmune

Las rutas que incluyen receptores tipo Toll (TLR) y de inmunodeficiencia (IMD) son rutas de señalización esenciales para inducir genes relacionados con el sistema inmune innato durante una infección con patógenos (Tassanakajon *et al.*, 2018). Diversos estudios han comprobado a partir del uso de herramientas moleculares que genes que codifican para la síntesis y liberación de AMPs son regulados por las vías Toll e IMD (Tassanakajon *et al.*, 2018). La ruta Toll en crustáceos es activada principalmente por bacterias Gram-positivas, hongos y levaduras, además controla una amplia parte de expresión de AMPs activos contra hongos, activación de la cascada de coagulación y procesos de melanización (Tassanakajon *et al.*, 2018). La ruta de señalización Toll está integrada por diversos componentes de origen proteico como los ligandos Spätzle, Toll, Pelle, Tube, MyD88, Cactus y Dorsal (Li y Xiang, 2013).

Wang *et al.* (2012), realizaron un estudio donde realizaron el aislamiento de dos receptores tipo Toll (LvToll2 y LvToll3) y tres proteínas Spätzle (LvSpz1, LvSpz2, LvSpz3) en *P. vannamei*, demostrando el nivel de expresión en varios tejidos después de un reto con *Vibrio alginoliticus* y con WSSV. Estos autores concluyeron que el receptor LvToll es relevante en la respuesta inmune innata ante una infección aguda por *Vibrio*, confirmándolo mediante el silenciamiento de receptores tipo Toll en camarones retados con *V. harveyi*, incrementando significativamente la mortalidad en este grupo de camarones.

La ruta de señalización IMD responde principalmente a infección por bacterias Gram-negativas y controla la expresión de genes asociados a péptidos antibacterianos (principalmente penaeidinas). Lan *et al.* (2013) analizaron los niveles de expresión de dos receptores IMD (FcIMD y PcIMD) en diversos tejidos de camarón posterior a realizar una infección con *V. anguillarum* y WSSV. Mediante un análisis con ARNi se demostró que la ruta IMD estuvo implicada en la

regulación de los niveles de expresión de tres AMP, incluyendo crustinas, ALF y lisozimas en camarón, confirmando la importancia de esta vía de señalización en infecciones bacterianas.

2.3 Probióticos

Los probióticos son definidos como organismos vivos que al ser suministrados en cantidades adecuadas otorgan beneficios para la salud del hospedero (FAO, 2016). Actualmente, los probióticos son comúnmente utilizados como promotores de salud, en alimentos funcionales y suplementos profilácticos, terapéuticos y de crecimiento en producción y salud animal (Balcázar *et al.*, 2006; Kesarcodi-Watson *et al.*, 2008). Por lo general, las bacterias son microorganismos que han sido ampliamente utilizadas como probióticos e inmunoestimulantes en el cultivo de organismos marinos (Pandiyan *et al.*, 2013). Las bacterias, en especial del tipo ácido lácticas (BAL) son microorganismos que presentan la habilidad de tolerar ambientes ácidos, favoreciendo su fijación en el tracto digestivo, y realizando funciones como la reducción del pH y compiten por sitios de anclaje con bacterias patógenas, evitando la colonización del tracto digestivo. Por otra parte, las levaduras son un grupo de organismos con propiedades probióticas, las cuales ofrecen una serie de ventajas en el hospedero como son adhesión al tracto digestivo, producción de AMPs y metabolitos secundarios, así como la promoción de la estimulación del sistema de defensa en organismos de cultivo (Banerjee y Ray, 2017).

La actividad de los microorganismos con propiedades probióticas se desarrolla mediante diversos modos de acción por los cuales confieren un efecto benéfico al hospedero como son el antagonismo ante patógenos, la habilidad de las células para producir metabolitos como vitaminas, pigmentos, proteínas y enzimas, propiedades para colonizar y adherirse a las paredes del tracto gastrointestinal e incrementar el sistema inmune del hospedero (Balcázar *et al.*, 2006; Newaj-Fyzul *et al.*, 2014)

2.3.1 Exclusión competitiva de bacterias patógenas

La exclusión competitiva es un fenómeno donde una microflora establecida previene o reduce la colonización de un patógeno (Sha *et al.*, 2016). El objetivo de los probióticos es establecer una microbiota benéfica, estable y controlada que contienda por sitios en la mucosa y disponibilidad de nutrientes. Además, los probióticos pueden producir compuestos inhibitorios, las cuales

evitan la replicación y promueven la destrucción de los patógenos evitando que colonicen el intestino (Vine *et al.*, 2004).

2.3.2 Producción de compuestos inhibitorios

El antagonismo bacteriano es un fenómeno común en las interacciones microbianas, las cuales realizan una acción fundamental en el equilibrio entre los microorganismos probióticos y los patógenos (Bomba *et al.*, 2002). Los compuestos antagonistas se definen como sustancias químicas producidas por microorganismos que presentan cierta toxicidad (bactericidas), y que cuentan con la habilidad de impedir el crecimiento de otros microorganismos.

La actividad bactericida es un parámetro importante en estudios de inmunología debido a su habilidad para evaluar la defensa inmune innata, ya que las respuestas del sistema inmunológico pueden verse influenciadas por varias sustancias o procesos (Biller-Takahashi *et al.*, 2013). La presencia de compuestos bactericidas puede evaluarse en diversos tejidos como intestino y sangre (suero o hemocitos), o en medios de cultivo (agua), donde la acción de los compuestos bactericidas previene la proliferación y promueve la eliminación de patógenos. Las propiedades antimicrobianas de diversos microorganismos probióticos se deben principalmente a la producción de una amplia variedad de péptidos (Cheng *et al.*, 2017). Por lo tanto, las levaduras marinas producen un amplio rango de compuestos con actividad antimicrobiana, incluyendo péptidos antimicrobianos, lisozimas, entre otros, los cuales pueden ser incrementados por la presencia de patógenos e inmunoestimulantes (Kizheva *et al.*, 2019).

2.4 Inmunoestimulantes

Diversas cepas de organismos probióticos que componen la microbiota de camarones y peces, tienen la capacidad de activar el sistema inmunitario a través del incremento en la respuesta celular (aumento en el número de células de defensa) y humoral como el incremento en la producción de compuestos con actividad antibacteriana y antifúngica como enzimas, AMPs, lisozimas, lectinas, entre otros (Fig. 3) (Barman *et al.*, 2013).

Los inmunoestimulantes son sustancias que activan el sistema inmune de los organismos, haciéndolo más resistente a enfermedades (Barman *et al.*, 2013). En función de su naturaleza los inmunoestimulantes se agrupan en distintas categorías, agentes químicos, microorganismos (bacterias y levaduras), polisacáridos, extractos de plantas o animales y/o factores nutricionales.

El uso de inmunoestimulantes no genera una respuesta específica a un tipo de antígenos, sin embargo, produce una serie de respuestas que aceleran el reconocimiento y eliminación de agentes infecciosos y partículas extrañas (Apines-Amar y Amar, 2015).

Actualmente existe una amplia gama de inmunoestimulantes comerciales que están disponibles y que son extensamente utilizados en la agroindustria del camarón en cultivo. Sin embargo, el uso indiscriminado de los inmunoestimulantes, sin conocimiento previo de dosis y frecuencia óptimas de administración, puede ocasionar síntomas secundarios como son la reducción de la efectividad en la protección contra patógenos e inmunosupresión (Sajeevan *et al.*, 2009).

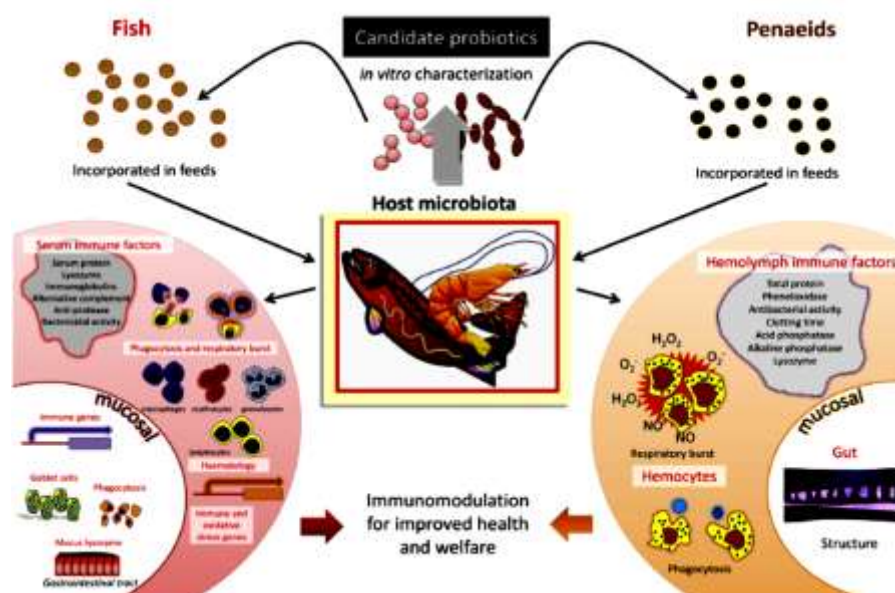


Figura 3. Inmunomodulación causada por cepas probióticas en peces y camarones. (Tomado de Lazado *et al.*, 2015)

2.4.1 Levaduras

Debido a que las levaduras pueden producir diversos compuestos bioactivos, además de nutrientes como son proteínas, aminoácidos, vitaminas, polisacáridos, fosfolípidos, poliaminas, pigmentos (astaxantina y β -carotenos), enzimas digestivas (proteasas y amilasas), toxinas killer, etc., estos microorganismos han recibido gran atención por décadas por su uso potencial en la industria acuícola (Yang *et al.*, 2010).

En general, la administración de levaduras probióticas puede ayudar al control de agentes patógenos mediante la estimulación del sistema de defensa en especies de cultivo (Babu *et al.*, 2013). En este sentido, la administración oral de diversas especies de levaduras como

Saccharomyces cerevisiae, *Debaryomyces hansenii*, *Candida* sp., entre otras especies de levaduras, han demostrado Incrementar la inmunidad innata en diversas especies de camarones peneidos (Tabla 1) (Burgents, 2004; Sajeevan *et al.*, 2009; Sarlin y Philip, 2011; Babu *et al.*, 2013). De manera general estos estudios demostraron que la administración de levaduras probióticas incrementó la respuesta celular (conteo total de hemocitos), actividad fagocítica, actividad de enzimas antioxidantes, así como un aumento en la expresión de genes inmunes en camarones. Cabe mencionar que este incremento en los parámetros inmunes ha sido principalmente asociado con el reconocimiento de β -glucanos que se encuentran en la pared celular de levaduras, los cuales varían dependiendo de la especie de levadura, cepa y origen (Barman *et al.*, 2013; Tassanakajon *et al.*, 2013).

Scholz *et al.* (1999), reportaron que la inclusión de 1% de la levadura *S. cerevisiae* administrada durante una semana en *P. vannamei*, incrementaron la ganancia en peso, la actividad de la proFO y la mayor supervivencia en camarones infectados con *V. harveyi*. Burgents *et al.* (2004), evaluaron el uso dietario de la levadura *S. cerevisiae* como inmunoestimulante en *P. vannamei* ante una infección con *Vibrio* sp. Los resultados revelaron que los camarones alimentados con la levadura presentaron una mayor supervivencia con respecto del grupo control, indicando que la administración de levaduras en la dieta puede proteger a los camarones contra una infección bacteriana. Por otra parte, Sarlin y Philip (2011) reportaron una mayor supervivencia, así como un incremento de los parámetros inmunes con el uso de levaduras marinas (*Debaryomyces hansenii* y *Candida tropicalis*) como inmunoestimulantes ante una infección con WSSV.

Tabla 1. Levaduras con actividad inmunoestimulante en camarones.

Inmunoestimulante	Especie	Efecto en el hospedero	Ref.
<i>Rhodosporidium paludigenum</i>	<i>P. Vannamei</i>	↑ Respuesta sistema antioxidante (SOD, GPX, CAT)	1
<i>Debaryomyces hansenii</i> / <i>Candida tropicalis</i>	<i>F. indicus</i>	↑ Conteo total de hemocitos ↑ Actividad proFO	2
	<i>P. monodon</i>	↑ Conteo total de hemocitos ↑ Expresión péptidos antimicrobianos ↑ supervivencia a WSSV	3
<i>Candida aquaetoxoris</i>			
<i>Saccharomyces exiguus</i> / <i>Phaffia rhodozyma</i>	<i>P. vannamei</i>	↑ Actividad proFO ↑ supervivencia a <i>Vibrio harveyi</i>	4
<i>Yarrowia lipolytica</i>	<i>Lutjanus peru</i>	↑ Estallido respiratorio y fagocitosis Regulación de genes inmunidad y estrés oxidativo	5

Referencias. 1. Yang *et al.*, 2010; 2. Sarlin y Philip, 2011; 3. Babu *et al.*, 2013; 4. Scholz *et al.*, 1999; 5. Alamillo *et al.*, 2017.
Abreviaturas: SOD (superóxido dismutasa), GPX (glutación peroxidasa), proFO (profenoloxidasa), CAT (catalasa), WSSV (virus de la mancha blanca).

2.4.1.1 Levadura *Yarrowia lipolytica*

Entre todas las especies de levaduras, aquellas que presentan características extremófilas y extremo tolerantes han ganado gran interés como candidatos a probióticos debido a que pueden tolerar amplios rangos en parámetros fisicoquímicos, incluyendo aquellos encontrados en el tracto gastrointestinal (Harzevili, 2014). Además, estas levaduras pueden competir en ambientes hostiles y sintetizar una variedad de compuestos como son β -glucanos y metabolitos secundarios, también conocidos como moléculas capaces de estimular el sistema inmune innato de organismos de cultivo (Giordano *et al.*, 2015).

Y. lipolytica es una levadura ascomicética no patogénica, dimórfica y aeróbica, la cual ha sido aislada de diversos de ambientes marinos y costeros (Harzevili, 2014). Debido a su excelente perfil de ácidos grasos, *Y. lipolytica* ha sido usada como suplemento dietario en acuicultura (Berge *et al.*, 2013). Sin embargo, a la fecha en crustáceos son escasos los estudios donde se reporten las propiedades inmunoestimuladoras de la levadura *Y. lipolytica*. En peces, la

incorporación dietaria de *Y. lipolytica* estimula la respuesta inmunitaria y mejora la condición de salud (Hatlen *et al.*, 2012; Berge *et al.*, 2013; Alamillo *et al.*, 2017). Recientemente, el grupo de Inmunología y Vacunología del CIBNOR evaluó una cepa de *Y. lipolytica* (cepa N6) en leucocitos del huachinango del pacífico (*Lutjanus peru*), encontrando incrementos significativos en la actividad fagocítica, estallido respiratorio y actividad de enzimas antioxidantes (Alamillo *et al.*, 2017).

2.4.2 Glucanos

Los β -glucanos son compuestos estructurales que se encuentran en la pared celular de levaduras y hongos (Wilson *et al.*, 2015). La administración de diferentes tipos de glucanos en la dieta en diversas especies de camarones resulta en la activación del sistema inmune innato y en el incremento en la protección contra patógenos (Barman *et al.*, 2013) (Tabla 2). El estado de salud, crecimiento y desarrollo en general de camarones en cultivo representan parámetros que pueden ser incrementados por el uso de β -glucanos. La fuente de obtención del producto, especie, estado de desarrollo del organismo, dosis, tipo de glucano, ruta, tiempo de administración y asociación con otros inmunoestimulantes afectan las propiedades inmunomoduladoras de los glucanos (Apines-Amar y Amar, 2015).

Tabla 2. Estudios de inmunoestimulación en camarones con β -glucanos obtenidos a partir de distintos microorganismos.

Inmunoestimulante	Especie	Efecto en el hospedero	Ref.
β -1,3-glucano <i>Schizophyllum commune</i>	<i>P. monodon</i>	↑ Actividad fagocítica ↑ Producción de anión superóxido	1
	<i>P. monodon</i>	↑ Actividad proFO y SOD ↑ Producción de anión superóxido ↑ Supervivencia WSSV	2
β -1,3/1,6-glucano <i>S. cerevisiae</i>	<i>P. vannamei</i>	↑ Conteo total hemocitos ↑ Act. bactericida (<i>V. alginolyticus</i>) ↑ Producción anión superóxido	3
β -glucano Macrogard®	<i>P. vannamei</i>	↑ ARNm expresión lisozima y SOD	4
<i>Laminarina</i>	<i>F. chinensis</i>	↑ CTH y lisozima ↑ supervivencia a <i>V. anguillarum</i>	5
Laminarina <i>Laminarina digitata</i>	<i>P. vannamei</i>	↑ Actividad fenoloxidasa	6

Referencias. 1. Chang *et al.*, 2000; 2. Chang *et al.*, 2003; Rodríguez *et al.*, 2007; 4. Wang *et al.*, 2008; 5. Yao *et al.*, 2008; 6. Chen *et al.*, 2016. **Abreviaturas:** CTH (conteo total de hemocitos), SOD (superóxido dismutasa), proPO (profenoloxidasa), WSSV (virus de la mancha blanca).

2.4.3 Vías de administración de inmunoestimulantes

Uno de los problemas más frecuentes referente al uso de inmunoestimulantes en el cultivo de camarón, es la elección de la vía de administración. La vía de administración de cepas probióticas e inmunoestimulantes es un factor importante, debido a que el método seleccionado determinará el éxito de los tratamientos en el incremento de la inmunidad y la protección contra patógenos (Selvaraj *et al.*, 2006;). Sin embargo, hay diversos aspectos que deben ser considerados previamente a la elección de una vía de administración de un inmunoestimulante, algunos de ellos corresponden al origen, organismo de estudio, etapa del desarrollo, entre otros. Es por ello por lo que establecer recomendaciones generales con respecto al uso de un inmunoestimulante resulta complejo (Azad *et al.*, 2005).

Algunas de las rutas de administración de inmunoestimulantes que han sido reportadas para organismos de cultivo son la vía oral (como aditivos dietarios), agregados directamente al agua

(inmersión) y por inyección intramuscular (Jahangiri y Ángeles-Esteban, 2018). La elección de cada una de las vías de administración presenta diversas ventajas y desventajas en la aplicación de los inmunoestimulantes. La administración de inmunoestimulantes por vía oral es el método más utilizado debido a la facilidad de incorporar los estimulantes en el alimento, representando un método de bajo costo, de fácil aplicación en diversos organismos y no genera estrés. Sin embargo, la administración oral presenta ciertas limitaciones, como es la administración durante etapas tempranas del desarrollo donde algunos organismos carecen de un sistema digestivo maduro o presentan un desarrollo incompleto del trato digestivo (i.e etapas larvarias de peces) (Selvaraj *et al.*, 2006).

Algunos autores reportan que la administración de inmunoestimulantes por inyección es la vía más eficaz, sin embargo, algunas de las limitaciones de este método son el alto costo, el manejo de los organismos durante la aplicación, lo que pueden generar una condición de estrés y la imposibilidad de su aplicación en etapas larvarias (Sakai, 1999). Contrariamente, la suplementación de inmunoestimulantes por inmersión es la vía de administración que es aplicable en todas las etapas de desarrollo de peces y crustáceos (Jahangiri y Ángeles-Esteban, 2018). La aplicación de inmunoestimulantes solubles en agua es un método ampliamente utilizado en estadios larvarios, donde se ha reportado que su aplicación incrementa la resistencia contra infecciones por patógenos (Sung *et al.*, 1994). Una desventaja de la aplicación de los inmunoestimulantes por vía de inmersión es el costo, esto se debe a que una cantidad considerable de los inmunoestimulantes aplicados permanece en el agua de cultivo y no es asimilada por el organismo, por lo que para garantizar una correcta inmunoestimulación se debe aplicar una mayor cantidad de los inmunoestimulantes. Para incrementar la efectividad en el uso de inmunoestimulantes, algunos autores recomiendan la administración de inmunoestimulantes por más de 1 vía, ya que se ha demostrado que incrementa la respuesta inmunitaria y la supervivencia en retos de infecciones bacterianas y virales (Sajeevan *et al.*, 2009; Jahangiri y Ángeles-Esteban, 2018).

3. JUSTIFICACIÓN

La enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda provoca altas mortalidades en el cultivo de camarón en estadios larvarios, causando grandes pérdidas económicas en la agroindustria acuícola. Los camarones penaeidos no cuentan con un sistema inmune de tipo adaptativo, por lo que la aplicación de vacunas para controlar las enfermedades infecciosas originadas por vibrios es poco factible. El uso de microorganismos con potencial inmunoestimulante como las levaduras *Y. lipolytica* y *D. hansenii* incrementarán la capacidad del sistema inmune y la resistencia contra *V. parahaemolyticus* en el camarón blanco del Pacífico *P. vannamei*.

4. HIPÓTESIS

Si se ha demostrado que la administración de levaduras en camarones puede estimular el sistema inmune e incrementar la resistencia a enfermedades infecciosas, entonces, la administración por vía oral e inmersión de las levaduras *Yarrowia lipolytica* (D1 y N6) y *Debaryomyces hansenii* (CBS8339) incrementará la respuesta del sistema inmune de camarones *Penaeus vannamei* y la resistencia contra la infección por *Vibrio parahaemolyticus*-IPNGS16 causante de la enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda (AHPND).

