



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

ESTUDIO NUTRIGENÓMICO DE GENES
INVOLUCRADOS EN EL SISTEMA INMUNE Y
ANTIOXIDANTE DE *Litopenaeus vannamei* (BONNE,
1831) Y *Farfantepenaeus californiensis* (HOLMES, 1900)

TESIS

Que para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

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

Presenta

María del Rosario Pacheco Marges

La Paz, Baja California Sur, Septiembre de 2011

ACTA DE LIBERACION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 13:00 horas del día 18 del Mes de Agosto del 2011, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

"Estudio nutrigenómico de genes involucrados en el sistema inmune y antioxidante de *Litopenaeus vannamei* (Bonne, 1831) y *Farfantepenaeus californiensis* (Holmes, 1900)"

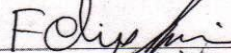
Presentada por el alumno:

María del Rosario Pacheco Marges

Aspirante al Grado de DOCTOR EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACION DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACION EN Acuicultura

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

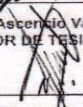
LA COMISION REVISORA



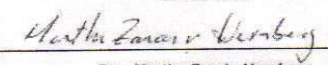
Dr. Felipe Ascencio Valle
DIRECTOR DE TESIS



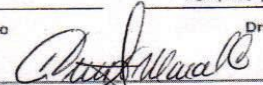
Dr. Ángel I. Campa Córdova
CO-DIRECTOR



Dra. Gracia A. Gómez Anduro
CO-TUTOR



Dra. Martha Zarain Herzberg
CO-TUTOR



Dr. Humberto Villarreal Colmenares
CO-TUTOR



DRA. ELISA SERVIERE ZARAGOZA,
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

COMITÉ TUTORIAL Y REVISOR DE TESIS

Dr. Ángel Isidro Campa Córdova (Codirector de Tesis)
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.

Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle (Codirector de Tesis)
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.

Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro (Tutor)
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.

Dra. Martha Zarain Herzberg (Tutor)
Centro de Ciencias de Sinaloa

Dr. Humberto Villarreal Colmenares (Tutor)
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.

MIEMBROS DEL JURADO DE LA DEFENSA DE TESIS

Dr. Ángel Isidro Campa Córdova

Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro

Dr. Humberto Villarreal Colmenares

Dr. Edilmar Cortés Jacinto

Dr. Dariel Ramírez Tovar

Dr. Roberto Civera Cerecedo (suplente)

RESUMEN

En camarones el sistema inmune innato se expresa a través de dos mecanismos de acción: inmunidad celular e inmunidad humoral, y se ha desarrollado para protegerlos de sustancias extrañas y microorganismos potencialmente patógenos. Entre estos microorganismos destaca por sus efectos negativos en la industria de cultivo, el virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV por sus siglas en inglés). Investigaciones sobre el sistema antioxidante de camarones mostraron que la infección con WSSV induce estrés oxidativo, por la generación excesiva de especies reactivas al oxígeno (EROs) implicadas en la activación de la fagocitosis, principal mecanismo de inmunidad celular. La prevención y control de enfermedades regulando la respuesta inmune a través de la dieta, es una estrategia que poco a poco se está abriendo camino en la acuicultura, pudiendo en un momento dado desplazar a la quimioterapia. Actualmente, las investigaciones se han enfocado a las respuestas que tiene el camarón (metabólica y fisiológicamente) a componentes presentes en la dieta, así como a la identificación de genes responsables de tales cambios a nivel molecular. Estos estudios han dado lugar al desarrollo de un nuevo campo de investigación conocido como genómica nutricional o nutrigenómica. En el presente trabajo se evaluaron los efectos de la exposición por inmersión a tres cepas con efecto probiótico; dos aisladas del medio marino [*Debaryomyces hansenii* (DH5 y DH6)] y la otra de cítricos [*D. hansenii* (LL1)], y a dietas suplementadas con un inmunoestimulante (β -glucano) y los antioxidantes (β -caroteno y vitamina E) sobre la respuesta antioxidante de camarones, además de explorar la posibilidad de identificar genes diferencialmente expresados bajo inmunoestimulación y al mismo tiempo retados con WSSV. Los tratamientos utilizados durante la exposición a *D. hansenii* fueron los siguientes: 1) Control (sin levaduras); 2) DH5 (1×10^4 UFC/mL); 3) DH5 (1×10^6 UFC/mL); 4) DH6 (1×10^4 UFC/mL); 5) DH6 (1×10^6 UFC/mL) y 6) β -1,3-glucano (0.20 mg/mL). La inoculación de los tratamientos en el agua de cultivo se repitió después de cada recambio durante 15 días, excepto β -1,3-glucano que se agregó una dosis cada 7 días. Se registraron diferencias significativas ($p < 0.05$) en el conteo total de hemocitos en los tratamientos con DH6 y LL1 (1×10^6 UFC/mL) comparada con el control. Los camarones tratados con β -1,3-glucano incrementaron significativamente ($p < 0.05$) los valores de la actividad enzimática de superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT) en hemocitos. Por otro lado, se evaluaron los aditivos alimenticios β -1,3 glucano, vitamina E y β -caroteno incluidos en la dieta en proporción 0.1, 0.01 y 0.01% respectivamente. Los camarones fueron alimentados