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de la administración de las levaduras *Y. lipolytica* (D1 y N6) y *D. hansenii* (CBS8339) sobre parámetros inmunológicos, expresión de genes relacionados al sistema inmune y resistencia contra la infección por *V. parahaemolyticus* IPNGS16-AHPND en el camarón blanco *P. vannamei*.

5.2 Objetivos particulares

1. Evaluar la respuesta inmune en postlarvas y juveniles de *P. vannamei* suplementados con las levaduras *Y. lipolytica* (D1 y N6) y *D. hansenii* (CBS8339).
2. Evaluar el efecto inmunoestimulante asociado a la vía y frecuencia de administración de levaduras en postlarvas de *Penaeus vannamei*.
3. Determinar la duración máxima del efecto de protección de levaduras en postlarvas de *Penaeus vannamei* infectadas con *Vibrio parahaemolyticus* IPNGS16-AHPND
4. Analizar la expresión de genes asociados a la respuesta inmunológica en juveniles y postlarvas de *Penaeus vannamei* infectados con *V. parahaemolyticus* IPNGS16-AHPND.
5. Determinar el efecto de los inmunoestimulantes en postlarvas de *P. vannamei* sobre la resistencia a la AHPND mediante una infección experimental con *V. parahaemolyticus* IPNGS16-AHPND.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Experimento I. Efecto inmunoestimulante de la levadura *Y. lipolytica* en *P. vannamei*

6.1.1 Cultivo de levadura

La levadura marina *Y. lipolytica* (cepas N6 y D1) fueron aisladas de la salinera (Exportadora de Sal, S.A. de C.V) en Guerrero Negro, Baja California Sur, México (Alamillo *et al.*, 2017). La levadura fue incubada en medio YPD (Sigma-Aldrich®, USA), suplementada con antibiótico (Cloranfenicol 0.05%) e incubada a 27°C (Lab-line, USA). La biomasa de la levadura fue cosechada del medio una vez que alcanzó su fase exponencial (24 h posteriores a su inoculación). Las células de levadura fueron centrifugadas (1000 g, 4°C por 10 min), separando el pellet mediante la decantación del medio de cultivo. La levadura obtenida se incorporó en dietas experimentales como se describe a continuación.

6.1.2 Elaboración de dietas experimentales

Se utilizó alimento comercial para camarones (Camaronina® 35% de proteína cruda, MO, USA) que fue pulverizado a 250 µm, por medio de un pulverizador electrónico. Posteriormente, las dos cepas de levaduras y un β-glucano (control interno) fueron incorporados al 1.1% al alimento comercial. Los β-glucanos fueron considerados como control positivo por dos razones: (1) la alta cantidad de glucanos de la pared celular de levaduras y (2) un amplio registro de estudios donde se ha demostrado el potente efecto inmunoestimulador de los β-glucanos, ofreciendo protección contra enfermedades infecciosas a peces y crustáceos (Meena *et al.*, 2013; Rodríguez *et al.*, 2020). El proceso de inclusión de la levadura en el alimento para camarón y su remanufactura fueron realizados a los métodos descritos por Reyes-Becerril *et al.* 2008. Brevemente, las dietas suplementadas con cepas de levaduras fueron elaboradas con levaduras vivas suspendidas en agua destilada y mezcladas con el alimento para tener una dosis corresponde al 1.1% de la dieta, como ha sido propuesto en estudios previos (Yang *et al.*, 2010; Jin *et al.*, 2018). De manera similar, dos glucanos comerciales fueron suspendidos en agua destilada y mezclados con el alimento comercial. Los alimentos fueron peletizados utilizando 4% de ácido algínico como aglutinante, seguido por un proceso de secado a 40°C por 24 h. Se realizó un recuento estándar de levaduras en placa posterior a la elaboración del alimento y previo al ensayo de estimulación, confirmando que el número de levaduras viables en el alimento correspondía a 1×10^6 UFC g⁻¹.

6.1.3 Condiciones de cultivo de camarón

En este estudio se utilizaron juveniles de camarón blanco *P. vannamei* (2.5 ± 0.5 g). Los organismos se mantuvieron en el Laboratorio de Nutrición Acuícola del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. (CIBNOR) en la Paz, Baja California Sur, México. Los organismos permanecieron en tanques de aclimatación con un sistema de recirculación con agua marina por dos semanas. Posteriormente, los camarones fueron trasladados a acuarios plásticos rectangulares de 60 L de capacidad, con 15 camarones por tanque. Los parámetros del agua de cultivo (27°C , salinidad 37 ups, oxígeno disuelto 6 mg L^{-1} ; pH 8.0) fueron mantenidos diariamente a lo largo del experimento. Los experimentos realizados durante este estudio fueron conducidos de acuerdo con la guía para el cuidado y uso de animales experimentales del consejo canadiense de cuidado animal (Consejo Canadiense de cuidado animal, 1989).

6.1.4 Diseño experimental

El experimento fue realizado bajo un esquema de diseño completamente aleatorizado, utilizando un total de 225 camarones. Los siguientes tratamientos fueron establecidos con 45 camarones por tratamiento con tres réplicas por tratamiento (15 camarones por tanque). (1) alimento comercial; (2) alimento comercial + levadura *Y. lipolytica* (YI-D1) cepa D1; (3) alimento comercial + *Y. lipolytica* (YI-N6) cepa N6; (4) alimento comercial + *Laminarina digitata* β -glucano (*Lm*- β); y (5) alimento comercial + β -glucano de *Saccharomyces cerevisiae* (*Sc*- β Macrogard®). Los camarones fueron alimentados diariamente con el 5% de su biomasa hasta el final del ensayo (21 días). Semanalmente se realizó un muestreo de hemolinfa (n=6 camarones por tratamiento). Para realizar la determinación de la expresión de genes, seis camarones por tratamiento fueron sacrificados semanalmente mediante la inmersión en nitrógeno líquido para obtener hemocitos directamente del corazón.

6.1.5 Muestreo y preparación de muestras

Un volumen de 150 μL de hemolinfa fue extraído de la base de los pleópodos del primer segmento abdominal usando una jeringa con 300 μL de solución anticoagulante (450 mM NaCl, 10 mM KCl, 10 mM EDTA-Na, 10 mM HEPES, pH 7.3) (Vargas-Albores *et al.*, 1993). Cuarenta microlitros de la hemolinfa diluida con anticoagulante fueron utilizados para determinar el número total de hemocitos bajo un microscopio usando una cámara de Neubauer. Posteriormente, la hemolinfa fue centrifugada ($3600 g$ a 4°C por 10 min), el plasma y el

sobrenadante con los hemocitos lisados (HLS) fueron colectados para determinar actividad bactericida, actividad inmune y antioxidante de diversas enzimas como lisozimas, peroxidasa, SOD y catalasa. Para cuantificar la expresión de genes relacionados con la inmunidad, se realizó una disección del corazón, se obtuvieron 100 mg de tejido que contiene hemocitos (Wang et al., 2007) que fue colocado en 1 ml de Trizol (Ambion, CA, USA) y almacenado a -80°C .

6.1.5.1 Cultivo de *Vibrio parahaemolyticus* y actividad bactericida del SHL contra *V. parahaemolyticus*

La bacteria *V. parahaemolyticus* IPNGS16 fue aislada de granjas de camarón durante un brote de la enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda (AHPND) en Guasave, Sinaloa, México en 2014 (López-león *et al.*, 2016). Brevemente, la bacteria fue cultivada en caldo de soja tripticaseína (TSB) (Difco, FR) al 2.5% de NaCl e incubado por un periodo de 18 h a una temperatura de 30°C . El medio de cultivo fue removido por centrifugación (7000 g por 10 min), y el pellet bacteriano fue suspendido en solución salina (2.5% NaCl) y ajustado a 1×10^8 UFC mL^{-1} para el ensayo de actividad bactericida.

La actividad bactericida fue cuantificada en el sobrenadante de hemocitos lisados (SHL) de acuerdo con el protocolo de Stevens *et al.* (1991) con algunas modificaciones. Brevemente, 20 μL de HLS (por triplicado) fueron agregados a una microplaca de 96 pozos de fondo cónico. Se añadió un extracto del cultivo de *V. parahaemolyticus* a las muestras de HLS (concentración final de *Vibrio* de 2×10^6 UFC mL^{-1}) y se incubaron a 25°C por 5 h. Se incluyeron controles negativos los cuales reemplazaron las muestras de HLS con solución salina de buffer de fosfatos (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, NaH_2PO_4 10 mM, KH_2PO_4 2 mM, a un pH de 7.4). Posteriormente, 25 μL de (MTT) bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (1mg mL^{-1} Merk mollipore, DE) fueron agregados a cada pocillo e incubados nuevamente a 25°C por 10 minutos. La microplaca fue centrifugada (2000 g por 10 min) y el sobrenadante fue desechado. El formazan precipitado fue disuelto mediante la adición de 200 μL de dimetil sulfóxido (DMSO, Fermont, Monterrey, MX). Finalmente, el contenido de cada placa fue transferido a una placa de 96 pozos y se midió la absorbancia a una longitud de onda 570 nm. La actividad bactericida fue calculada como la diferencia entre la observancia de las bacterias vivas y la absorbancia de los controles expresada como un porcentaje.

6.1.5.2 Parámetros inmunes y respuesta antioxidante

6.1.5.2.1 Conteo total de hemocitos (CTH)

Cuarenta microlitros de lisado de hemocitos fueron tomados y mezclados con 160 μL de solución fijadora de hemocitos (anticoagulante EDTA + 4% de formalina). Enseguida, 20 μL fueron colocados en un hematocitómetro, y el número total de hemocitos fue contado mediante la observación en un microscopio óptico.

6.1.5.2.2 Actividad de lisozima

La actividad de lisozima fue determinada de acuerdo con el método descrito por Alagappan et al. (2016). En una microplaca de 96 pozos, 10 μL de plasma fueron añadidos a 250 μL de suspensión bacteriana (solución de *Micrococcus luteus* 0.3% en PBS). La cuantificación de la actividad fue medida en un espectrofotómetro (Thermo-Scientific, MA, USA) mediante la reducción de la absorbancia a 490 nm cada 5 min bajo condición de incubación a 22°C. Una unidad de la actividad de lisozimas se determinó como la reducción de 0.001 por minuto en la absorbancia a 490 nm.

6.1.5.2.3 Actividad de superóxido dismutasa (SOD)

La actividad de la SOD fue medida en una microplaca de 96 pozos utilizando un kit para la determinación de SOD (Sigma-Aldrich, MO, USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La actividad de la SOD fue calculada mediante el porcentaje de inhibición de reacción de la enzima con el sustrato tetrazolio y la enzima xantina oxidasa. La actividad de la SOD fue cuantificada a una densidad óptica a 450 nm posterior a una incubación por un periodo de 20 min a 37°C. Las unidades de actividad de la enzima SOD fueron ajustadas mediante el porcentaje de inhibición y se expresan como el número de unidades por mg de proteína.

6.1.5.2.4 Actividad de catalasa (CAT)

La actividad de catalasa en plasma fue determinada por la medición de la disminución en la concentración de peróxido de hidrógeno a 240 nm, con un coeficiente de extinción de ($\epsilon=0.04 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) de acuerdo con el protocolo de Clairborne *et al.* (1985). La actividad de catalasa se expresó en el número de μmoles de sustrato convertido en producto por mg de proteína.

6.1.5.2.5 Actividad de peroxidasa

La actividad de peroxidasa fue cuantificada en microplaca de 96 pozos de acuerdo con el método descrito por Martin et al. (2012). Brevemente, se agregaron 20 μL de plasma y 50 μL de una solución de 0.15% H_2O_2 y 0.10% fenilendiamina en buffer de fosfatos (0.02 M NaHPO_2 , 0.02 M ácido cítrico) y se incubó la mezcla por 30 min a una temperatura de 25°C. Posteriormente, se agregó ácido sulfúrico (50 μL) para finalizar la reacción y se realizó una lectura en el espectrofotómetro a 492 nm. Una unidad de peroxidasa corresponde a la formación de 1 μmol 2,3 diaminofenacín por la oxidación de O-fenilendiamina por minuto. La actividad fue expresada como unidades por minuto.

6.1.5.3 Expresión de genes relevantes en la inmunidad

La expresión relativa de ARNm de genes con relevancia en el sistema inmune de camarón fue analizada utilizando la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real (qPCR) por el método de $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ (Livak y Schmittgen, 2001). El tejido de corazón de camarón fue utilizado para evaluar la expresión de genes asociados con el sistema inmune debido a que este es un tejido altamente vascularizado con una gran cantidad de hemocitos infiltrados (Wang et al., 2007). La extracción de RNA fue realizada siguiendo el protocolo del reactivo de Trizol con algunas modificaciones. Las muestras fueron lisadas con un homogeneizador mecánico (Virtis Company, USA). Posteriormente, se realizó una centrifugación de las muestras (12,000 g a 4°C por 10 min) para recuperar el ARN, se agregaron 300 μL de cloroformo y se centrifugaron las muestras nuevamente. Se eliminó el sobrenadante, se suspendió el pellet en 500 μL de 2-propanol y se centrifugaron nuevamente las muestras (12,000 g a 4°C por 10 min). El pellet obtenido fue lavado dos veces con etanol al 70% y secado por 20 min. Finalmente, el pellet fue suspendido en agua Mili-Q estéril. La concentración de ARN fue cuantificada, así como la relación de absorbancias a 260/280 nm, utilizando un espectrofotómetro de UV-VIS de barrido espectral (Bio-Rad, Singapur) y primers específicos, los cuales se muestran en la Tabla 3. La expresión relativa de los genes relacionados a la inmunidad fue calculada de acuerdo con el método $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$, usando el gen endógeno de β -actina. Los valores de la expresión en los genes indica la tasa de cambio en la expresión relativa de los grupos experimentales comparados con la expresión del grupo control, el cual fue utilizado como un calibrador.

Tabla 3. Secuencia de los primers empleados en el análisis de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR).

Gen	Abreviatura	# acceso Genbank	Secuencia del primer (5'-3')
Beta actina	β -actin	AF300705.2	5'-CACGAGACCACCTACAACCTCCATC-3' 5'-TCCTGCTTGCTGATCCACATCTG-3'
Penaetidina	Pen4	DQ211701	5'-GCCCGTTACCCAAACCATC-3' 5'-CCGTATCTGAAGCAGCAAAGTC-3'
Lisozima	Lyz	AY170126.2	5'-GAAGCGACTACGGCAAGAAC-3' 5'-AACCGTGAGACCAGCACTCT-3'
Profenoloxidasa	proFO	AY723296	5'-CGG TGA CAA AGT TCC TCT TC-3' 5'-GCA GGT CGC CGT AGT AAG-3'

6.2 Experimento II. Ruta de administración de inmunoestimulantes

En este bioensayo se evaluó la eficiencia de la ruta de administración de inmunoestimulantes sobre la resistencia en postlarvas de *P. vannamei* contra la infección de *V. parahaemolyticus* IPNGS16, el agente causal de AHPND (López-León *et al.*, 2016). Para ello, los inmunoestimulantes fueron administrados por dos rutas: en el alimento (oral) y disueltos en el agua (inmersión). Ocho grupos experimentales fueron asignados de la siguiente manera: (1) alimento comercial como control; (2) Glucanos 2% en alimento; (3) *D. hansenii* CBS8339 1% en alimento, *Dh*(O); (4) *Y. lipolytica* YI-N6 1% en alimento, *Yl*(O); (5) *D. hansenii* CBS8339 0.5% en alimento + *D. hansenii* CBS8339 1×10^6 CFU ml⁻¹ en agua, *Dh*(O+I); (6) *Y. lipolytica* YI-N6 0.5% en alimento + *Y. lipolytica* YI-N6 1×10^6 CFU ml⁻¹ en agua, *Yl*(O+I); (7) *D. hansenii* CBS8339 + *Y. lipolytica* YI-N6 (1%, proporción 1:1) en alimento, *Dh*+ *Yl*(O); (8) *D. hansenii* CBS8339 + *Y. lipolytica* YI-N6 (1%, proporción 1:1) en alimento + *D. hansenii* CBS8339 + *Y. lipolytica* YI-N6 (1×10^6) CFU ml⁻¹ en agua, proporción 1:1), *Dh*+ *Yl*(O+I).

Postlarvas de 50 mg se alimentaron diariamente (09:00 y 17:00) suministrando el 5% de alimento con respecto de la biomasa. El experimento fue realizado por 9 días, el final del experimento, muestras de 2 camarones por tanque (n=6 camarones por tratamiento) fueron tomadas para evaluar la expresión de genes inmunes. Los camarones fueron mantenidos en

hielo durante el muestreo y transferidos a tubos Eppendorf de 1.5 mL previamente llenados con RNA-later. Al final del experimento, el resto de los camarones fue sometido a una infección experimental con *V. parahaemolyticus* IPNGS16.

6.2.1 Expresión de genes del sistema inmune

La expresión relativa de ARNm de renes asociado a la inmunidad fue analizada utilizando la técnica de PCR en tiempo real (qPCR) por el método de $2^{-\Delta\Delta CT}$ descrito en el trabajo publicado por Livak y Schmittgen, (2001). En este estudio, el organismo completo fue requerido para realizar la extracción de ARN, debido a la limitada cantidad de tejido en las postlarvas. El RNA total fue extraído de las postlarvas usando Trizol, siguiendo el protocolo del fabricante. Se verificó la concentración y la calidad del ARN midiendo la relación en las absorbancias a 260 y 280 nm por espectrofotometría. La síntesis de ADN complementario (cDNA) fue realizado de acuerdo con el protocolo Improm II (Promega®), ajustando todas las muestras a una concentración de 1 mmol de ARN. Finalmente, las muestras de cDNA se almacenaron a -20°C. El análisis de qPCR determinó la expresión de siete genes seleccionados: penaeidina, profenoloxidasa, lisozima, catalasa, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y lectina. La expresión fue realizada con un equipo de detección de PCR en tiempo real (CFX96 Bio-Rad, Singapur), utilizando el reactivo Eva Green Sso-fast, y primers específicos. Los primers requeridos para llevar a cabo la amplificación de genes inmunes se presentan en la tabla 4. La expresión relativa de los genes asociados al sistema inmune fue calculada de acuerdo con el procedimiento de $2^{-\Delta\Delta CT}$, mediante el uso de la media geométrica de los genes endógenos más estables.

Tabla 4. Secuencia de primers utilizados en el análisis de qPCR en experimento II.

Primer	Gen	Secuencia	Referencia
S12	S12-F	GTGGAAGGAGACGTTGGTGT	Ventura-López <i>et al.</i> , 2016
	S12-R	AGAGCCTTGACCGCTTCAT	
Ubiquitina	UBI-F	GGGAAGACCATCACCCCTTG	Álvarez-Ruíz <i>et al.</i> , 2015
	UBI-R	TCAGACAGAGTGCGACCATC	
MnSOD	MnSOD_113F	ATTGGGTGAGGAACGAGGTG	Diseñados
	MnSOD_113R	GGTGATGCTTTGTGTGGTGG	
Penaeidina	Pen4-F	GCCCGTTACCCAAACCATC	Okumura <i>et al.</i> , 2007
	Pen4-R	CCGTATCTGAAGCAGCAAAGTC	
GPX	LvGPx_146F	AGAAAGAAGATAAGAGAAGACCCG	Diseñados
	LvGPx_146R	TGGTTGGCGGTTGGAATG	
Lisozima	Liso_212F	GAAGCGACTACGGCAAGAAC	Wang <i>et al.</i> , 2010
	Liso_212R	AACCGTGAGACCAGCACTCT	
Profenoloxidasa II	Propoll-F	GAGAGGCTGAACCGAGACTGA	Yeh <i>et al.</i> , 2009
	Propoll-R	AAGAAAACGGCCCCCAATT	
Lectina	LvLecC_156F	CAGGGAAAGTAGAAGGGCGAG	Diseñados
	LvLecC_156R	CAACAAAGGTCACGAACAAGAGG	
Catalasa	LvCatal_161F	ACTGTAGGAGGTGAGAGTGG	Diseñados
	LvCatal_161R	TGCGTGTGAATGAAGGATGG	

6.2.2 Concentración letal media (CL₅₀)

La determinación de la concentración letal (CL₅₀) fue realizada en postlarvas de camarón libres de patógenos. Diez organismos fueron transferidos a unidades experimentales de vidrio con capacidad de 3 L de agua. El bioensayo fue conducido bajo las siguientes condiciones: 30°C, 30 ups de salinidad y pH de 8. Cuatro grupos experimentales fueron establecidos en los cuales diferentes concentraciones de *V. parahaemolyticus* IPNGS16-AHPND fueron inoculadas (10,000, 100,000, 500, 000, y 1,000,000 de UFC ml⁻¹). De manera similar, un grupo control (camarones no infectados) fue considerado. La mortalidad fue monitoreada y registrada durante 72 h. Una inspección visual cada 12 h fue realizada para detectar organismos muertos y removerlos de las unidades experimentales. Los datos obtenidos fueron analizados siguiendo el método descrito por Finney (1952), mediante un modelo Probit para obtener la concentración letal.

6.2.3 Infección con *V. parahaemolyticus* IPNGS16

La infección experimental fue realizada de acuerdo con los datos obtenidos del ensayo de CL₅₀, correspondientes a la concentración de 90,000 UFC ml⁻¹ de *V. parahaemolyticus* IPNGS16. Para la infección experimental, la bacteria fue cultivada como se describió previamente. El cultivo bacteriano fue ajustado a un valor de 1 a una densidad óptica de 480 nm (equivalente a 1.6 x 10⁷ UFC ml⁻¹). Posteriormente, el cultivo bacteriano fue diluido en solución salina (2.5% de NaCl) para ajustar la concentración. El periodo de infección se mantuvo por 72 h, registrando la mortalidad continuamente en cada de las unidades experimentales.

6.3 Experimento III. Frecuencia de administración de los inmunoestimulantes

Basado en los datos obtenidos del experimento II, el tratamiento correspondiente a la mezcla de levaduras administrada por dos rutas (Yl + Dh (O + I)) fue seleccionado para este experimento. Se utilizaron postlarvas (PL 25) de *P. vannamei* con un peso aproximado de 80 mg y libres de patógenos. Las condiciones de cultivo se mantuvieron al igual que en el experimento II. Las postlarvas fueron divididas en cuatro grupos, cada uno alimentado a diferentes intervalos (frecuencias): diariamente (F1), cada dos días (F2), cada tres días (F3), y un cuarto tratamiento con camarones alimentados con una dieta comercial como control negativo. Transcurrido el periodo de estimulación, todos los grupos fueron sometidos a un reto de infección con *V. parahaemolyticus* IPNGS16. El porcentaje de supervivencia de los animales en cada grupo experimental fue registrado durante 72 h.

6.4 Experimento IV. Efecto de duración de la protección de levaduras

Se utilizaron postlarvas de camarón libres de patógenos de aproximadamente 100 mg bajo las mismas condiciones de cultivo que en los experimentos anteriores. Los camarones fueron aleatoriamente repartidos en tres grupos con 12 camarones por acuario, con tres réplicas por tratamiento. El periodo experimental tuvo una duración de 9 días, donde de administraron diariamente las levaduras. Al final del periodo experimental, un reto de infección con *V. parahaemolyticus* IPNGS16 fue realizado. Los grupos experimentales fueron asignados de acuerdo con el tiempo (días) en que se realizó la infección: 1, 4 y 7 días posteriores a la inmunoestimulación. Durante la infección todos los grupos fueron alimentados con dieta comercial. El periodo de infección tuvo una duración de 72 h, registrando la mortalidad a lo largo del reto infeccioso.

6.5 Análisis estadísticos

En el presente estudio los datos obtenidos se analizaron con el programa STATISTICA (V. 6.0). Se verificó el cumplimiento en los supuestos de normalidad (prueba Shapiro-Wilk) y homocedasticidad (Levene). Para determinar las diferencias significativas se realizó un análisis de varianza unifactorial (ANDEVA). En las variables donde se obtuvieron valores de significancia estadística, se realizó un análisis de comparación de medias individuales (Tukey's HSD). En todos los análisis que se realizaron, el valor de significancia establecido fue de $p < 0.05$.

7. RESULTADOS

7.1 Experimento I. Efecto inmunoestimulante de la levadura *Y. lipolytica* en *P. vannamei*.

7.1.1 Lisado de hemocitos de camarones suplementados con *Y. lipolytica* presentan actividad bactericida contra *V. parahaemolyticus*.

Los camarones estimulados con la levadura *Y. lipolytica* y glucanos comerciales presentaron actividad bactericida contra *V. parahaemolyticus* en los sobrenadantes de lisado de hemocitos (Fig. 4). Una actividad significativamente más alta ($p < 0.05$) (44%) fue observada en los grupos *YI-N6* y *Sc-β* comparados con el grupo control (17%) en la semana 1. En la semana 2, la actividad bactericida en HLS fue más alta en todos los grupos en comparación con el grupo control; sin embargo, las diferencias significativas sólo fueron observadas en los dos grupos de camarones estimulados con glucanos comerciales comparados con el grupo control. Al final del experimento (semana 3), el grupo *YI-D1* permaneció con una alta actividad bactericida con respecto a los otros grupos experimentales y al grupo control. La mayor actividad bactericida durante el experimento fue observada durante la primera semana, la cual representó una actividad 2.6 veces más alta en los grupos *YI-N6* y *Sc-β* comparado con el grupo control.

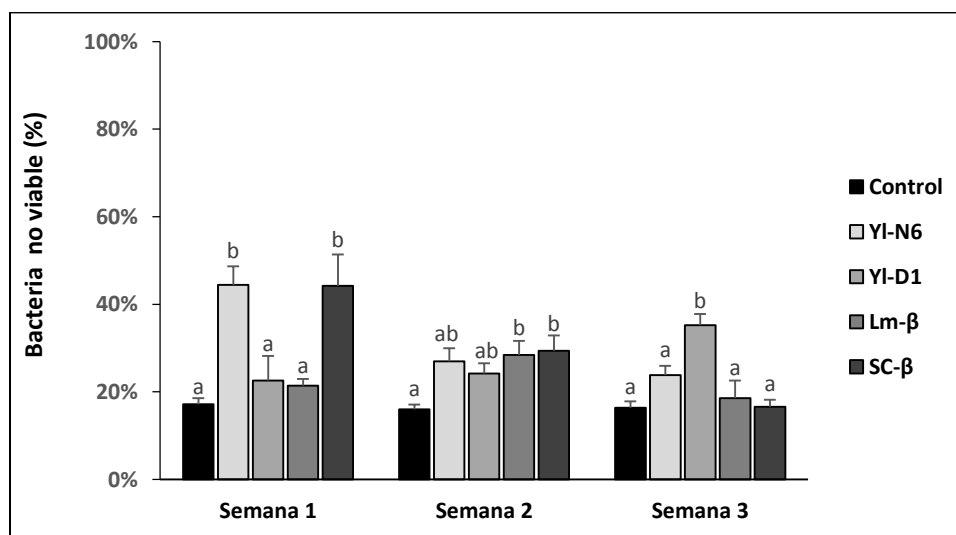


Figura 4. Actividad bactericida en sobrenadante de hemocitos lisados de *P. vannamei* (SHL) alimentado con diferentes inmunoestimulantes dietarios por tres semanas. Los valores se muestran como media \pm error estándar. Las letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre tratamientos.

7.1.2 *Yarrowia lipolytica* N6 incrementó el conteo de hemocitos en camarón

La administración de inmunoestimulantes mostró un efecto positivo sobre el conteo de hemocitos (CTH) (Fig. 5). Después de una semana de estimulación, los camarones alimentados

con dietas que contenían *YI-N6*, *YI-D1* y *Lm-β* presentaron un incremento significativo en el CTH ($p < 0.05$) comparado con el grupo control. Sin embargo, sólo los camarones alimentados con *YI-N6* mostraron un efecto sostenido con respecto del tiempo comparado con el grupo control, presentando 2.1, 1.6 y 2.1 veces mayor CTH durante la semana uno, dos y tres, respectivamente.

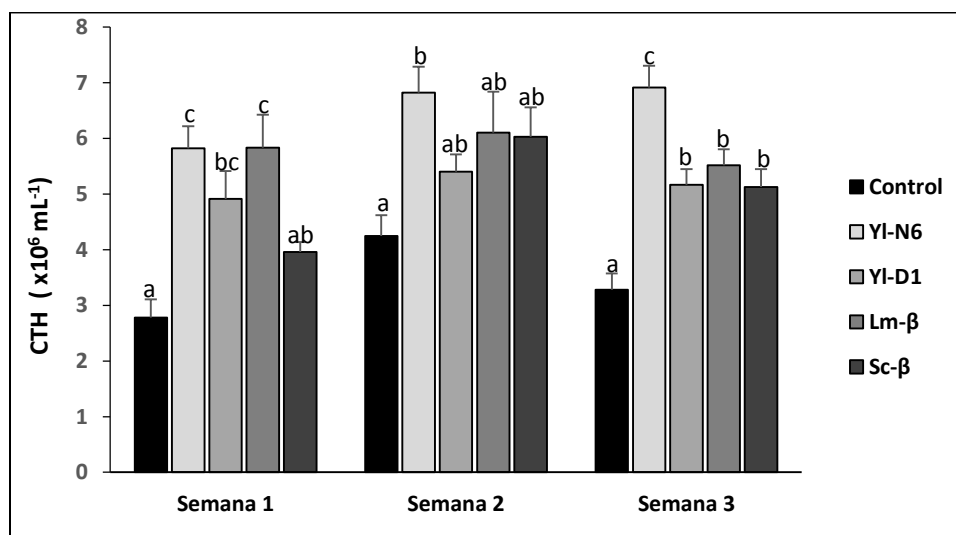


Figura 5. Conteo total de hemocitos (CTH) de *Penaeus vannamei* alimentado con diferentes inmunostimulantes dietarios por tres semanas. Los valores se muestran como media \pm error estándar. Las letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre tratamientos.

7.1.3 *Yarrowia lipolytica* y β -glucanos incrementaron la actividad de lisozima

La actividad de lisozimas en el lisado de hemocitos en los grupos experimentales de manera general fue significativamente ($p < 0.05$) más alto en todos los tiempos de muestreo comparado con el grupo control (Fig. 6). La mayor actividad de lisozima fue observada en el grupo *Lm-β*, para las semanas uno y dos, mas no para n la semana tres, donde la actividad de lisozimas fue similar entre los grupos experimentales.

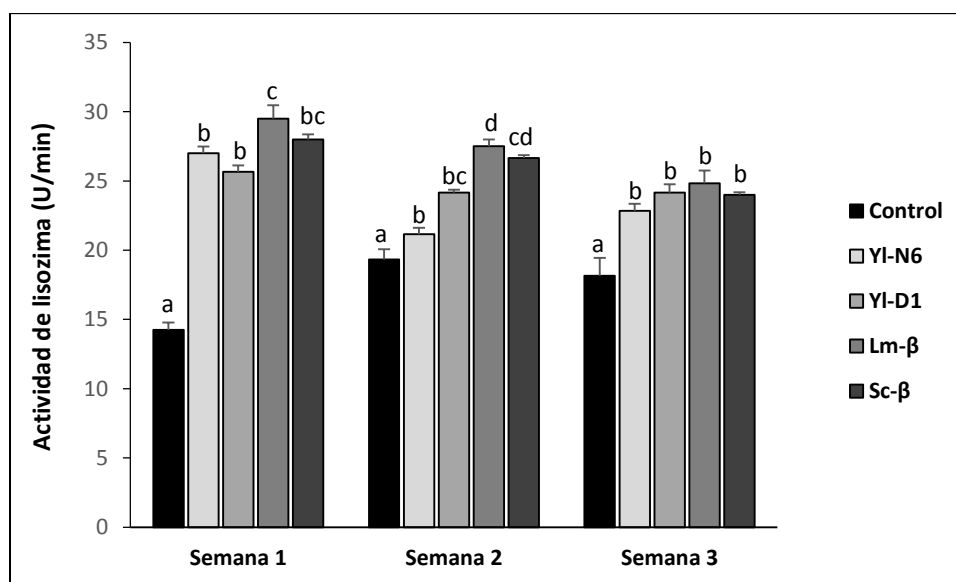


Figura 6. Actividad de lisozima en sobrenadante de hemocitos lisados de *P. vannamei* (SHL) alimentado con diferentes inmunoestimulantes dietarios por tres semanas. Los valores se muestran como media \pm error estándar. Las letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre tratamientos.

7.1.4 *Yarrowia lipolytica* y β -glucanos estimularon la actividad enzimática de la superóxido dismutasa

El nivel de actividad de la SOD fue significativamente mayor ($p < 0.05$) en los grupos de camarones alimentados con la levadura *Y. lipolytica* y β -glucanos comparados con el grupo control durante la semana 2 y 3 (Fig. 7). En la semana uno, la actividad de SOD fue 2.2 veces más alta ($p < 0.05$) en camarones alimentados con YI-N6 comparados con el grupo control. En las semanas dos y tres, la actividad de SOD en todos los grupos experimentales (YI-N6, YI-D1, Lm- β y Sc- β) fue en promedio 2 veces más alta ($p < 0.05$) que en el grupo control.

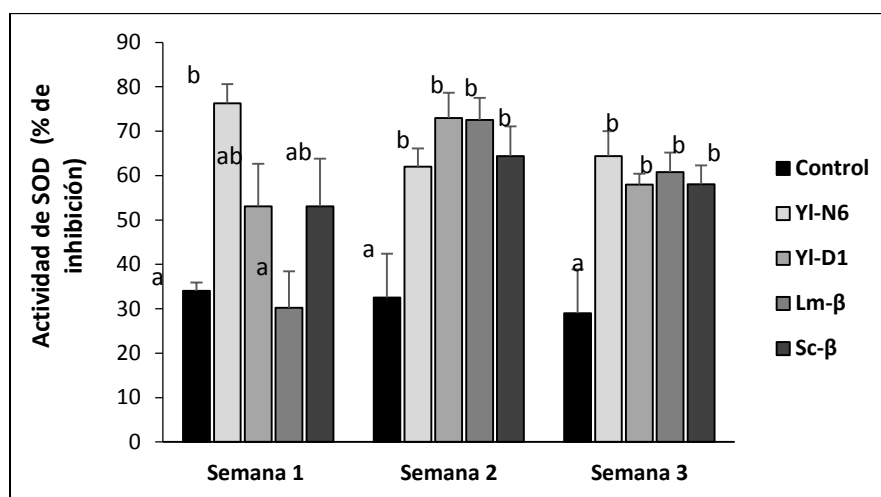


Figura 7. Actividad de SOD en plasma de *P. vannamei* alimentado con diferentes inmunoestimulantes dietarios por tres semanas. Los valores se muestran como media \pm error estándar. Las letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre tratamientos.

7.1.5 Actividades de catalasa (CAT) y peroxidasa fueron a corto plazo incrementadas por la levadura *Y. lipolytica*

La actividad de catalasa fue significativamente ($p < 0.05$) afectada solo en las semanas 1 y 2 por algunos tratamientos experimentales. La actividad de CAT fue mayor en los grupos alimentados con la levadura *Y. lipolytica* (YI-N6 y YI-D1) en la semana 1 y en el grupo YI-D1 en la semana 2 comparado con el grupo control (Fig. 8).

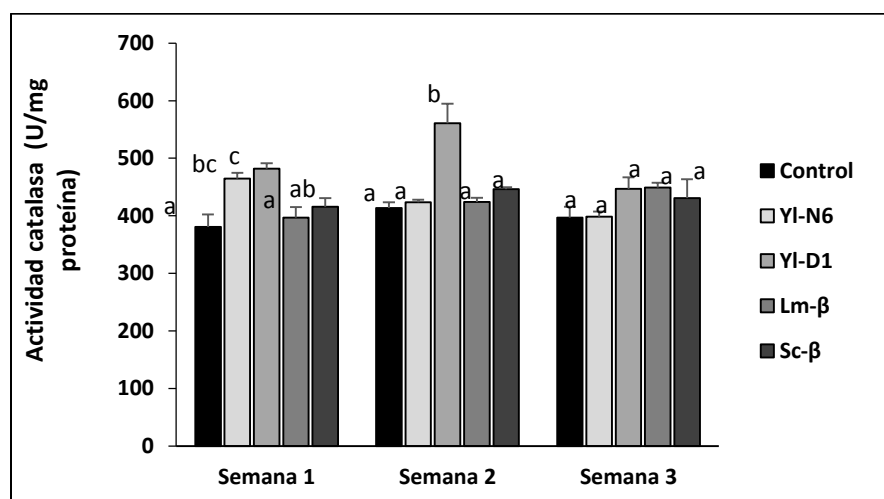


Figura 8. Actividad de catalasa (CAT) en plasma de *P. vannamei* alimentado con diferentes inmunoestimulantes dietarios por tres semanas. Los valores se muestran como media \pm error estándar. Las letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre tratamientos.

La actividad de la enzima peroxidasa resultó significativamente más elevada ($p < 0.05$) solo en el grupo YI-N6 que en el grupo control durante la semana 1 (Fig. 9). En contraste, en la semana 3, la actividad de peroxidasa fue significativamente ($p < 0.05$) mayor solo en el grupo Lm- β comparado con el grupo control.

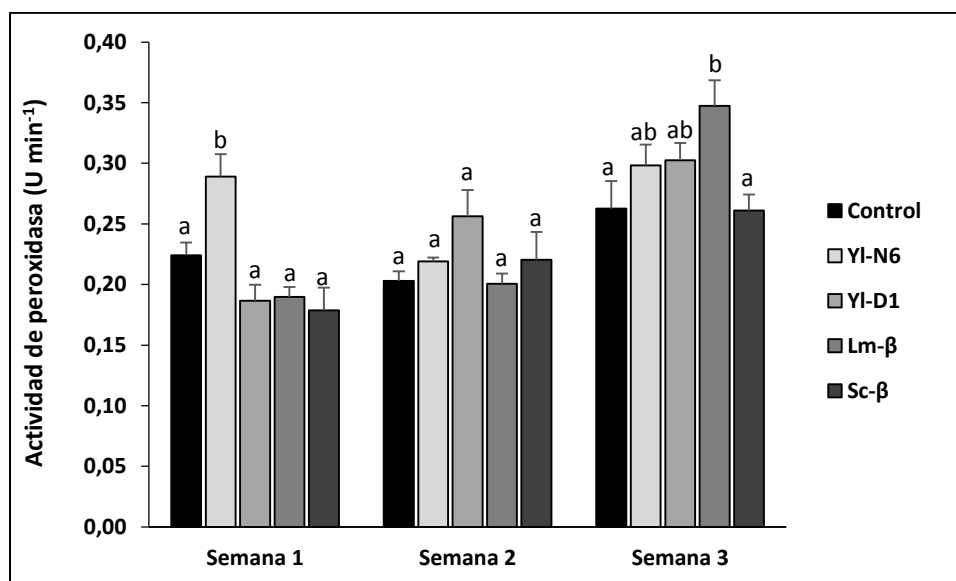


Figura 9. Actividad de peroxidasa en plasma de *P. vannamei* alimentado con diferentes inmunoestimulantes dietarios por tres semanas. Los valores se muestran como media \pm error estándar. Las letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre tratamientos.

7.1.6 *Yarrowia lipolytica* sobre reguló la expresión de genes relacionados a inmunidad después de dos semanas de administración oral.

Para explorar la actividad inmunomoduladora de la levadura *Y. lipolytica*, este estudio analizó la respuesta inmune a través de la expresión de genes en hemocitos de camarón. Diferencias significativas ($p < 0.05$) en la expresión de profenoloxidasa (proFO) en los grupos experimentales (excepto Sc- β) se observaron en comparación con el grupo control en las semanas uno y dos (Fig. 10), mostrando una alta expresión para el grupo YI-N6. En la tercera semana, la expresión del gen proFO disminuyó en todos los grupos experimentales.

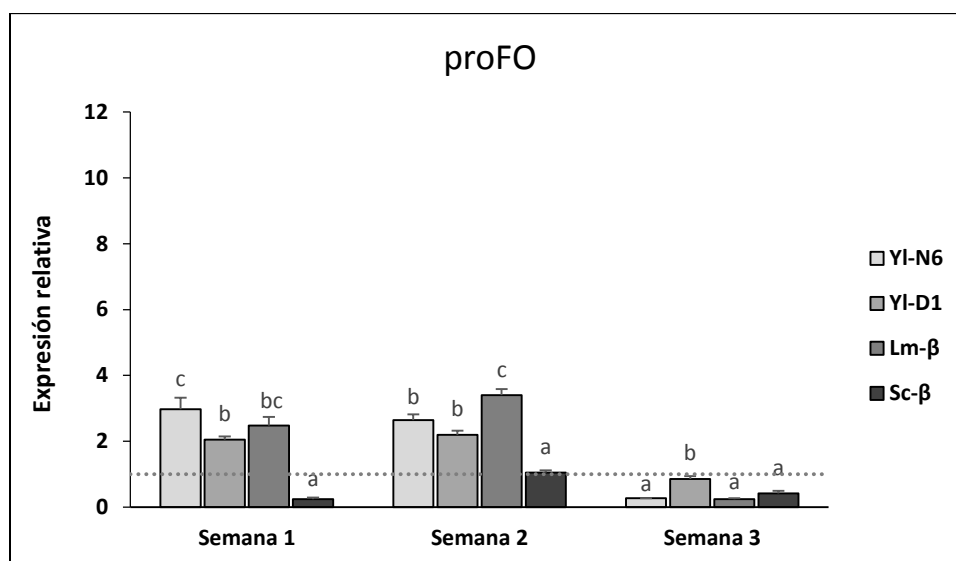


Figura 10. Expresión relativa ARNm del gen de profenoloxidasas (proFO) en hemocitos de *P. vannamei* alimentados con diferentes dietas con inmunoestimulantes durante tres semanas. La línea punteada indica el expresión del grupo control (calibrador). Los datos representan la tasa de cambio en la expresión relativa de los tratamientos experimentales comparados con el control. Los valores se muestran como media \pm error estándar. Las letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre tratamientos.