diariamente durante 23 días y posteriormente infectados con WSSV. Se determinó la actividad antioxidante de SOD y CAT en hepatopáncreas y músculo a las 0, 1, 6, 12, 24 y 48 h después de la infección. Los juveniles tratados con vitamina E y β -1,3 glucano mantuvieron un incremento en la actividad SOD desde las 12 a las 48 h post-infección. Los camarones alimentados con β -caroteno incrementaron la actividad SOD antes del reto con WSSV y los que fueron alimentados con β -1,3-glucano y vitamina E incrementaron la actividad CAT también antes del reto. La actividad CAT en músculo se incrementó respecto al grupo control con todos los grupos de camarones tratados desde 1 hasta 6 h posteriores a la infección con WSSV. La actividad antioxidante más alta se registró en los camarones alimentados con vitamina E. Los juveniles alimentados con vitamina E y posteriormente infectados con WSSV, registraron 100% de mortalidad a las 72 h, pero los que fueron alimentados con β -1,3-glucano y β -caroteno resistieron la infección hasta las 144 h. En cuanto al análisis de expresión, los resultados obtenidos mostraron que el transcrito de mMnSOD fue más abundante en todos los tejidos que el transcrito de CAT, observándose en pleópodos la mayor abundancia de mMnSOD y en hepatopáncreas la mayor abundancia de CAT. Así mismo, se observó una inducción de la expresión con respecto al tiempo en los niveles de expresión de los transcritos CAT y mMnSOD en hepatopáncreas. Los niveles de expresión relativa significativamente más altos ($p < 0.05$) de CAT se registraron a las 12 h en organismos retados con WSSV sin inmuoestimar con β -1,3-glucano y a las 24 h en organismos retados e inmuoestimulados. También a las 12 h se observa la mayor expresión relativa ($p < 0.05$) de mMnSOD en organismos inmuoestimulados y a las 24 h en organismos retados sin inmuoestimar y en organismos retados e inmuoestimulados. La identificación de 5 genes involucrados en la resistencia de organismos retados con WSSV e inmuoestimulados con β -1,3-glucano fue posible utilizando el método de hibridación por supresión sustractiva. Los resultados de este estudio mostraron que es posible incrementar la capacidad antioxidante de juveniles de camarones a través de dos vías; inmersión y a través del alimento. Las dietas suplementadas con β -caroteno y β -1,3-glucano aumentaron la actividad de enzimas antioxidantes e incrementaron el número de días de supervivencia en camarones con respecto al control. La vitamina E y *D. hansenii* mostraron potencial antioxidante aumentando la actividad de SOD y CAT.

Palabras clave: Nutrigenómica, enzimas antioxidantes, WSSV, camarón

Angela Campa

VoBo.