Un aumento en la expresión del gen de penaeidina (PEN4) se presentó en hemocitos durante la semana uno y dos (Fig. 11). En la semana uno, los grupos experimentales *YI-D1* y *Lm-β* presentaron un incremento significativo en los niveles de expresión del gen PEN4 ($p < 0.05$) en comparación del resto de los grupos. En la semana dos, la expresión del gen PEN4 incrementó significativamente en los grupos estimulados con la levadura *Y. lipolytica* (*YI-N6* y *YI-D1*), observando la mayor expresión de este gen (9.1-veces mayor) en el grupo *YI-D1* comparado con el grupo control.

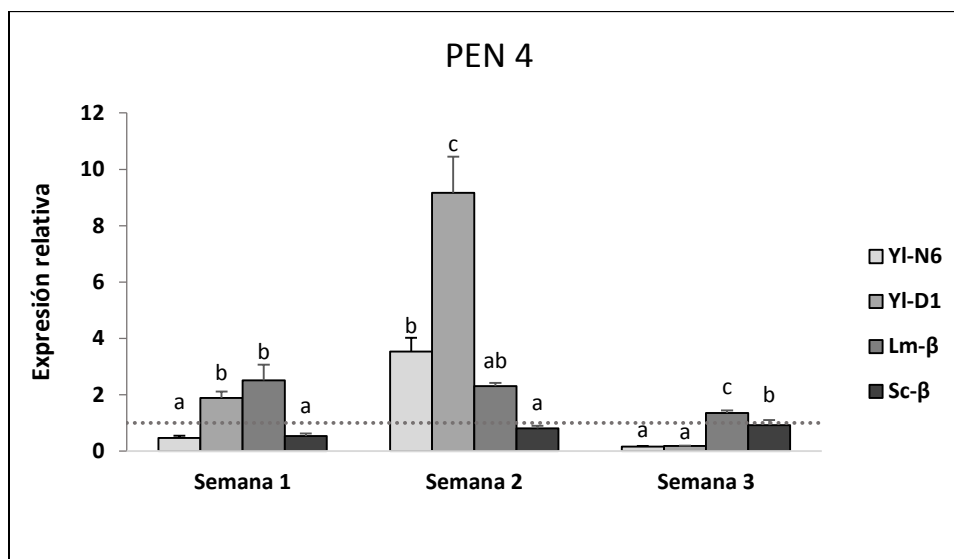


Figura 11. Expresión relativa ARNm del gen de penaeidina (PEN4) en hemocitos de *P. vannamei* alimentados con diferentes dietas con inmunoestimulantes durante tres semanas. La línea punteada indica el expresión del grupo control (calibrador). Los datos representan la tasa de cambio en la expresión relativa de los tratamientos experimentales comparados con el control. Los valores se muestran como media \pm error estándar. Las letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre tratamientos.

En la semana dos, la expresión de lisozima presentó un aumento significativo ($p < 0.05$) fue observado en los grupos tratados con la levadura *Y. lipolytica* (YI-N6 y YI-D1), encontrando la mayor expresión de lisozima (7.2-veces mayor) en el tratamiento YI-N6 (Fig. 12) en relación con el grupo control. Por otra parte, una baja expresión relativa del gen de lisozima se observó en las semanas uno y tres.

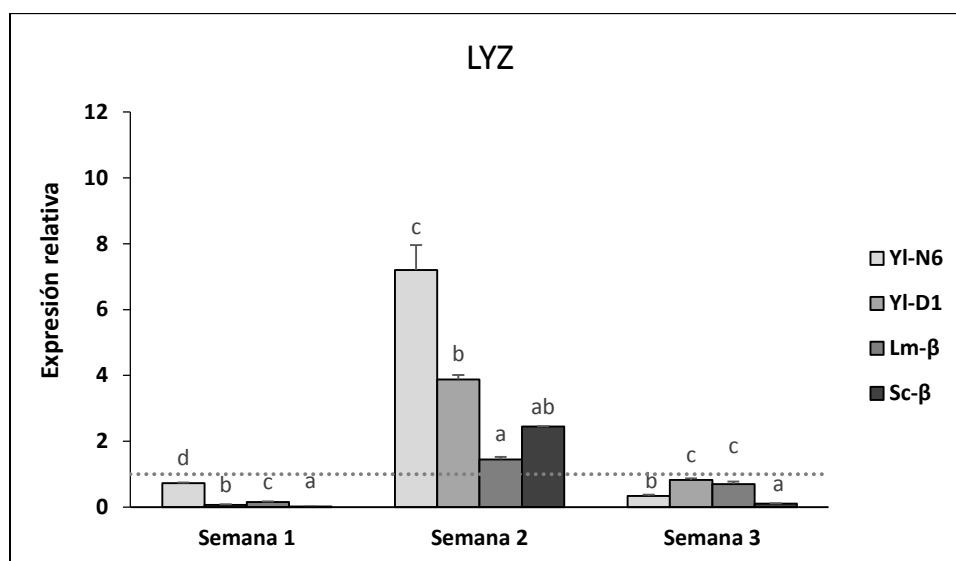


Figura 12. Expresión relativa ARNm del gen de lisozima (LYZ) en hemocitos de *P. vannamei* alimentados con diferentes dietas con inmunoestimulantes durante tres semanas. La línea punteada indica la expresión del grupo control (calibrador). Los datos representan la tasa de cambio en la expresión relativa de los tratamientos experimentales comparados con el control. Los valores se muestran como media \pm error estándar. Las letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre tratamientos.

7.2 Experimento II. Ruta de administración de inmunoestimulantes

7.2.1 Incremento en peso

El crecimiento en los camarones durante el periodo de administración de inmunoestimulantes se observa en la tabla 5. Diferencias significativas ($p < 0.05$) en el incremento en peso entre los grupos experimentales (camarones estimulados) y el grupo control fueron observadas. Los camarones que recibieron una mezcla de levaduras por vía oral e inmersión mostraron el incremento en peso más alto, comparado en el resto de los grupos experimentales y el control.

Tabla 5. Crecimiento en postlarvas de *P. vannamei* alimentadas con dietas individuales o combinadas de levaduras por dos diferentes rutas.

Tratamientos	Peso inicial (mg)	Peso final (mg)	Incremento en peso (mg)
Control	48.3	85.2 ± 2 ^a	36.9 ± 2 ^a
Glucano	53.1	98.7 ± 6 ^b	45.6 ± 6 ^c
<i>Dh</i> - O	49.3	112.5 ± 3 ^c	63.2 ± 3 ^d
<i>Yl</i> - O	52.9	114.1 ± 2 ^c	61.2 ± 2 ^d
<i>Dh</i> (O + I)	54.2	95.0 ± 2 ^b	40.8 ± 2 ^{ab}
<i>Yl</i> (O + I)	51.9	97.1 ± 7 ^b	45.2 ± 7 ^{bc}
<i>Dh</i> + <i>Yl</i> (O)	48.8	120.8 ± 1 ^{cd}	72.0 ± 1 ^e
<i>Dh</i> + <i>Yl</i> (O + I)	49.6	127.5 ± 5 ^d	77.9 ± 5 ^f

Nota: Los valores se muestran como media y error estándar. Letras diferentes revelan diferencias significativas ($p < 0.05$) con respecto del grupo control (camarones no estimulados). *Dh*= *Debaryomyces hansenii*, *Yl*= *Yarrowia lipolytica*, O=vía oral, I= vía inmersión.

7.2.2 Expresión de genes asociados a la inmunidad en *P. vannamei*

No se observaron diferencias significativas de los diferentes tratamientos con respecto al grupo control para la expresión de Los resultados mostraron que después de nueve días de estimulación, un aumento significativo en la expresión del gen de penaeidina (PEN4) ($p < 0.05$) se observó en las postlarvas que recibieron por vía oral la levadura *Y. lipolytica* (*Yl*-O) y la mezcla de levaduras (*Yl* + *Dh*) comparados con el grupo control (Fig. 13). La expresión de lectinas fue significativamente más elevada en camarones estimulados oralmente por la administración individual de las levaduras *Y. lipolytica* (*Yl*) y *D. hansenii* (*Dh*) y la mezcla de levaduras (*Yl* + *Dh*) (Fig. 14). No se observaron diferencias significativas en la expresión de los genes lisozima, superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa (Tabla 6).

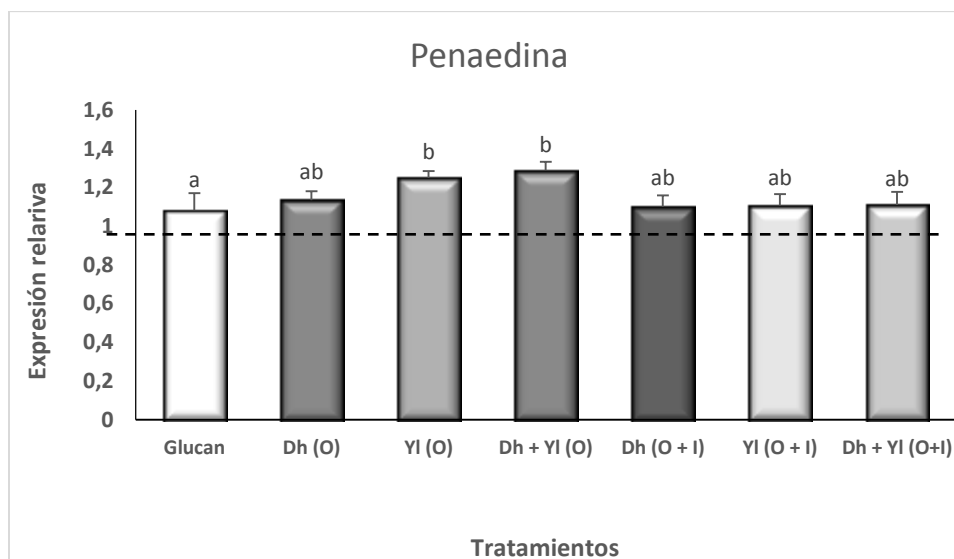


Figura 13. Expresión relativa de ARNm del gen de penaedina en postlarvas de *P. vannamei* expuestas a diferentes inmunoestimulantes dietarios. Dh= *Debaryomyces hansenii*, Yl= *Yarrowia lipolytica*, O=vía oral, I= vía inmersión. Los valores se muestran como media \pm error estándar. Las letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre tratamientos.

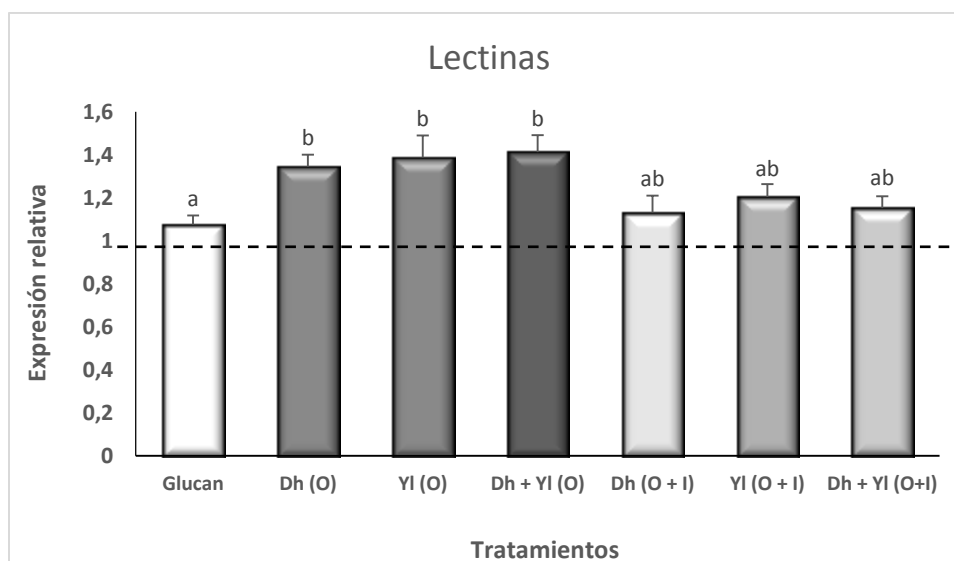


Figura 14. Expresión relativa de ARNm del gen de lectinas en postlarvas de *P. vannamei* expuestas a diferentes inmunoestimulantes dietarios. Dh= *Debaryomyces hansenii*, Yl= *Yarrowia lipolytica*, O=vía oral, I= vía inmersión. Los valores se muestran como media \pm error estándar. Las letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre tratamientos.

Tabla 6. Niveles de la expresión relativa de genes asociado a la inmunidad de camarones.

Tratamientos	Lisozima	SOD	Catalasa	Peroxidasa	Significancia
Control	1.0 ± 0.19	0.95 ± 0.1	0.88 ± 0.14	0.81 ± 0.2	NS
Glucanos	1.2 ± 0.06	0.93 ± 0.07	1.04 ± 0.07	0.92 ± 0.13	NS
<i>Dh</i> - O	1.0 ± 0.19	0.96 ± 0.07	1.02 ± 0.07	1.01 ± 0.05	NS
<i>Yl</i> - O	1.0 ± 0.21	0.98 ± 0.05	0.87 ± 0.06	1.09 ± 0.09	NS
<i>Dh</i> (O + I)	0.9 ± 0.16	0.94 ± 0.06	0.94 ± 0.03	1.07 ± 0.05	NS
<i>Yl</i> (O + I)	0.8 ± 0.15	1.04 ± 0.03	1.02 ± 0.03	1.1 ± 0.12	NS
<i>Dh</i> + <i>Yl</i> (O)	1.1 ± 0.13	1.08 ± 0.04	1.09 ± 0.04	0.93 ± 0.15	NS
<i>Dh</i> + <i>Yl</i> (O + I)	1.1 ± 0.14	1.13 ± 0.03	1.13 ± 0.05	1.12 ± 0.10	NS

Nota: Los datos mostrados en la tabla se muestran como media ± error estándar. NS= diferencias significativas no observadas con respecto del grupo control (camarones no estimulados). *Dh*= *Debaryomyces hansenii*, *Yl*= *Yarrowia lipolytica*, O=vía oral, I= vía inmersión.

7.2.3 La ruta de administración de los inmunoestimulantes influencia la supervivencia de postlarvas infectadas con *V. parahaemolyticus* IPNGS16.

Durante el periodo de inmunoestimulación no se registró mortalidad en ninguno de los tratamientos previo al reto de infección con *V. parahaemolyticus*. En general, se observó un incremento significativo en la supervivencia (1.3 a-2.1 veces) en camarones inmunoestimulados comparado con el grupo control en el cual la supervivencia de las postlarvas sometidas a un reto de infección con *V. parahaemolyticus* fue del 43% (Fig. 15). La administración individual combinada de levaduras por vía oral incrementó la supervivencia a un promedio de 67% aunque la diferencia no fue significativa en comparación con el control. En contraste, la administración individual de levaduras por dos vías (oral e inmersión) incrementó la supervivencia a un promedio 89% ($P < 0.05$). La mayor supervivencia, con un 93% ($P < 0.05$) fue observada en el grupo de camarones donde se administró la mezcla de levaduras por vía oral e inmersión (Fig. 15). Finalmente, la administración de glucanos incrementó la supervivencia a un 74% ($P < 0.05$).

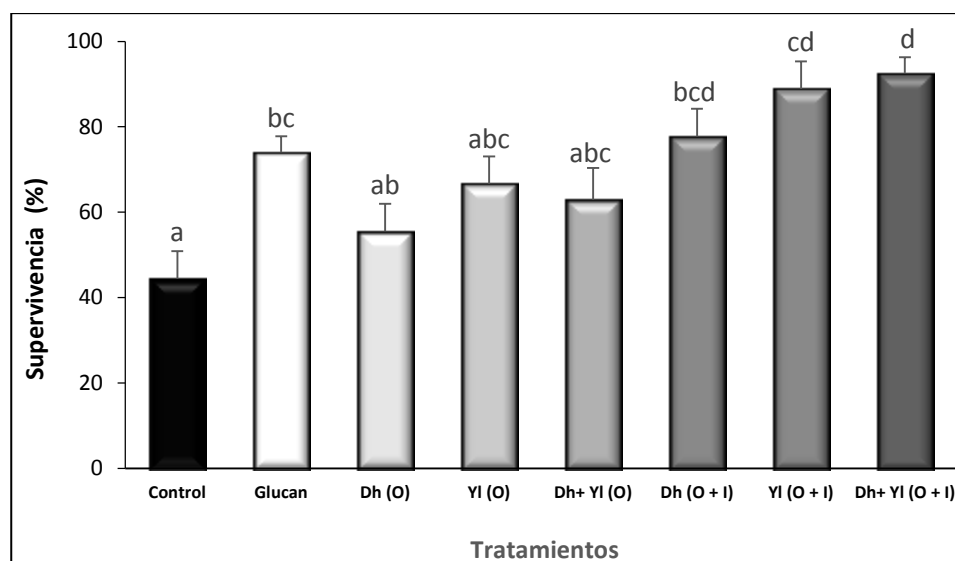


Figura 15. Efecto de la ruta de administración de inmunoestimulantes en la supervivencia de postlarvas de *P. vannamei* retadas con *V. parahaemolyticus* IPNGS16. Dh= *Debaryomyces hansenii*, Yl= *Yarrowia lipolytica*, O= vía oral, I= vía inmersión. Los valores se muestran como media \pm error estándar. Las letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre tratamientos.

7.3 La aplicación de frecuencias de administración de inmunoestimulantes afectó la supervivencia ante una infección con *V. parahaemolyticus*.

La combinación de levaduras suplementadas en el alimento y en el agua administradas diariamente por nueve días, incrementó la supervivencia a un 87% en postlarvas de *P. vannamei* en un reto de infección con *V. parahaemolyticus* IPNGS16, comparado con el grupo control que sólo presentó un supervivencia de 53% ante el reto de infección con *V. parahaemolyticus* (Fig. 16). Diferencias significativas ($p < 0.05$) fueron observadas entre los tratamientos correspondientes a la frecuencia de administración diaria (F1) y cada tres días (F3) con respecto del grupo control.

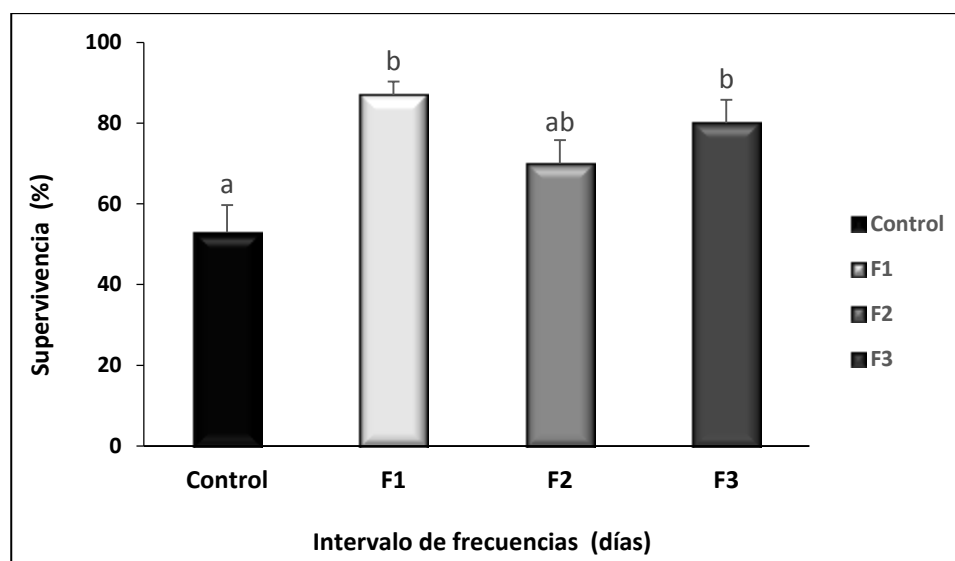


Figura 16. Supervivencia posterior al reto de infección con *V. parahaemolyticus* IPNGS16 en postlarvas de *P. vannamei* después de aplicar diferentes frecuencias con una mezcla de levaduras por dos vías de administración (oral e inmersión). F1= alimentados diariamente, F2= alimentados cada dos días y F3 alimentados cada tres días. Los valores se muestran como media \pm error estándar. Las letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre tratamientos.

7.4 Duración del efecto protector de levaduras en camarón contra una infección con *V. parahaemolyticus*.

Una pérdida progresiva de la resistencia a enfermedades con respecto del periodo entre la finalización del tratamiento y el reto fue observada en camarones estimulados por vía oral e inmersión con una mezcla de levaduras (*Yl + Dh*), con una disminución del 91 al 77% en postlarvas retadas uno o siete días posteriores al periodo de estimulación con levaduras, respectivamente. Sin embargo, la supervivencia en todos los casos fue significativamente ($P < 0.05$) mayor comparado con la del grupo control que sólo fue del 55% (Fig. 17).

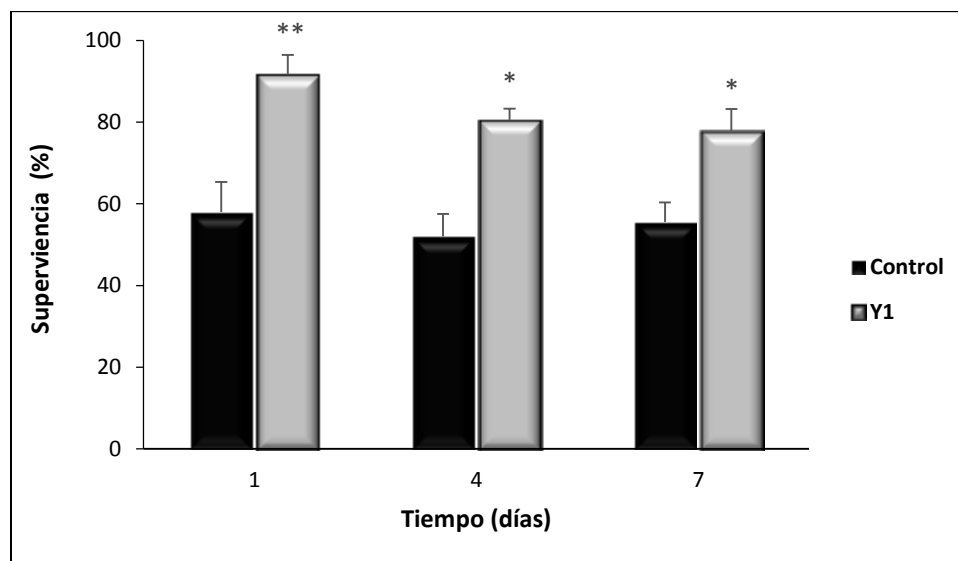


Figura 17. Duración del efecto protector de levaduras administradas en postlarvas de *P. vannamei* retadas con *V. parahaemolyticus* IPNGS16. Los valores son expresados como media \pm error estándar. * indica diferencias significativas ($p < 0.05$), ** indican diferencias altamente significativas ($p < 0.01$).

8. DISCUSIÓN

La administración de inmunoestimulantes para potenciar la respuesta inmune innata y la protección contra enfermedades infecciosas es uno de los objetivos buscados en acuicultura (Nayak *et al.*, 2010; Sivagnanavelmurugan *et al.*, 2014; Soowannayan *et al.*, 2019). Entre los microorganismos, algunas levaduras han demostrado tener efectos inmunoestimulatorios en crustáceos (Burgents *et al.*, 2004; Babu *et al.*, 2013; Nimrat *et al.*, 2011), los cuales se ha relacionado al contenido de glucanos localizados en la pared celular (Ringø *et al.*, 2012). Las levaduras incrementan la respuesta inmune principalmente debido a la interacción entre los componentes de la pared célula (glucanos) y la inmunocompetencia de las células a través del reconocimiento mediante patrones moleculares asociados a los microorganismos (MAMPs) (Silveira *et al.*, 2018). Además, las levaduras producen diversas moléculas, como son los aminoácidos, enzimas, vitaminas, lípidos y nucleótidos, los cuales, en conjunto con los glucanos, ejercen efectos inmunoestimulatorios (Hassan, 2011). Adicionalmente, la administración de probióticos vivos promueven la salud en el hospedero, incrementan la protección contra agentes patógenos, mejoran los parámetros de calidad del medio de cultivo y aumentan el uso de nutrientes (Nimrat *et al.*, 2011).

La administración de levaduras muertas (principalmente por calor) conserva el contenido de glucanos y algunos metabolitos, sin embargo, carecen de actividad probiótica (Shurson, 2018). En camarones peneidos, diversos reportes han demostrado los efectos de la de la administración oral de levaduras y glucanos, destacando un incremento en la respuesta humoral (producción de péptidos antimicrobianos, lisozima y lectinas) y celular (actividad fagocítica, estallido respiratorio. y número de hemocitos) (Sajeevan *et al.*, 2009; Babu *et al.*, 2013; Campa-Córdova *et al.*, 2002; Suphantharika *et al.*, 2003; Rodríguez *et al.*, 2007; Wilson *et al.*, 2015; Miandare *et al.*, 2017).

8.1 Efecto inmunoestimulante de la levadura *Y. lipolytica* en *P. vannamei*

La actividad bactericida en hemolinfa es considerada un parámetro de la defensa inmune contra patógenos, la cual es atribuida a componentes antimicrobianos, incluyendo péptidos antimicrobianos y lisozimas, entre otros, los cuales pueden ser incrementados por la acción de inmunoestimulantes (Jørgensen *et al.*, 1993; Sritunyalucksana *et al.*, 1999; Haug *et al.*, 2002; Ang y Lal, 2019; Kizheva *et al.*, 2019). En el presente trabajo, la acción bactericida contra *V.*

parahaemolyticus en el lisado de hemocitos de camarones inmunoestimulados fue más alto (21-44%) que en camarones no estimulados del grupo control; la mayor actividad bactericida se observó en los grupos YI-6 y Sc-β en la semana uno, seguido por glucanos comerciales en la semana dos, y por el grupo YI-N6 en la semana tres. De manera similar, Sritunyalucksana *et al.* (2005), reportaron una disminución en el del número de bacterias (*V. harveyi*) en la hemolinfa de juveniles de *P. monodon* estimulados con el 2-4% de un extracto de la levadura *S. cerevisiae* administrado por vía de inyección. Contrariamente, Li *et al.* (2009), no observaron diferencias significativas en la actividad bactericida contra *V. harveyi* en *L. vannamei* estimulados con el 2 y 5% de la levadura *S. cerevisiae* durante 10 semanas. De manera similar, Scholz *et al.* (1999), evaluaron la suplementación dietaria del 1% de las levaduras *S. cerevisiae* y *Phaffia rhodozyma* en el alimento por 7 semanas, sin encontrar diferencias significativas en la eliminación de *V. harveyi* en la hemolinfa de *P. vannamei*. Por otra parte, se ha reportado que la administración dietaria de glucanos en el camarón *P. vannamei* incrementa la respuesta bactericida contra *Vibrio harveyi* y resistencia a infección con *V. parahaemolyticus* (Scholz *et al.*, 1999; Burgents *et al.*, 2004). Los resultados obtenidos en el presente estudio demuestran la capacidad de *Y. lipolytica* para eliminar patógenos, incrementando la actividad de diversos parámetros inmunes, así como la actividad bactericida en la hemolinfa, lo cual demuestra el potencial de esta levadura en la protección contra bacterias patógenas.

Los hemocitos desempeñan funciones inmunes, como son la eliminación de patógenos por vía de la fagocitosis, encapsulamiento, producción de péptidos antimicrobianos, lisozimas y la activación de la cascada de profenoloxidasa (Jiravanichpaisal *et al.*, 2007; Tassanakajon *et al.*, 2018). Por lo tanto, el conteo total de hemocitos ha sido considerado con un indicador confiable del estado inmunológico en crustáceos (Ji *et al.*, 2009). En este estudio, *P. vannamei* mostró un incremento en el CTH cuando se administraron inmunoestimulantes en el alimento, principalmente la cepa N6 de la levadura *Y. lipolytica* (YI-N6). En este sentido, Sarlin y Philip (2011), encontraron un alto CTH en *Fenneropenaeus indicus* alimentado con las levaduras *D. hansenii* y *Candida tropicalis*; resultados similares fueron reportados por Bubu *et al.* (2013), en *Penaeus monodon* alimentado con la levadura *Candida aquatortoris*. De manera similar, un incremento en el CTH en camarones ha sido asociado con la administración de glucanos (Sajeevan *et al.*, 2009; Bai *et al.*, 2014; Wongsasak *et al.*, 2015). No obstante, mayores efectos

inmunoestimuladores han sido reportados con la administración dietaria de levaduras vivas en comparación del uso de glucanos purificados, lo cual concuerda con el estudio realizado por Sajeevan *et al.* (2009) y Sajeevan *et al.* (2006), señalan que los efectos inmunoestimuladores de la levadura *Candida sake* (cepa S165) puede ser atribuida no sólo a la concentración de glucanos, sino también al contenido de nucleótidos, como son los oligonucleótidos (CpG), así como diversos componentes celulares presentes en las levaduras (Chuo *et al.*, 2005).

Las lisozimas son proteínas bacteriolíticas que desempeñan una función en la respuesta inmune no específica contra la invasión de bacterias patógenas. Estas enzimas hidrolizan los componentes estructurales como la pared celular de bacterias, principalmente enlaces glucosídicos β -1-4 de peptidoglicanos (Hikima *et al.*, 2003; Aguirre-Guzmán *et al.*, 2009; Qiao *et al.*, 2013). En este estudio, la actividad de lisozimas incrementó en la hemolinfa de camarones estimulados. Principalmente en aquellos alimentados con laminarina (grupo *Lm*- β) después de una semana de administración. Otros estudios en camarones alimentados con la levadura *S. cerevisiae*, laminarina y glucanos presentaron un aumento en la actividad de lisozima (Biswas *et al.*, 2012; Bai *et al.*, 2014; Yao *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2012); contrariamente, Wongsasak *et al.* (2015) no encontraron diferencias significativas en la actividad de lisozima en *P. vannamei* estimulados mediante la administración dietaria de glucanos.

La fagocitosis es un mecanismo relacionado con la liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS), las cuales pueden causar daño celular (Aguirre-Guzmán *et al.*, 2009). En consecuencia, los crustáceos producen enzimas antioxidantes para prevenir y reparar daños causados por ROS (Zelick *et al.*, 2005; Fridovich, 1995). La enzima SOD cataliza la dismutación del anión superóxido en compuestos menos reactivos como son oxígeno molecular y peróxido de hidrógeno (Fridovich, 1995; Campa-Córdova *et al.*, 2002). En el presente estudio se observó un incremento significativo en la actividad de SOD en la hemolinfa de camarones estimulados, encontrando la mayor actividad de SOD en el grupo alimentado con la levadura *Y. lipolytica* (grupo *Yl*-N6) durante la primera semana de administración. Estudios previos demuestran que la inclusión dietaria de las levaduras (*R. paludigenum* y *S. cerevisiae*) en *P. vannamei* incrementaron la respuesta antioxidante (Yang *et al.*, 2010; Afsharnasab *et al.*, 2016). Con respecto a la administración de β -glucanos de levaduras, camarones de *P. vannamei* estimulados por vía oral (dieta) o por inmersión, incrementaron la actividad de SOD en el suero (Hassan, 2011; Sajeevan

et al., 2009). De manera similar, las enzimas catalasa y peroxidasa catalizan la liberación de peróxido de hidrógeno. En el presente trabajo de investigación, la actividad de ambas enzimas aumentó en camarones alimentados con la levadura *Y. lipolytica*, principalmente en la primera semana de administración. Estos resultados concuerdan con aquellos reportados por Yang *et al.* (2010) en el cual camarones de *P. vannamei* alimentados con la levadura *R. paludigenum* incrementó las actividades de catalasa y peroxidasa en suero. De manera similar, Pacheco *et al.* (2012) registraron que la administración oral de la levadura *D. hansenii* en *P. vannamei* incrementó la actividad de la enzima catalasa en el suero de camarón.

En el presente estudio los niveles de expresión de los genes profenoloxidasa (proFO), lisozima (LYZ) y penaeidina (PEN4) fueron sobre regulados en hemocitos de camarón por efecto de la administración de inmunoestimulantes. La activación del sistema de profenoloxidasa desempeña una función relevante en la inmunidad innata de crustáceos, especialmente en la defensa contra patógenos (Cerenius *et al.*, 2008). En el presente estudio, los niveles de expresión del gen proFO se sobre expresaron en camarones estimulados con la levadura *Y. lipolytica*. En este sentido, Jin *et al.* (2018) observaron una disminución en la expresión del gen proFO en el intestino de *P. vannamei* suplementados con hidrolizados de la levadura *S. cerevisiae*. De manera similar, Babu *et al.* (2013) observaron una disminución de la expresión de proFO en hemolinfa de *P. monodon* estimulados por vía oral con alimentados con un nivel de inclusión del 10% de la levadura *C. aquatextoris*. Este hecho pudiera indicar que un alto nivel de levadura viva en la dieta puede suprimir la respuesta inmune en camarones. Con respecto al uso de β -glucanos, en este estudio, una alta expresión del gen de proFO se observó en camarones alimentados con laminarina (grupo Lm- β), confirmando que el sistema de profenoloxidasa en crustáceos puede ser activado por β -glucanos (Cerenius y Söderhäll, 2004; Wilson *et al.*, 2015; Miandare *et al.*, 2017).

Las penaeidinas (PEN) son péptidos antimicrobianos (AMPs) que presentan fuerte actividad antimicrobiana y son sintetizados en los hemocitos (Destoumieux *et al.*, 2000; Muñoz *et al.*, 2000; Tassanakajon *et al.*, 2018; Gyan *et al.*, 2020). En el presente estudio se observó una sobreexpresión del gen PEN4 en camarones que recibieron dietas con la levadura *Y. lipolytica* (cepas N6 y D1). En concordancia con nuestros resultados, Biswas *et al.* (2012) reportaron que la expresión del gen de penaeidina fue sobre regulada en el órgano linfoide de *M. japonicus*

alimentado con dietas con un nivel de inclusión del 5% de la levadura *S. cerevisiae*. En otro estudio, Babu *et al.* (2013) encontraron que dos genes de penaeidina (Pen3 y Pen5) fueron sobre regulados en hemocitos de *P. monodon* alimentados con el 10% de la levadura *C. aquatextoris*. En contraste, la inclusión dietaria de glucanos comerciales (Macrogard®) disminuyeron los niveles de expresión en hemocitos de *P. vannamei*. Asimismo, el gen PEN3 fue subexpresado en hemocitos de *P. vannamei* alimentados con glucanos en un nivel de inclusión de 0.2 y 1%. Como se reportó previamente, los efectos de los glucanos sobre la expresión de genes inmunes en camarón dependen del origen de la levadura y la estructura química de sus glucanos (Wilson *et al.*, 2015).

Las lisozimas exhiben actividad lítica contra bacterias patógenas (Yao *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2012). La expresión del gen de lisozima en este estudio fue fuertemente inhibida por la administración del 1% de la levadura *Y. lipolytica* (cepas D1 y N6) y glucanos en el alimento. En comparación, la expresión de enzimas lisozimales incrementó en *M. japonicus*, pero no en *P. vannamei* cuando ambas especies fueron alimentadas con la levadura *S. cerevisiae* (Biswas *et al.*, 2012; Jin *et al.*, 2018). De manera similar, Wang *et al.* (2008) mostraron que la inclusión dietaria de glucanos sobre reguló la expresión del gen de lisozima en hemocitos de *P. vannamei*, un efecto que posteriormente confirmado en *P. vannamei* alimentado con glucanos de *S. cerevisiae* (Miandare *et al.*, 2017).

Los resultados obtenidos en el presente estudio demuestran la habilidad *Y. lipolytica* para activar la respuesta inmune innata mediante el incremento de componentes celulares y humorales en *P. vannamei*, lo cual revela el potencial de esta levadura marina y de sus β -glucanos para ser empleados como inmunoestimulantes en el cultivo de camarón.

8.2 Experimento II. Efecto de la ruta de administración de inmunoestimulantes

8.2.1 Crecimiento

Un incremento en el crecimiento asociado con el uso de inmunoestimulantes es una de las metas perseguida por investigadores en la agroindustria acuícola (Wang *et al.*, 2017). En este estudio, una máxima ganancia en peso (1.72 veces) fue registrada en el grupo de postlarvas de *P. vannamei* estimuladas con las levaduras *Y. lipolytica* y *D. hansenii* por vía oral e inmersión. Yang *et al.* (2010), administraron una levadura viva *R. paludigenum* (1×10^8 UFC g^{-1}) y seca (1 g

100 g⁻¹) en la dieta de *P. vannamei*, mostrando un incremento en peso más alto en camarones alimentados con levaduras comparadas con el control. Nimrat *et al.* (2019) obtuvieron un mayor peso final y ganancia en peso en juveniles de *P. vannamei* estimulados por vía oral por 90 días con una combinación de las levaduras *D. hansenii* y *Rhodotorula* sp. comparado con el grupo control. En un estudio similar, Apún-Molina *et al.* (2015) evaluaron la administración dietaria de cuatro cepas de bacterias ácido lácticas y una cepa de levadura (*Candida papsilosis*) a una concentración de 5×10^5 UFC g⁻¹, encontrando mayor crecimiento en organismos suplementados con probióticos comparados con camarones del grupo control.

Saccharomyces cerevisiae y *Debaryomyces hansenii* son consideradas dos de las levaduras más estudiadas en organismos marinos, las cuales han demostrado que su administración puede incrementar las propiedades antimicrobianas, inmunoestimulantes y probióticas. Sin embargo, recientemente el uso de la levadura *Yarrowia lipolytica* ha ganado atención por sus aplicaciones como aditivo alimenticio en animales (Hatlen *et al.*, 2012; Berge *et al.*, 2013). Se tiene reporte que la levadura *Y. lipolytica* presenta propiedades nutricionales y probióticas, las cuales han sido descritas en diversos grupos animales como mamíferos, aves, peces, crustáceos y moluscos. De manera general, animales alimentados con *Y. lipolytica* incrementaron parámetros productivos e inmunológicos, así como resistencia a enfermedades (Guardiola *et al.*, 2021).

8.2.2 Expresión de genes relacionados con la inmunidad en camarones

En este estudio, la expresión de genes relacionados con la inmunidad fue evaluado en postlarvas de camarón debido al uso de cepas probióticas de levaduras que han sido ampliamente evaluadas en especies de crustáceos por su habilidad para estimular el sistema inmune (Sajeevan *et al.*, 2009; Biswas *et al.*, 2012). Sin embargo, la mayor parte de los estudios han sido realizados en estadios de juveniles y adultos. A la fecha, escasa información se encuentra disponible referente al sistema inmune en etapas larvarias de invertebrados marinos de interés comercial (Muñoz *et al.*, 2003; Jiravanichpaisal *et al.*, 2007). Uno de los problemas para estudiar el sistema inmune en estadios larvarios y postlarvarios es la tamaño del cuerpo, lo que dificulta obtener una cantidad considerable de tejido (principalmente hemocitos) para el desarrollo de ensayos inmunológicos. Por otra parte, resulta complicado asumir que los organismos en etapas larvarias exhiban la misma respuesta que organismos en etapa de juveniles o adultos, o que la expresión de proteínas asociadas en la respuesta inmune ocurra en

el mismo grado (Smith *et al.*, 2003). Existen un gran número de enfermedades que afectan preferencialmente a larvas y postlarvas, con tasas de mortalidad que pueden alcanzar el 100% (Martín *et al.*, 2012). Desde un punto de vista inmunológico, larvas y postlarvas de camarones representan casos especiales, y su susceptibilidad puede ser relacionada con su inmunocompetencia.

Como ya se mencionó, los péptidos antimicrobianos (AMPs) forman parte del sistema inmune innato y desempeñando una función crítica en la protección de crustáceos contra patógenos (Wang *et al.*, 2014), lo cual aplica también a etapas larvarias tal como lo indican los resultados del presente estudio y de otros trabajos. Así, la expresión del gen de penaeidina reveló que la administración oral de las levaduras *Y. lipolytica* y *D. hansenii* incrementaron la expresión de este péptido antimicrobiano en postlarvas de *P. vannamei*. En este sentido, un incremento en la expresión de péptidos antimicrobianos ha sido reportada en camarones estimulados con levaduras, un ejemplo es el trabajo realizado por Babu *et al.* (2013) donde se reportó un aumento de expresión en crustinas (crustin-1, crustin-2 y crustin-3) y penaeidinas (penaeidin-3 y penaeidin-5) en postlarvas de *P. monodon* alimentados con dietas suplementadas con 10% de la levadura *Candida aquatextoris*. De manera similar, Jin *et al.* (2018) reportaron una sobreexpresión del gen de penaeidina en *P. vannamei* estimulados por vía oral con el 1% de la levadura *S. cerevisiae*. Del mismo modo, Miandare *et al.* (2016) reportaron una mayor expresión del gen de penaeidina en camarones alimentados con el probiótico comercial PrimaLac® (1g kg⁻¹) comparado con el grupo control. Diversos autores han concluido que la administración de más de una cepa probiótica potencializa la expresión de péptidos antimicrobianos en camarón (Antony *et al.*, 2011; Pham *et al.*, 2014).

Las lectinas son moléculas asociadas con la respuesta antimicrobiana en crustáceos. Además, las lectinas realizan funciones de aglutinación, reconocimiento de carbohidratos específicos de la superficie de patógenos y la activación del sistema del complemento (en vertebrados) (Endo *et al.*, 2006). En el presente estudio, se observó la mayor expresión de lectinas en los tratamientos donde se administraron levaduras (individuales o en combinación) por vía oral a postlarvas con respecto del control. Ji *et al.* (2009) evaluaron el nivel de expresión de lectinas en juveniles de *P. vannamei* inyectados vía intramuscular con diversos inmunoestimulantes, registrando la mayor expresión de lectinas en hemocitos de camarones estimulados con laminarina en comparación

de otros grupos experimentales y el control. Chai *et al.* (2016) observaron que la suplementación de *Bacillus* sp. en altas concentraciones (1×10^7 y 1×10^9 UFC ml^{-1}), incrementó los niveles de expresión de lectinas tipo C en hemocitos de *P. vannamei*. De manera similar, Miao *et al.* (2020) reportaron un incremento en la expresión del gen de lectinas en juveniles de *Macrobrachium rosenbergii* estimulados con 1×10^8 UFC g^{-1} de una mezcla de bacterias ácido lácticas y la levadura *S. cerevisiae* por 60 días.

8.2.3 Efecto de la ruta de administración de inmunoestimulantes en la supervivencia de postlarvas infectadas con *V. parahaemolyticus* IPNGS16.

Un incremento en el efecto protector en postlarvas estimuladas con levaduras y glucanos es en diversas especies de camarones peneidos ha sido previamente demostrado (Scholz *et al.*, 1999; Burgents *et al.*, 2004; Sarlin y Philip, 2011). En este estudio, la administración de una mezcla de levaduras por vía oral e inmersión incrementó la supervivencia ante un reto de infección con *V. parahaemolyticus* IPNGS16. En acuerdo con estos resultados, algunos estudios reportaron que la combinación de probióticos ofrece mejores resultados en animales acuáticos que cuando se utiliza una sola especie (Lin *et al.*, 2017). Por ejemplo, Flores-Miranda *et al.* (2011) reportaron que la combinación de cuatro cepas de bacterias ácido lácticas (Lta2, Lta6, Lta8 y Lta10) y una cepa de levadura (Lt6) en *P. vannamei*, administradas por vía oral incrementan la respuesta inmune y la supervivencia ante un reto de infección con *V. sinaloensis*. De manera similar, Wang *et al.* (2019) encontraron que múltiples cepas de probióticos confieren mayor protección que la administración de una sola cepa. Los autores también observaron que la administración oral de cuatro cepas de bacterias ácido lácticas y la levadura *S. cerevisiae* (1×10^8 UFC kg^{-1}) por 64 días incrementa la supervivencia en un reto de infección con *V. alginolyticus* en *P. vannamei*.

La administración oral de levaduras ofrece efectos benéficos como son la liberación de enzimas digestivas, biosíntesis de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, producción de poliaminas, colonización del tracto digestivo e inmunoestimulación (Burgents *et al.*, 2004; Shurson *et al.*, 2018). La exclusión competitiva contra bacterias patógenas es uno de los modos de acción en probióticos, reemplazando con microorganismos benéficos en el tracto digestivo, contribuyendo al incremento en parámetros zootécnicos y supervivencia de los organismos (Balcazar *et al.*, 2006; Vargas-Albores *et al.*, 2017). Por otra parte, la incorporación de microorganismos probióticos, como bacterias y levaduras en el agua de cultivo, promueve la

inhibición de formación de biofilm de algunos patógenos debido a la producción de metabolitos secundarios con propiedades antibacterianas (Sha *et al.*, 2016). Por lo tanto, la mezcla tanto de diferentes probióticos como la combinación de vías de administración en el cultivo de camarón puede ser asociada con un posible efecto sinérgico, incrementando así la tasa de supervivencia tal como se observó en el presente estudio.

8.3 Frecuencia de administración de inmunoestimulantes

Parámetros relacionados con el uso de inmunoestimulantes, como son la dosis y la frecuencia de administración, son aspectos relevantes para lograr una correcta activación del sistema inmune (Sajeevan *et al.*, 2006; Jahangiri y Ángeles-Esteban, 2018). En este estudio, la supervivencia al reto infeccioso con *V. parahaemolyticus* IPNGS16 entre los grupos experimentales fue afectada por la aplicación de frecuencias de administración de inmunoestimulantes, obteniendo la mayor supervivencia en el grupo de camarones alimentados diariamente (F1) con las levaduras (*Yl + Dh*) por vía oral e inmersión. Sajeevan *et al.* (2009) encontraron que la administración de glucanos a diferentes intervalos de alimentación en camarón incrementa la respuesta inmune y la supervivencia a un reto viral como WSSV. Curiosamente, los autores demostraron que la suplementación del 0.2% de β -glucanos administrados cada siete días durante 21 días proporciona la mayor supervivencia ante un reto viral. En otro estudio, Babu *et al.* (2013) evaluaron la administración oral del 10% de la levadura *C. aquatextoris* en *P. monodon* a diferentes frecuencias de administración, obteniendo la mayor supervivencia ante una infección con WSSV en el grupo de camarones alimentados con una frecuencia de cada siete días. De manera similar, Flores-Miranda *et al.* (2011) evaluaron la administración oral de cepas probióticas de bacterias ácido lácticas (BAL) y levaduras, estableciendo tres diferentes frecuencias de administración (1,3 y 6 días) por 21 días. Estos autores reportaron un incremento en la supervivencia a un reto de infección con *V. sinaloensis* en juveniles de *P. vannamei* alimentados con la dieta experimental con una frecuencia de cada tres días.

Diversos autores han reportado que la continua y prolongada administración (mayor a 30 días) de inmunoestimulantes a través de diversas rutas de estimulación proporciona una baja protección contra patógenos (Chang *et al.*, 2000; Sajeevan *et al.*, 2009). En contraste, en este estudio, la administración diaria de inmunoestimulantes por un periodo experimental corto (9

días) presentó la mayor supervivencia en el reto de infección con *V. parahaemolyticus*. En general, para lograr una correcta estimulación del sistema de defensa y una máxima protección contra patógenos, es necesario establecer estrategias en el uso de inmunoestimulantes en el cultivo de camarón, como son la aplicación de frecuencias de administración, periodos de aplicación cortos, así como pequeñas dosis (Sajeevan *et al.*, 2009; Bai *et al.*, 2010; Meena *et al.*, 2013; Srivatava y Pandey, 2015). La implementación de estas acciones en el uso de inmunoestimulantes permitirá evitar problemas de inmunosupresión y fatiga inmunológica en el cultivo de organismos marinos (Sajeevan *et al.*, 2006; Sajeevan *et al.*, 2009).

8.4 La administración de levaduras confiere una protección extensa contra *V. parahaemolyticus*

La adición de levaduras y glucanos en el cultivo incrementa la respuesta del sistema de defensa en el camarón y la supervivencia a diversos patógenos (Sarlin y Philip, 2011; Bai *et al.*, 2014; Jin *et al.*, 2018). Sin embargo, la mayoría de los estudios en los que se han realizado retos de infección tienen una duración máxima de 72 h, dificultando el establecer el máximo tiempo de protección conseguido posterior a la aplicación de un inmunoestimulante. El resultado obtenido en este estudio revela una pérdida gradual en el efecto protector en postlarvas con respecto del tiempo, obteniendo una máxima protección (77%) a los siete días posteriores a la estimulación con una mezcla de levaduras (*Yl + Dh*) administradas por vía oral y por inmersión. De manera similar, Pooljun *et al.* (2020) evaluaron en *P. vannamei* la administración oral de una mezcla de la bacteria (*L. acidophilus*) y una levadura (*S. cerevisiae*), encontrando una alta supervivencia en un reto de infección con *V. parahaemolyticus*. Los autores reportaron que el efecto protector de la mezcla de cepas probióticas fue evaluado diez días posteriores a la estimulación, con una supervivencia mayor al 90%. Estudios similares realizados en *P. vannamei* indican que la administración oral de bacterias probióticas incrementa la supervivencia a infecciones con *Vibrio*. En este sentido, Zokaeifar *et al.* (2014) reportaron que la estimulación con el probiótico *Bacillus subtilis* administrado por vía de inmersión incrementa la supervivencia en camarones retados con *V. harveyi*, con una protección del 63% hasta un periodo de diez días posteriores a la aplicación del probiótico.

9. CONCLUSIONES

- La administración oral del 1.1% de la levadura *Y. lipolytica* (cepas N6 y D1) demostró tener efectos inmunoestimuladores incrementando efectores humorales y celulares, así como la expresión de genes clave en la respuesta inmune en juveniles de *P. vannamei*.
- La suplementación de la mezcla de levaduras (*Y. lipolytica* y *D. hansenii*) en postlarvas de camarón incrementó significativamente la ganancia en peso, respuesta inmune a través de la regulación de genes clave y la supervivencia a una infección con *V. parahaemolyticus* IPNGS16.
- La vía más eficiente para estimular la respuesta inmune en camarón es a través de la vía oral; sin embargo, la mayor protección contra *V. parahaemolyticus* se logró mediante la administración conjunta de levaduras por vía oral e inmersión.
- La suplementación diaria de levaduras por un periodo de tiempo corto confiere máxima supervivencia contra *V. parahaemolyticus*.
- La duración del efecto protector de levaduras en *P. vannamei* infectados con *V. parahaemolyticus* IPNG16 fue de siete días posteriores a la estimulación.

10. LITERATURA CITADA

Afsharnasab, M., Kakoolaki, S. y Mohammadidost, M. (2016). Immunity enhancement with administration of *Gracilaria corticata* and *Saccharomyces cerevisiae* compared to gamma irradiation in expose to WSSV in shrimp, in juvenile *Litopenaeus vannamei*: a comparative study. *Fish Shellfish Immunol.* 56: 21–33. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.06.052>

Aguirre-Guzmán, G., Sánchez-Martínez, J.G., Campa-Córdova, A.I., Luna- González, A. y Ascencio, F. (2009). Penaeid shrimp immune system. *Thai J. Vet. Med.* 39: 205–215.

Alagappan, K., Karuppiah, V. y Deivasigamani, B. (2016). Protective effect of phages on experimental *V. parahaemolyticus* infection and immune response in shrimp (Fabricius, 1798). *Aquaculture.* 453: 86–92. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.11.037>

Alamillo, E., Reyes-Becerril, M., Cuesta, A. y Angulo, C. (2017). Marine yeast *Yarrowia lipolytica* improves the immune responses in Pacific red snapper (*Lutjanus peru*) leukocytes. *Fish Shellfish Immunol.* 70: 48–56. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.08.036>

Álvarez-Ruiz, P., Luna-González, A., Escamilla-Montes, R., Mejía-Ruiz, C.H., Magallón-Barajas, F. J., Llera-Herrera, R. y Galván-Álvarez, D.A. (2015). Long-lasting effect against white spot syndrome virus in shrimp broodstock, *Litopenaeus vannamei*, by LvRab7 silencing. *J. World Aquac. Soc.* 46(6): 571-582. <https://doi.org/10.1111/jwas.12236>

Amparyup, P., Charoensapsri, W. y Tassanakajon, A. (2013). Prophenoloxidase system and its role in shrimp immune responses against major pathogens. *Fish Shellfish Immunol.* 34(4): 990-1001. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.08.019>

Ang, C.Y. y Lal, T.M. (2019). Isolation and characterization of probiotic bacteria from the gastrointestinal tract of pond-cultured *Litopenaeus vannamei* in Tuaran, Sabah. *Int. J. Aquat. Sci.* 10(1): 60–73.

Angulo, C., Maldonado, M., Delgado, K. y Reyes-Becerril, M. (2017). *Debaryomyces hansenii* up regulates superoxide dismutase gene expression and enhances the immune response and survival in Pacific red snapper (*Lutjanus peru*) leukocytes after *Vibrio parahaemolyticus* infection. *Dev. Comp. Immunol.* 71: 18–27. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2017.01.020>

Antony, S.P., Singh, I.B., Sudheer, N.S., Vrinda, S., Priyaja, P. y Philip, R. (2011). Molecular characterization of a crustin-like antimicrobial peptide in the giant tiger shrimp, *Penaeus monodon*, and its expression profile in response to various immunostimulants and challenge with WSSV. *Immunobiology.* 216(1-2): 184-194. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2010.05.030>

Apines-Amar, M.J.S. y Amar, E.C. (2015). Use of immunostimulants in shrimp culture: An update. *Biotechnological Advances in Shrimp Health Management in the Philippines:* 45-71.

Apún-Molina, J.P., Santamaría-Miranda, A., Luna-González, A., Ibarra-Gámez, J.C., Medina-Alcantar, V. y Racotta, I.S. (2015). Growth and metabolic responses of whiteleg shrimp

Litopenaeus vannamei and Nile tilapia *Oreochromis niloticus* in polyculture fed with potential probiotic microorganisms on different schedules. *Lat. Am. J. Aquat. Res.* 43(3): 435–445. <https://doi.org/10.3856/vol43-issue3-fulltext-5>

Azad, I.S., Panigrahi, A., Gopal, C., Paulpandi, S., Mahima, C. y Ravichandran, P. (2005). Routes of immunostimulation vis-a-vis survival and growth of *Penaeus monodon* postlarvae. *Aquaculture*. 248(1-4): 227-234. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.04.011>

Babu, D.T., Antony, S.P., Joseph, S.P., Bright, A.R. y Philip, R. (2013). Marine yeast *Candida aquatextoris* S527 as a potential immunostimulant in black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *J. Invertebr. Pathol.* 112 (3): 243–252. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2012.12.002>

Bachère, E., Destoumieux, D. y Bulet, P. (2000). Penaeidins, antimicrobial peptides of shrimp: a comparison with other effectors of innate immunity. *Aquaculture*. 191(1-3): 71-88. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(00\)00419-1](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(00)00419-1)

Baffone, W., Citterio, B., Vittoria, E., Casaroli, A., Campana, R., Falzano, L. y Donelli, G. (2003). Retention of virulence inviable but non-culturable halophilic *Vibrio spp.* *Int. J. Food. Microbiol.* 89(1): 31-39. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(03\)00102-8](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(03)00102-8)

Bai, N., Zhang, W., Mai, K., Wang, X., Xu, W. y Ma, H. (2010). Effects of discontinuous administration of β -glucan and glycyrrhizin on the growth and immunity of white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*. 306(1-4): 218-224. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.06.017>

Bai, N., Gu, M., Zhang, W., Xu, W. y Mai, K. (2014). Effects of β -glucan derivatives on the immunity of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against white spot syndrome virus infection. *Aquaculture*. 426: 66–73. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.01.019>

Balcázar, J.L., De Blas, I., Ruiz-Zarzuola, I., Cunningham, D., Vendrell, D. y Múzquiz, J.L. (2006). The role of probiotics in aquaculture. *Vet. Microbiol.* 114(3-4): 173-186. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2006.01.009>

Banerjee, G. y Ray, A.K. (2017). The advancement of probiotics research and its application in fish farming industries. *Res. Vet. Sci.* 115, 66-77. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2017.01.016>

Barman, D., Nen, P., Mandal, S.C. y Kumar, V. (2013). Immunostimulants for aquaculture health management. *J. Mar Sci. Res. Dev.* 3(3): 1-11. <http://dx.doi.org/10.4172/2155-9910.1000134>

Bartlett, T.C., Cuthbertson, B.J., Shepard, E.F., Chapman, R.W., Gross, P.S. y Warr, G.W. (2002). Crustins, homologues of an 11.5-kDa antibacterial peptide, from two species of penaeid shrimp, *Litopenaeus vannamei* and *Litopenaeus setiferus*. *Mar. Biotechnol.* 4(3): 278-293. <https://doi.org/10.1007/s10126-002-0020-2>

Berge, G.M., Hatlen, B., Odom, J.M. y Ruyter, B. (2013). Physical treatment of high EPA *Yarrowia lipolytica* biomass increases the availability of n-3 highly unsaturated fatty acids when fed to Atlantic salmon. *Aquacult. Nutr.* 19: 110–121. <https://doi.org/10.1111/anu.12092>

Biller-Takahashi, J.D., Takahashi, L.S., Pilarski, F., Sebastião, F.A. y Urbinati, E.C. (2013). Serum bactericidal activity as indicator of innate immunity in pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887). *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 65: 1745-1751. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352013000600023>

Biswas, G., Korenaga, H., Nagamine, R., Kono, T., Shimokawa, H., Itami, T. y Sakai, M. (2012). Immune stimulant effects of a nucleotide-rich baker's yeast extract in the kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicus*. *Aquaculture.* 366-367: 40–45. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.09.001>

Bomba, A., Nemcová, R., Mudroňová, D. y Guba, P. (2002). The possibilities of potentiating the efficacy of probiotics. *Trends Food Sci. Technol.* 13(4): 121-126. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(02\)00129-2](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(02)00129-2)

Burgents, J.E., Burnett, K.G. y Burnett, L.E. (2004). Disease resistance of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, following the dietary administration of a yeast culture food supplement. *Aquaculture.* 231 (1–4): 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2003.09.003>

Campa-Córdova, A.I., Hernández-Saavedra, N.Y., De Philippis, R. y Ascencio F. (2002). Generation of superoxide anion and SOD activity in haemocytes and muscle of American white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) as a response to β -glucan and sulphated polysaccharide. *Fish Shellfish Immunol.* 12(4): 353–366. <https://doi.org/10.1006/fsim.2001.0377>

Campa-Córdova, A.I., León-Gallo, A.F., Romero-Maldonado, A., Ibarra-Serrano, A.C., Rosales-Mendoza, S., Hirono, I. y Angulo, C. (2017). Recombinant PirA-like toxin protects shrimp against challenge with *Vibrio parahaemolyticus*, the aetiological agent of acute hepatopancreatic necrosis disease. *J. Fish. Dis.* 40 (11): 1725–1729. <https://doi.org/10.1111/jfd.12625>.

Caruffo, M., Navarrete, N.C., Salgado, O.A., Faúndez, N.B., Gajardo, M.C., Feijóo, C.G., Reyes-Jara, A., García, K. y Navarrete, P. (2016). Protective yeasts control *V. anguillarum* pathogenicity and modulate the innate immune response of challenged zebrafish (*Danio rerio*) larvae. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 6: 1–14. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2016.00127>

Cerenius, L., Liang, Z., Duvic, B., Keyser, P., Hellman, U., Palva, E.T., Iwanaga, S. y Söderhäll, K. (1994). Structure and biological activity of a 1, 3-beta-D-glucan-binding protein in crustacean blood. *J. Biol. Chem.* 269(47): 29462-29467. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)43902-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)43902-6)

Cerenius, L. y Söderhäll, K. (2004). The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. *Immunol. Rev.* 198: 116–126. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2004.00116.x>

Cerenius, L., Lee, B.L. y Söderhäll, K. (2008). The proPO-system: pros and cons for its role in invertebrate immunity. *Trends Immunol.* 29:263–271.

Chai, P.C., Song, X.L., Chen, G.F., Xu, H. y Huang, J. (2016). Dietary supplementation of probiotic *Bacillus* PC465 isolated from the gut of *Fenneropenaeus chinensis* improves the health status and resistance of *Litopenaeus vannamei* against white spot syndrome virus. *Fish Shellfish Immunol.* 54: 602-611. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.05.011>

Chang, C.F., Chen, H.Y., Su, M.S. y Liao, I.C. (2000). Immunomodulation by dietary β -1, 3-glucan in the brooders of the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Fish Shellfish Immunol.* 10(6): 505–514. <https://doi.org/10.1006/fsim.2000.0266>

Chang, C.F., Su, M.S., Chen, H. y Liao, I.C. (2003). Dietary β -1,3-glucan effectively improves immunity and survival of *Penaeus monodon* challenged with white spot syndrome virus. *Fish Shellfish Immunol.* 15(4): 297–310. [https://doi.org/10.1016/S1050-4648\(02\)00167-5](https://doi.org/10.1016/S1050-4648(02)00167-5)

Chen, Y.Y., Chen, J.C., Kuo, Y.H., Lin, Y.C., Chang, Y.H., Gong, H.Y. y Huang, C.L. (2016). Lipopolysaccharide and β -1, 3-glucan-binding protein (LGBP) bind to seaweed polysaccharides and activate the prophenoloxidase system in white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Develop. Comp. Immunol.* 55: 144-151. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2015.10.023>

Cheng, W., Wang, L.U. y Chen, J.C. (2005). Effect of water temperature on the immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* to *Vibrio alginolyticus*. *Aquaculture.* 250(3–4): 592–601. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.04.060>

Cheng, T.L., Mayberry, H., McGuire, L.P., Hoyt, J.R., Langwig, K.E., Nguyen, H., Parise, K.L., Foster, J.T., Willis, C.K., Kilpatrick, A.M. y Frick, W.F. (2017). Efficacy of a probiotic bacterium to treat bats affected by the disease white-nose syndrome. *J. Applied Ecol.* 54(3): 701-708. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.12757>

Clairborne, A. (1985). Catalase activity, in: Greenwald, R.A. (Ed.). *CRC Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*, Boca Raton, 283–284 pp.

Chuo, C.P., Liang, S.M. y Sung, H.H. (2005). Signal transduction of the pro phenoloxidase activating system of prawns haemocytes triggered by CpG oligodeoxynucleotides. *Fish Shellfish Immunol.* 18: 149–162. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2004.06.009>

De la Peña, L.D., Cabillon, N.A., Catedral, D.D., Amar, E.C., Usero, R.C., Monotilla, W.D., Calpe, A.T., Fernández, D.G. y Saloma, C.P. (2015). Acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) outbreaks in *Penaeus vannamei* and *P. monodon* cultured in the Philippines. *Dis. Aquat. Org.* 116: 251-254. <https://doi.org/10.3354/dao02919>

De Stryver, P., Deforidt, T. y Sorgeolos, P. (2014). Early mortality outbreaks: A microbial management issue in shrimp farming? *Plos Pathogens.* 10(4): e1003919. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003919>

Destoumieux, D., Muñoz, M., Bulet, P. y Bachere, E. (2000). Penaeidins, a family of antimicrobial peptides from penaeid shrimp (Crustacea, Decapoda). *Cell. Mol. Life Sci.* 57: 1260–1271. <https://doi.org/10.1007/pl00000764>.

Duan, Y., Zhang, J., Dong, H., Wang, Y., Liu, Q. y Li, H. (2015). Oxidative stress response of the black tiger shrimp *Penaeus monodon* to *Vibrio parahaemolyticus* challenge. *Fish Shellfish Immunol.* 46(2): 354-365. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.06.032>

Dubovskiy, I.M., Kryukova, N.A., Glupov, V.V. y Ratcliffe, N.A. (2016). Encapsulation and nodulation in insects. *Invertebr. Surv. J.* 13(1): 229-246.

Endo, Y., Takahashi, M. y Fujita, T. (2006). Lectin complement system and pattern recognition. *Immunobiology.* 211(4): 283-293. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2006.01.003>

Enríquez-Espinoza, T., Mendoza-Cano, F., Encinas-García, T. y Sánchez-Paz, A. (2016) Molecular epidemiology of selected infectious diseases caused by bacteria in juveniles and post-larvae of the white shrimp *Penaeus vannamei* from the north-western coast of Mexico. *J. Fish Dis.* 39: 1393–1397. <https://doi:10.1111/jfd.12473>

Fagutao, F.F., Koyama, T., Kaizu, A., Saito-Taki, T., Kondo, H., Aoki, T. y Hirono, I. (2009). Increased bacterial load in shrimp hemolymph in the absence of prophenoloxidase. *FEBS J.* 276(18): 5298-5306. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07225.x>

FAO. (2016). Probiotics in food. Health and nutritional properties and guidelines for evaluation. Roma.

FAO. (2020). El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2020. La sostenibilidad en acción. Roma. <https://doi.org/10.4060/ca9229es>.

Figuroa-Pizano, M.D., Peregrino-Uriarte, A.B., Yepiz-Plascencia, G., Martínez-Porchas, M., Gollas-Galván, T. y Martínez-Córdova, L.R. (2014). Gene expression responses of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) infected with necrotizing hepatopancreatitis bacterium. *Aquaculture.* 420–421: 165–170. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.10.042>

Finney, D.J. Probit analysis: a statistical treatment of the sigmoid response curve, Cambridge university press, Cambridge, 1957.

Flegel, T.W. (2012). Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in Asia. *J. Invertebr. Pathol.* 110: 166–173. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2012.03.004>

Flores-Miranda, M.C., Luna-González, A., Campa-Córdova, A.I., González- Ocampo, H.A., Fierro-Coronado, J.A. y Partida-Arangure, B.O. (2011). Microbial immunostimulants reduce mortality in whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) challenged with *Vibrio sinaloensis* strains. *Aquaculture.* 320 (1–2): 51–55. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.08.005>.

Fridovich, I. (1995). Superoxide radical and superoxide dismutase. *Annu. Rev. Biochem.* 64: 97–112.

Giordano, D., Coppola, D., Russo, R., Denaro, R., Giuliano, L., Lauro, F.M., Prisco, G. y Verde, C. (2015). Marine microbial secondary metabolites: pathways, evolution and physiological roles. *Adv. Microb. Physiol.* 66: 357-428. <https://doi.org/10.1016/bs.ampbs.2015.04.001>

Guardiola, F.A., Esteban, M.Á. y Angulo, C. (2021). *Yarrowia lipolytica*, health benefits for animals. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 105(20): 7577-7592. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11584-5>

Gyan, W.R., Yang, Q., Tan, B., Jan, S.S., Jiang, L., Chi, S., Dong, X., Liu, H. y Shuang, Z. (2020). Effects of antimicrobial peptides on growth, feed utilization, serum biochemical indices and disease resistance of juvenile shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquacult. Res.* 51 (3): 1222–1231. <https://doi.org/10.1111/are.14473>.

Han, J.E., Tang, K.F., Tran, L.H. y Lightner, D.V. (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. *Dis Aquat Organ.* 113(1): 33-40. <https://doi.org/10.3354/dao02830>

Harzevili, F.D. (2014). *Biotechnological Applications of the Yeast Yarrowia Lipolytica*, Springer, New York, USA.

Hassan, H.M. (2011). Antioxidant and immunostimulating activities of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) autolysates. *World Appl. Sci. J.* 15(8): 1110–1119.

Hatlen, B., Berge, G.M., Odom, J.M., Mundheim, H. y Ruyter, B. (2012). Growth performance, feed utilization and fatty acid deposition in Atlantic salmon, *Salmo salar*, fed graded levels of high-lipid/high-EPA *Yarrowia lipolytica* biomass. *Aquaculture.* 364-365: 39–47. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.07.005>

Haug, T., Kjuul, A.k., Stensvag, K., Sandsdalen, E. y Styrvold, O.B. (2002). Antibacterial activity in four marine crustacean decapods. *Fish Shellfish Immunol.* 12: 371–385. <https://doi:10.1006/fsim.2001.0378>

Hikima, S., Hikima, J.I., Rojtinnakorn, J., Hirono, I. y Aoki, T. (2003). Characterization and function of kuruma shrimp lysozyme possessing lytic activity against *Vibrio* species. *Gene.* 316: 187–195. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(03\)00761-3](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(03)00761-3)

Hong, X.P., Xu, D., Zhuo, Y., Liu, H.Q. y Lu, L.Q. (2016). Identification and pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* isolates and immune responses of *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* (Boone). *J. Fish Dis.* 39(9): 1085–1097. <https://doi.org/10.1111/jfd.12441>

Itami, T., Asano, M., Tokushige, K., Kubono, K., Nakagawa, A., Takeno, N., Nashimura, H., Maeda, M., Kondo, M. y Takahashi, Y. (1998). Enhancement of disease resistance of kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, after oral administration of peptidoglycan derived from *Bifidobacterium thermophilum*. *Aquaculture*. 164(1): 277-288. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(98\)00193-8](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00193-8)

Jahangiri, L. y Ángeles-Esteban, M. (2018). Administration of probiotics in the water in finfish aquaculture systems: a review. *Fishes*. 3(3): 33. <https://doi.org/10.3390/fishes3030033>

Ji, P.F., Yao, C.L. y Wang, Z.Y. (2009). Immune response and gene expression in shrimp (*Litopenaeus vannamei*) hemocytes and hepatopancreas against some pathogen-associated molecular patterns. *Fish Shellfish Immunol.* 27: 563–570. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2009.08.001>.

Jin, M., Xiong, J., Zhou, Q.C., Yuan, Y., Wang, X.X. y Sun, P. (2018). Dietary yeast hydrolysate and brewer's yeast supplementation could enhance growth performance, innate immunity capacity and ammonia nitrogen stress resistance ability of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Fish Shellfish Immunol.* 82: 121–129. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.08.020>.

Jiravanichpaisal, P., Puanglarp, N., Petkon, S., Donnuea, S., Söderhäll, I. y Söderhäll, K. (2007). Expression of immune-related genes in larval stages of the giant tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Fish Shellfish Immunol.* 23: 815–824. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2007.03.003>

Jørgensen, J.B., Sharp, G.J., Secombes, C.J. y Robertsen, B. (1993). Effect of a yeast-cell-wall glucan on the bactericidal activity of rainbow trout macrophages. *Fish Shellfish Immunol.* 3: 267–277. <https://doi.org/10.1006/fsim.1993.1026>.

Kawai, T. y Akira, S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat. Immunol.* 11(5): 373-384. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2017.09.060>

Kesarcodi-Watson, A., Kaspar, H., Lategan, M.J. y Gibson, L. (2008). Probiotics in aquaculture: the need, principles and mechanisms of action and screening processes. *Aquaculture*. 274(1): 1-14. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.11.019>

Khimmakthong, U, y Sukkarun P. (2017). The spread of *Vibrio parahaemolyticus* in tissues of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* analyzed by PCR and histopathology. *Microb Pathog.* 113: 107-112. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.10.028>

Kizheva, Y.K., Rasheva, I.K., Petrova, M.N., Milosheva-Ivanova, A.V., Velkova, L.G., Dolashka, P.A., Dolashki, A.K. y Hristova, P.K. (2019). Antibacterial activity of crab haemocyanin against clinical pathogens. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* 33: 873–880. <https://doi.org/10.1080/13102818.2019.1626283>

Kondo, H., Van, P.T., Dang, L.T. y Hirono, I. (2015). Draft genome sequence of non-*Vibrio parahaemolyticus* acute hepatopancreatic necrosis disease strain KC13.17.5, isolated from diseased shrimp in Vietnam. *Genome Announc.* 3(5): e00978-15. <https://doi:10.1128/genomeA.00978-15>

Kulkarni, A., Krishnan, S., Anand, D., Kokkattunivarthil, S., Otta, S.K., Karunasagar, I. y Kooloth Valappil, R. (2021). Immune responses and immunoprotection in crustaceans with special reference to shrimp. *Rev. Aquac.* 13(1): 431-459. <https://doi.org/10.1111/raq.12482>

Lai, H.C., Ng, T.H., Ando, M., Lee, C.T., Chen, I.T., Chuang, J.C., Mavichak, R., Chang, S.H., Yeh, M.D., Chiang, Y.A., Takeyama, H., Hamaguchi, H.O., Lo, C.F., Aoki, T. y Wang, H.C. (2015). Pathogenesis of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in shrimp. *Fish Shellfish Immunol.* 47:1006–1014. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.11.008>

Lan, J.F., Zhou, J., Zhang, X.W., Wang, Z.H., Zhao, X.F., Ren, Q. y Wang, J.X. (2013). Characterization of an immune deficiency homolog (IMD) in shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*) and crayfish (*Procambarus clarkii*). *Develop. Comp. Immunol.* 41(4): 608-617. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2013.07.004>

Lazado, C.C., Caipang, C.M. y Estante, G.A. (2015). Prospects of host-associated microorganisms in fish and penaeids as probiotics with immunomodulatory functions. *Fish Shellfish Immunol.* 45 (1): 2–12. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.02.023>

Le Moullac, G. y Haffner, P. (2000). Environmental factors affecting immune responses in Crustacea. *Aquaculture.* 191(1-3): 121–131. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(00\)00422-1](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(00)00422-1)

Lee, C.T., Cheng, I.T., Yang, Y.T., Ko, T.P., Huang, Y.T., Huang, J.Y., Huang, M.F., Lin, S.J., Chen, C.Y., Lin, S.S., Lightner, D.V., Wang, H.C., Wang, A.H., Wang, H.C., Hor, L.I. y Lo, C.F. (2015). The opportunistic marines pathogen *Vibrio parahaemolyticus* becomes virulent by acquiring a plasmid that expresses a deadly toxin. *PNAS.* 112(39): 10798-10803. <https://doi.org/10.1073/pnas.1503129112>

Letchumanan, V., Chan, K.G. y Lee, L.H. (2014). *Vibrio parahaemolyticus*: A review on the pathogenesis, prevalence, and advance molecular identification techniques. *Front. Microbiol.* 5: 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00705>

Li, C.C. y Chen, J.C. (2008). The immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus* under low and high pH stress. *Fish Shellfish Immunol.* 25(6): 701–709. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2008.01.007>

Li, F. y Xiang, J. (2013). Signaling pathways regulating innate immune responses in shrimp. *Fish Shellfish immunol.* 34(4): 973-980. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.08.023>

Lightner, D.V., Redman, R.M., Pantoja, C.R., Tang, K.F., Noble, B.L., Schofield, P., Mohny, L.L., Nunan, L.M. y Navarro, S.A. (2012). Historic emergence, impact and current status of shrimp

pathogens in the Americas. *J. Invertebr. Pathol.* 110(2): 174–183. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2012.03.006>

Lin, H.L., Shiu, Y.L., Chiu, C.S., Huang, S.L. y Liu, C. H. (2017). Screening probiotic candidates for a mixture of probiotics to enhance the growth performance, immunity, and disease resistance of Asian seabass, *Lates calcarifer* (Bloch), against *Aeromonas hydrophila*. *Fish Shellfish Immunol.* 60: 474-482. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.11.026>

Liu, G.L., Chi, Z., Wang, G.Y., Wang, Z.P., Li, Y. y Chi, Z.M. (2015). Yeast killer toxins, molecular mechanisms of their action and their applications. *Crit. Rev. Biotechnol.* 35(2): 222-234. <https://doi.org/10.3109/07388551.2013.833582>

Liu, G., Zhu, S., Liu, D., Guo, X. y Ye, Z. (2017). Effects of stocking density of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) on immunities and resistance against *Vibrio harveyi* in a biofloc system. *Fish Shellfish Immunol.* 67: 19-26. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.05.038>

Livak, K.J. y Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods.* 25(4): 402–408. <https://doi:10.1006/meth.2001.1262>.

López-León, P., Luna-González, A., Escamilla-Montes, R., Flores-Miranda, M.C., Fierro-Coronado, J.A., Álvarez-Ruiz, P. y Diarte-Plata, G. (2016). Isolation and characterization of infectious *Vibrio parahaemolyticus*, the causative agent of AHPND, from the whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Lat. Am. J. Aquat. Res.* 44: 470–479. <https://doi.org/10.3856/vol44-issue3-fulltext-5>

Luo, T., Yang, H., Li, F., Zhang, X. y Xu, X. (2006). Purification, characterization and cDNA cloning of a novel lipopolysaccharide-binding lectin from the shrimp *Penaeus monodon*. *Develop. Comp. Immunol.* 30(7): 607-617. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2005.10.004>

Martin, G.G., Rubin, N. y Swanson, E. (2004). *Vibrio parahaemolyticus* and *V. harveyi* cause detachment of the epithelium from the midgut trunk of the penaeid shrimp *Sicyonia ingentis*. *Dis. Aquatic. Org.* 60(1): 21-29. <https://doi:10.3354/dao060021>

Martín, L., Castillo, N.M., Arenal, A., Rodríguez, G., Franco, R., Santiesteban, D., Sotolongo, J., Forrellat, A., Espinosa, G., Carrillo, O. y Cabrera, H. (2012). Ontogenetic changes of innate immune parameters from eggs to early postlarvae of white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda). *Aquaculture.* 3358-3359: 234–239. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.05.005>

Marshall, S.H. y Arenas, G. (2003). Antimicrobial peptides: A natural alternative to chemical antibiotics and a potential for applied biotechnology. *Electron. J. Biotechnol.* 6(3): 271-284.

Meena, D.K., Das, P., Kumar, S., Mandal, S.C., Prusty, A.K., Singh, S.K., Akhtar, M.S., Behera, B.K., Kumar, K., Pal, A.K. y Mukherjee, S.C. (2013). Beta-glucan: an ideal immunostimulant in

aquaculture (a review). *Fish Physiol. Biochem.* 39(3): 431–457. <https://doi.org/10.1007/s10695-012-9710-5>.

Miandare, H.K., Yarahmadi, P. y Abbasian, M. (2016). Immune related transcriptional responses and performance of *Litopenaeus vannamei* post-larvae fed on dietary probiotic PrimaLac®. *Fish Shellfish Immunol.* 55: 671-678. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.06.053>

Miandare, H.K., Mirghaed, A.T., Hosseini, M., Mazloumi, N., Zargar, A. y Nazari, S. (2017). Dietary Immunogen® modulated digestive enzyme activity and immune gene expression in *Litopenaeus vannamei* post larvae. *Fish Shellfish Immunol.* 70: 621–627. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.09.048>

Miao, S., Han, B., Zhao, C., Hu, J., Zhu, J., Zhang, X. y Sun, L. (2020). Effects of dietary *Pediococcus acidilactici* GY2 single or combined with *Saccharomyces cerevisiae* or/and β -glucan on the growth, innate immunity response and disease resistance of *Macrobrachium rosenbergii*. *Fish Shellfish Immunol.* 98: 68-76. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.12.038>

Morales-Covarrubias, M.S., Ruiz-Luna, A., Pereira, A.M., Montiel, V.T. y Conroy, G. (2011). Prevalencia de enfermedades de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) cultivado en ocho regiones de Latinoamérica, *Revista Científica de La Facultad de Ciencias Veterinarias de La Universidad Del Zulia.* 21(5): 434–446.

Muñoz, M., Cedeño, R., Rodríguez, J., van der Knaap, W.P., Mialhe, E. y Bachere, E. (2000). Measurement of reactive oxygen intermediate production in haemocytes of the penaeid shrimp, *Penaeus vannamei*. *Aquaculture.* 191(1-3): 89-107. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(00\)00420-00428](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(00)00420-00428)

Muñoz, M., Vandenbulcke, F., Gueguen, Y. y Bachère, E. (2003). Expression of penaeidin antimicrobial peptides in early larval stages of the shrimp *Penaeus vannamei*. *Develop. Comp. Immunol.* 27(4): 283-289. [https://doi.org/10.1016/S0145-305X\(02\)00102-7](https://doi.org/10.1016/S0145-305X(02)00102-7)

Naitza, S. y Ligoxygakis, P. (2004). Antimicrobial defences in Drosophila: the story so far. *Mol. Immunol.* 40(12): 887-896. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2003.10.008>

Nappi, A.J. y Ottaviani, E. (2000). Cytotoxicity and cytotoxic molecules in invertebrates. *Bioessays.* 22(5): 469-480. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-1878\(200005\)22:5<469::AID-BIES9>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-1878(200005)22:5<469::AID-BIES9>3.0.CO;2-4)

Nayak, S., Singh, S.K., Ramaiah, N. y Sreepada, R.A. (2010). Identification of upregulated immune-related genes in *Vibrio harveyi* challenged *Penaeus monodon* postlarvae. *Fish Shellfish Immunol.* 29(3): 544–549. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.05.010>

Newaj-Fyzul, A., Al-Harbi, A.H. y Austin, B. (2014). Developments in the use of probiotics for disease control in aquaculture. *Aquaculture.* 431: 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.08.026>

Nimrat, S., Boonthai, T. y Vuthiphandchai, V. (2011). Effects of probiotic forms, compositions of and mode of probiotic administration on rearing of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) larvae and postlarvae. *Anim. Feed Sci. Technol.* 169: 244–258. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2011.07.003>.

Nimrat, S., Khaopong, W., Sangsong, J., Boonthai, T. y Vuthiphandchai, V. (2019). Dietary administration of Bacillus and yeast probiotics improves the growth, survival, and microbial community of juvenile whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *J. Appl. Aquacult.* 33 (1): 15-31. <https://doi.org/10.1080/10454438.2019.1655517>.

Okumura, T. (2007). Effects of lipopolysaccharide on gene expression of antimicrobial peptides (penaeidins and crustin), serine proteinase and prophenoloxidase in haemocytes of the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immunol.* 22(1-2): 68-76. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2006.03.013>

Pacheco, M., Campa-Córdova, Á.I., Aguirre, G., Luna-González, A., Guzmán, M. y Ascencio, F. (2012). Effect of *Debaryomyces hansenii* on the antioxidant response of juvenile white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Rev. MVZ Córdoba.* 17: 2820–2826.

Pandiyan, P., Balaraman, D., Thirunavukkarasu, R., George, E.G., Subaramaniyan, K., Manikkam, S. y Sadayappan, B. (2013). Probiotics in aquaculture. *Drug invent. Today.* 5(1): 55-59. <https://doi.org/10.1016/j.dit.2013.03.003>

Pham, D., Ansquer, D., Chevalier, A., Dauga, C., Peyramale, A., Wabete, N. y Labreuche, Y. (2014). Selection and characterization of potential probiotic bacteria for *Litopenaeus stylirostris* shrimp hatcheries in New Caledonia. *Aquaculture.* 432: 475-482. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.04.031>

Pooljun, C., Daorueang, S., Weerachatanukul, W., Direkbusarakom, S. y Jariyapong, P. (2020). Enhancement of shrimp health and immunity with diets supplemented with combined probiotics: application to *Vibrio parahaemolyticus* infections. *Dis. Aquat. Org.* 140: 37-46. <https://doi.org/10.3354/dao03491>

Qiao, G., Kim, S.k., Cho, Y.R., Kim, S. y Jang, I.K. (2013). Expression of c-type lysozyme from the fleshy shrimp *Fenneropenaeus chinensis* is upregulated following *Vibrio anguillarum* and lipopolysaccharide injection. *Fish. Aquat. Sci.* 16: 267–272. <https://doi.org/10.5657/FAS.2013.026>

Qin, Z., Babu, V.S., Wan, Q., Zhou, M., Liang, R., Muhammad, A., Zhao, L., Li, J., Lan, J. y Lin, L. (2018). Transcriptome analysis of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) challenged by *Vibrio parahaemolyticus* reveals unique immune-related genes. *Fish Shellfish Immunol.* 77: 164–174. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.03.030>

Raghunath, P. (2015). Roles of thermostable direct hemolysin (TDH) and TDH-related hemolysin (TRH) in *Vibrio parahaemolyticus*. *Front. Microbiol.* 5: 805. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00805>

Raja, R.A., Sridhar, R., Balachandran, C., Palanisamy, A., Ramesh, S. y Humaresan, N. (2017). Prevalence of vibrios with special reference to *Vibrio parahaemolyticus* in farmed penaeid shrimp, *Penaeus vannamei* (Boone, 1931) from selected districts of Tamil Nadu, India. *Indian J. Fish.* 64(3): 122-128. <https://doi.org/10.21077/ijf.2017.64.3.69011-18>

Restrepo, L., Bayot, B., Arciniegas, S., Bajaña, L., Betancourt, I., Panchana, F. y Muñoz, A.R. (2018). PirVP genes causing AHPND identified in a new *Vibrio* species (*Vibrio punensis*) within the commensal Orientalis clade. *Scientific reports.* 8(1): 1-14. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30903-x>

Reyes-Becerril, M., Salinas, I., Cuesta, A., Meseguer, J., Tovar-Ramírez, D., Ascencio-Valle, F. y Esteban M.Á. (2008). Oral delivery of live yeast *Debaryomyces hansenii* modulates the main innate immune parameters and the expression of immune-relevant genes in the gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Fish Shellfish Immunol.* 25(6): 731–739. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2008.02.010>.

Ringø, E., Olsen, R.E., Gonzalez-Vecino, J.L., Wadsworth, S. y Song, S.K. (2012). Use of immunostimulants and nucleotides in aquaculture: a review. *J. Mar. Sci. Res. Dev.* 2(1): 1–22. <https://doi.org/10.4172/2155-9910.10001>.

Ringø, E. (2020). Probiotics in shellfish aquaculture. *Aquac. fish.* 5: 1-27. <https://doi.org/10.1016/j.aaf.2019.12.001>

Rodríguez, J., Espinosa, Y., Echeverría, F., Cárdenas, G., Román, R. y Stern, S. (2007). Exposure to probiotics and β -1, 3/1, 6-glucans in larviculture modifies the immune response of *Penaeus vannamei* juveniles and both the survival to White Spot Syndrome Virus challenge and pond culture. *Aquaculture.* 273(4): 405–415. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.10.042>

Rodríguez, M.V., Zanuzzo, F.S., Koch, J.F., de Oliveira, C.A., Sima, P. y Vetvicka, V. (2020). Development of fish immunity and the role of β -glucan in immune responses. *Molecules.* 25(22): 53-78. <https://doi.org/10.3390/molecules25225378>

Sajeevan, T.P., Philip, R. y Singh, I.B. (2006). Immunostimulatory effect of a marine yeast *Candida sake* S165 in *Fenneropenaeus indicus*. *Aquaculture.* 257: 150–155. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.03.008>.

Sajeevan, T.P., Philip, R. y Singh, I.B. (2009). Dose/frequency: a critical factor in the administration of glucan as immunostimulant to Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus*. *Aquaculture.* 287: 248–252. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.10.045>

Sajeevan, T.P., Lowman, D.W., Williams, D.L., Zelve, S., Anas, A. y Rosamma, P. (2009). Marine yeast diet confers better protection than its cell wall component (1-3)- β -D-glucan as an immunostimulant in, *Fenneropenaeus indicus*. *Aquac. Res.* 40: 1723–1730. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02275.x>.

Sakai, M. (1999). Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture*. 172(1-2): 63-92. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(98\)00436-0](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00436-0)

Sarlin, P.J. y Philip, R. (2011). Efficacy of marine yeasts and baker's yeast as immunostimulants in *Fenneropenaeus indicus*: a comparative study. *Aquaculture*. 321 (3–4): 173–178. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.08.039>.

Scholz, U., Diaz, G.G., Ricque, D., Cruz-Suarez, L.E., Vargas-Albores, F. y Latchford, J. (1999). Enhancement of vibriosis resistance in juvenile *Penaeus vannamei* by supplementation of diets with different yeast products. *Aquaculture*. 176 (3–4):271–283. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(99\)00030-00037](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00030-00037).

Selvaraj, V., Sampath, K. y Sekar, V. (2006). Adjuvant and immunostimulatory effects of β -glucan administration in combination with lipopolysaccharide enhances survival and some immune parameters in carp challenged with *Aeromonas hydrophila*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 114(1-2): 15-24. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2006.06.011>

Sivagnanavelmurugan, M., Thaddaeus, B.J., Palavesam, A. y Immanuel, G. (2014). Dietary effect of *Sargassum wightii* fucoidan to enhance growth, prophenoloxidase gene expression of *Penaeus monodon* and immune resistance to *Vibrio parahaemolyticus*. *Fish Shellfish Immunol.* 39(2): 439–449. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.05.037>

Sha, Y., Liu, M., Wang, B., Jiang, K., Qi, C. y Wang, L. (2016). Bacterial Population in Intestines of *Litopenaeus vannamei* Fed Different Probiotics or Probiotic Supernatants. *J. Microbiol. Biotechnol.* 26(10): 1736-1745. <https://doi.org/10.4014/jmb.1603.03078>

Shurson, G.C. (2018). Yeast and yeast derivatives in feed additives and ingredients: sources, characteristics, animal responses, and quantification methods. *Anim. Feed Sci. Technol.* 235: 60–76. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2017.11.010>

Silveira, A.S., Matos, G.M., Falchetti, M., Ribeiro, F.S., Bressan, A., Bachere, E., Perazzolo, L.M. y Rosa, R.D. (2018). An immune-related gene expression of the shrimp digestive system in response to two major pathogens brings insights into the involvement of hemocytes in gut immunity. *Dev. Comp. Immunol.* 79: 44-50. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2017.10.005>.

Sirikharin, R., Taengchaiyaphum, S., Sanguanrut, P., Chi, T.D., Mavichak, R., Proespraiwong, P., Nuangsaeng, B., Thitamadee, S., Flegel, T.W. y Sritunyalucksana, K. (2015) Characterization and PCR detection of binary, Pir-like toxins from *Vibrio parahaemolyticus* isolates that cause acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in shrimp. *PLoS One.* 10(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126987>

Smith, V., Brown, J. y Hauton, C. 2003. Immunostimulation in crustaceans: does it really protect against infection?. *Fish Shellfish Immunol.* 15: 71–90.

Smith, V.J., Roulston, C. y Dyrinda, E.A. (2010). The shrimp immune system. *The Shrimp Book*. Nottingham University Press, Nottingham, 89-148.

Song, K.K., Li, D.F., Zhang, M.C., Yang, H.J., Ruan, L.W. y Xu, X. (2010). Cloning and characterization of three novel WSSV recognizing lectins from shrimp *Marsupenaeus japonicus*. *Fish Shellfish Immunol.* 28(4): 596-603. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2009.12.015>

Soowannayan, C., Boonmee, S., Puckcharoen, S., Anatamsombat, T., Yatip, P., Ng, W.K., Thitamadee, S., Tuchinda, P., Munyoo, B., Chabang, N., Nuangsaeng, B., Sonthi, M. y Withyachumnarnkul, B. (2019). Ginger and its component shogaol inhibit *Vibrio* biofilm formation in vitro and orally protect shrimp against acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND). *Aquaculture.* 504: 139–147. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.02.007>

Soto-Rodríguez, S.A., Gomez-Gil, B., Lozano, R., del Rio-Rodríguez, R., Diéguez, A.L., y Romalde, J.L. (2012). Virulence of *Vibrio harveyi* responsible for the “ Bright-red” Syndrome in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *J. Invertebr. Pathol.* 109(3): 307–317. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2012.01.006>

Sritunyalucksana, K., Sithisarn, P., Withayachumnarnkul, B. y Flegel, T.W. (1999). Activation of prophenoloxidase, agglutinin and antibacterial activity in haemolymph of the black tiger prawn, *Penaeus monodon*, by immunostimulants. *Fish Shellfish Immunol.* 9(1): 21–30. <https://doi.org/10.1006/fsim.1998.0161>

Srivastava, P.K. y Pandey, A.K. (2015). Role of immunostimulants in immune responses of fish and shellfish. *Biochem. Cell. Arch.* 15(1): 47-73.

Stevens, M.G., Kehrli, M.E. y Canning, P.C. (1991). A colorimetric assay for quantitating bovine neutrophil bactericidal activity. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 28(1): 45–56. [https://doi.org/10.1016/0165-2427\(91\)90042-B](https://doi.org/10.1016/0165-2427(91)90042-B).

Stuart, L.M. y Ezekowitz, R.A. (2008). Phagocytosis and comparative innate immunity: learning on the fly. *Nat. Rev. Immunol.* 8(2): 131-141. <https://doi:10.1038/nri2240>

Sung, H.H., Wu, P.Y. y Song, Y.L. (1999). Characterisation of monoclonal antibodies to haemocyte subpopulations of tiger shrimp (*Penaeus monodon*): immunochemical differentiation of three major haemocyte types. *Fish Shellfish Immunol.* 9(3): 167-179. <https://doi.org/10.1006/fsim.1998.0185>

Supphantharika, M., Khunrae, P., Thanardkit, P. y Verduyn, C. (2003). Preparation of spent brewer's yeast β -glucans with a potential application as an immunostimulant for black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Bioresour. Technol.* 88(1): 55–60. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(02\).00257-2](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(02).00257-2).

Sumathipala, N. y Jiang, H. (2010). Involvement of *Manduca sexta* peptidoglycan recognition protein-1 in the recognition of bacteria and activation of prophenoloxidase system. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 40(6): 487-495. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2010.04.008>

Tassanakajon, A., Somboonwiwat, K., Supungul, P. y Tang, S. (2013). Discovery of immune molecules and their crucial functions in shrimp immunity. *Fish Shellfish Immunol.* 34(4): 954-967. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.09.021>

Tassanakajon, A., Rimphanitchayakit, A., Visetnan, S., Amparyup, P., Somboonwiwat, K. y Charoensapsri, W. (2018). Shrimp humoral responses against pathogens: antimicrobial peptides and melanization. *Dev. Comp. Immunol.* 80: 81–93. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2017.05.009>

Tovar-Ramírez, D., Zambonino-Infante, J., Cahu, C., Gatesoupe, F.J. y Vázquez-Juárez, R. (2004). Influence of dietary live yeast on European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larval development. *Aquaculture.* 234: 425-427.

Tran, L., Nunan, L., Redman, R.M., Mohny, L.L., y Pantoja C.R., Fitzsimmons K. y Lightner D.V. (2013) Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. *Dis. Aquat. Org.* 105: 45–55. <https://doi.org/10.3354/dao02621>

Van de Braak, C.B., Botterblom, M.H., Taverne, N.V., Van Muiswinkel, W.B., Rombout, J.H. y Van der Knaap, W.P. (2002). The roles of haemocytes and the lymphoid organ in the clearance of injected *Vibrio* bacteria in *Penaeus monodon* shrimp. *Fish Shellfish Immunol.* 13(4): 293-309. <https://doi.org/10.1006/fsim.2002.0409>

Vandenbergh, J., Thompson, F.L., Gómez-Gill, B., Swings, J. (2003). Phenotypic diversity among *Vibrio* isolates from marine aquaculture systems. *Aquaculture.* 219: 9-20.

Vargas-Albores, F., Guzmán, M.A. y Ochoa J.L. (1993). An anticoagulant solution for haemolymph collection and prophenoloxidase studies of Penaeid shrimp *Penaeus californiensis*. *Comp. Biochem. Physiol. Part A* 106(2): 299–303. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(93\)90516-7](https://doi.org/10.1016/0300-9629(93)90516-7)

Vargas-Albores, F. y Yepiz-Plascencia, G. (2000). Beta glucan binding protein and its role in shrimp immune response. *Aquaculture.* 191(1): 13-21. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(00\)00416-6](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(00)00416-6)

Vargas-Albores, F., Yepiz-Plascencia, G., Jiménez-Vega, F. y Ávila-Villa, A. (2004). Structural and functional differences of *Litopenaeus vannamei* crustins. *Comp. Biochem. Physiol. B, Biochem. Mol. Biol.* 138(4): 415-422. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2004.05.007>

Vargas-Albores, F., Porchas-Cornejo, M.A., Martínez-Porchas, M., Villalpando-Canchola, E., Gollas-Galván, T. y Martínez-Córdova, L.R. (2017). Bacterial biota of shrimp intestine is

significantly modified by the use of a probiotic mixture: a high throughput sequencing approach. *Helgol. Mar. Res.* 71(1), 1-10. <https://doi.org/10.1186/s10152-017-0485-z>

Vázquez, L., Alpuche, J., Maldonado, G., Agundis, C., Pereyra-Morales, A. y Zenteno, E. (2009). Immunity mechanisms in crustaceans. *Innate immunity*. 15(3): 179-188. <https://doi.org/10.1177/1753425909102876>

Ventura-López, C., Gómez-Anduro, G., Arcos, F.G., Llera-Herrera, R., Racotta, I.S. y Ibarra, A.M. (2016). A novel CHH gene from the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* was characterized and found highly expressed in gut and less in eyestalk and other extra-eyestalk tissues. *Gene*. 582(2): 148-160. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2016.02.011>

Vine, N.G., Leukes, W.D., Kaiser, H., Daya, S., Baxter, J. y Hecht, T. (2004). Competition for attachment of aquaculture candidate probiotic and pathogenic bacteria on fish intestinal mucus. *J. Fish Dis.* 27(6): 319-326. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2004.00542.x>

Wang, R., Lee, S.Y., Cerenius, L. y Söderhäll, K. (2001). Properties of the prophenoloxidase activating enzyme of the freshwater crayfish, *Pacifastacus leniusculus*. *Eur. J. Biochem.* 268(4): 895-902. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2001.01945.x>

Wang, Y.C., Chang, P.S. y Chen, H.Y. (2007). Tissue expressions of nine genes important to immune defense of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immunol.* 23(6): 1161–1177. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2007.04.004>.

Wang, Y.C., Chang, P.S. y Chen, H.Y. (2008). Differential time-series expression of immune-related genes of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* in response to dietary inclusion of β -1,3-glucan. *Fish Shellfish Immunol.* 24: 113–121. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2007.09.008>

Wang, X.W., Xu, W.T., Zhang, X.W., Zhao, X.F., Yu, X.Q. y Wang, J.X. (2009). A C-type lectin is involved in the innate immune response of Chinese white shrimp. *Fish Shellfish Immunol.* 27(4): 556-562. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2009.07.011>

Wang, Y., Liu, S., Yang, Z., Zhu, Y., Wu, Y., Huang, J. y Mao, J. (2011). Oxidation of β -glucan extracted from *Poria Cocos* and its physiological activities. *Carbohydr. Polym.* 85(4): 798-802. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.03.052>

Wang, P.H., Liang, J.P., Gu, Z.H., Wan, D.H., Weng, S.P., Yu, X.Q. y He, J.G. (2012). Molecular cloning, characterization and expression analysis of two novel Toll-like receptors (LvToll2 and LvToll3) and three putative Spätzle-like Toll ligands (LvSpz1–3) from *Litopenaeus vannamei*. *Develop. Comp. Immunol.* 36(2): 359-371.

Wang, X.W. y Wang, J.X. (2013a). Pattern recognition receptors acting in innate immune system of shrimp against pathogen infections. *Fish Shellfish Immunol.* 34(4): 981-989. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.08.008>

Wang, X.W. y Wang, J.X. (2013b). Diversity and multiple functions of lectins in shrimp immunity. *Develop. Comp. Immunol.* 39(1-2): 27-38. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2012.04.009>

Wang, P.H., Huang, T., Zhang, X. y He, J.G. (2014). Antiviral defense in shrimp: from innate immunity to viral infection. *Antiviral Res.* 108: 129-141.

Wang, W., Sun, J., Liu, C. y Xue, Z. (2017). Application of immunostimulants in aquaculture: current knowledge and future perspectives. *Aquac. Res.* 48(1): 1-23. <https://doi.org/10.1111/are.13161>

Wang, Y.C., Hu, S.Y., Chiu, C.S. y Liu, C.H. (2019). Multiple-strain probiotics appear to be more effective in improving the growth performance and health status of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, than single probiotic strains. *Fish Shellfish Immunol.* 84: 1050-1058. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.11.017>

Warner, H.R. (1994). Superoxide dismutase, aging, and degenerative disease. *Free Radic. Biol. Med.* 17(3): 249-258. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(94\)90080-9](https://doi.org/10.1016/0891-5849(94)90080-9)

Wilson, W., Lowman, D., Antony, S.P., Puthumana, J., Singh, I.B. y Philip, R. (2015). Immune gene expression profile of *Penaeus monodon* in response to marine yeast glucan application and white spot syndrome virus challenge. *Fish Shellfish Immunol.* 43: 346–356. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.12.032>.

Wongsasak, U., Chaijamrus, S., Kumkhong, S. y Boonanuntanasarn, S. (2015). Effects of dietary supplementation with β -glucan and synbiotics on immune gene expression and immune parameters under ammonia stress in Pacific white shrimp. *Aquaculture.* 436: 179–187. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.10.028>

Xu, X., Wu, Q., Zhang, J., Cheng, J., Zhang, S., y Wu, K. (2014). Prevalence, pathogenicity, and serotypes of *Vibrio parahaemolyticus* in shrimp from Chinese retail markets. *Food Control.* 46: 81–85. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.04.042>

Xu, W.J. y Pan, L.Q. (2014). Evaluation of dietary protein level on selected parameters of immune and antioxidant systems, and growth performance of juvenile *Litopenaeus vannamei* reared in zero-water exchange biofloc-based culture tanks. *Aquaculture.* 426: 181-188. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.02.003>

Yang, S.P., Wu, Z.H., Jian, J.C. y Zhang, X.Z. (2010). Effect of marine red yeast *Rhodospiridium paludigenum* on growth and antioxidant competence of *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture.* 309 (1–4): 62–65. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.09.032>

Yang, Y.T., Chen, I.T., Lee, C.T., Chen, C.Y., Lin, S.S., Hor, L.I., Tseng, T.C., Huang, Y.T., Sritunyalucksana, K., Thitamadee, S. y Wang, H.C. (2014). Draft genome sequences of four strains of *Vibrio parahaemolyticus*, three of which cause early mortality syndrome/acute

hepatopancreatic necrosis disease in shrimp in China and Thailand. *Genome Announc.* 2(5): [10.1128/genomeA.00816-14](https://doi.org/10.1128/genomeA.00816-14)

Yao, C.L., Wu, C.G., Xiang, J.H., Li, F., Wang, Z.Y. y Han, X. (2008). The lysosome and lysozyme response in Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* to *Vibrio anguillarum* and laminarin stimulation. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 363: 124–129. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2008.06.035>

Yeh, M.S., Lai, C.Y., Liu, C.H., Kuo, C.M. y Cheng, W. (2009). A second proPO present in white shrimp *Litopenaeus vannamei* and expression of the proPOs during a *Vibrio alginolyticus* injection, molt stage, and oral sodium alginate ingestion. *Fish Shellfish Immunol.* 26(1): 49-55. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2008.10.003>

Yu, L.H., Teh, C.S., Yap, K.P. y Thong, K.L. (2020). Diagnostic approaches and contribution of next-generation sequencing technologies in genomic investigation of *Vibrio parahaemolyticus* that caused acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND). *Aquac. Int.* 28(6): 2547-2559. <https://doi.org/10.1007/s10499-020-00610-4>

Zhao, H.X., Cao, J.M., Wang, A.L., Du, Z.Y., Ye, C.X., Huang, Y.H., Lan, H.B., Zhou, T.T. y Li, G.L. (2012). Effect of long-term administration of dietary β -1, 3-glucan on growth, physiological, and immune responses in *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). *Aquacult. Int.* 20: 145–158. <https://doi.org/10.1007/s10499-011-9448-6>

Zelick, U.E., Janje, B. y Schneider, O. (2005). Superoxide dismutase expression and H₂O₂ production by hemocytes of the trematode intermediate host *Lymnaea stagnalis* (Gastropoda). *Dev. Comp. Immunol.* 29: 305–314. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2004.09.002>

Zokaeifar, H., Babaei, N., Saad, C.R., Kamarudin, M.S., Sijam, K. y Balcazar, J.L. (2014). Administration of *Bacillus subtilis* strains in the rearing water enhances the water quality, growth performance, immune response, and resistance against *Vibrio harveyi* infection in juvenile white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immunol.* 36(1): 68-74. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.10.007>

Zorriehzahra, M.J. y Banaederakhshan, R. (2015). Early mortality syndrome (EMS) as new emerging threat in shrimp industry. *Adv. Anim. Vet. Sci.* 3(2): 64-72. <http://dx.doi.org/10.14737/journal.aavs/2015/3.2s.64>.