F. Diego

Abstract

In shrimp innate immune system is expressed through two mechanisms of action: cellular immunity and humoral immunity, and has developed to protect against foreign substances and potentially pathogenic microorganisms. Within these microorganisms stands out for its negative effects on farming industry the white spot syndrome virus (WSSV). Research on antioxidant system of shrimp showed WSSV infection induces oxidative stress, excessive generation of reactive oxygen species (ROS) involved in the activation of phagocytosis, the main mechanism of cellular immunity. Prevention and control of diseases by regulating the immune response through diet, is a strategy that gradually working its way through aquaculture, which may at any time displace to chemotherapy. Currently, investigations have focused on the responses that shrimp have (metabolic and physiological) to components in the diet as well as the identification of genes responsible for these changes at molecular level. These studies have led to the development of a new research field known as nutritional genomics or nutrigenomics. In this study we evaluated the effects of exposure by immersion three strains with probiotic effect, two isolated from the marine environment [*Debaryomyces hansenii* (DH5 and DH6)] and the other citrus [*D. hansenii* (LL1)], and diets supplemented with an immunostimulant (β -glucan) and antioxidants (β -carotene and vitamin E) on the antioxidant response of shrimp, as well as exploring the possibility of identifying genes differentially expressed under immunostimulation and at the same time challenged with WSSV. Treatments used during exposure to *D. hansenii* were: 1) control (without yeast), 2) DH5 (1×10^4 CFU / mL), 3) DH5 (1×10^6 CFU / mL), 4) DH6 (1×10^4 CFU / mL), 5) DH6 (1×10^6 CFU / mL) and 6) β -1,3-glucan (0.20 mg / mL). Inoculation treatments in the culture water was repeated after each refill for 15 days, except β -1,3-glucan was added a dose every 7 days. There were significant differences ($p < 0.05$) in the total count of hemocytes in DH6 treatments and LL1 (1×10^6 CFU / mL) compared with control. The shrimp treated with β -1,3-glucan increased significantly ($p < 0.05$) the values of the enzymatic activity of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) in hemocytes. On the other hand, the additives were evaluated alimentations β -1,3-glucan, vitamin E and β -carotene in the diet in proportion 0.1, 0.01 and 0.01% respectively. The shrimp were fed daily for 23 days and then infected with WSSV. We determined the antioxidant activity of SOD and CAT in hepatopancreas and muscle at 0, 1, 6, 12, 24 and 48 h after infection. Juveniles treated with vitamin E and β -1,3-glucan remained an increase in SOD activity from 12 to 48 h post-infection. Shrimp fed β -carotene increased the SOD activity before WSSV challenge and those were fed β -1,3-glucan and vitamin E also increased CAT activity before the challenge. CAT activity in muscle was increased with regards to the control group

with all groups treated shrimp from 1 to 6 h after infection with WSSV. The antioxidant activity was highest in shrimp fed with vitamin E. Juveniles fed with vitamin E and then infected with WSSV, recorded 100% mortality at 72 h, but those were fed β -1,3-glucan and β -carotene resisted infection until 144 h. Regarding analysis of expression, the results showed that mMnSOD transcript was more abundant in all tissues of the CAT transcript, observed in the greatest abundance of pleopods mMnSOD hepatopancreas and the greater abundance of CAT. Likewise, there was an induction of expression with respect to time in the expression levels of CAT transcripts in hepatopancreas and mMnSOD. The relative expression levels significantly higher ($p < 0.05$) of CAT occurred at 12 h in organisms challenged with WSSV without immunostimulatory with β -1,3-glucan and 24 h in organisms challenged and immunostimulatory. Also at 12 h shows the highest relative expression ($p < 0.05$) of mMnSOD in immunostimulatory organisms and at 24 h in challenged shrimp without immunostimulator and immunostimulatory shrimp and challenged with WSSV. Identification of 5 genes involved in the resistance of organisms challenged with WSSV and immunostimulating with β -1,3-glucan was possible using the suppression subtractive hybridization. The results of this study showed that it is possible to increase the antioxidant capacity of juvenile shrimp in two ways, through food and diving. Diets supplemented with β -carotene and β -1,3-glucan increased the activity of antioxidant enzymes and increased the number of days of survival in shrimp with respect to control. Vitamin E and *D. hansenii* showed antioxidant potential by increasing the activity of SOD and CAT.

Keywords: Nutrigenomics, antioxidant enzymes, WSSV, shrimp

Angela Campa

VoBo.

Felipe

DEDICATORIA

*A mi madre y hermano por transmitirme el espíritu
de trabajo y la fuerza de voluntad.*

*Esta es la raíz de la raíz,
el brote del brote,
el cielo del cielo
de un árbol llamado vida,
que crece más alto
de lo que el alma puede esperar
o la mente ocultar.
Es la maravilla que mantiene
a las estrellas separadas.
Llevo tu corazón.
Lo llevo en mi corazón.*

[E.E. Cummings (1894-1962) fragmento]

AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. (CIBNOR) por la oportunidad de realizar este trabajo de investigación y continuar con mi formación profesional, con especial gratitud a todo el personal de posgrado por su orientación y apoyo incondicional.

Al CONACyT por el apoyo recibido a través de la beca otorgada durante esta etapa estudiantil (101552).

Al Departamento de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICYT), que me recibió durante una corta estancia de investigación. Mi sincero agradecimiento al Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont, a la M. en C, Alicia Becerra, MaryFer, Erika, Azu, César, Alberto y Pablo por todo el apoyo académico brindado y por todos los agradables momentos que llenaron día a día mi estancia en la ciudad de San Luis Potosí y en la belleza inolvidable de la huasteca potosina.

Agradezco a los miembros de mi comité tutorial, al Dr. Felipe Ascencio Valle por todo el apoyo brindado y la dirección de este trabajo de investigación, a los Doctores Martha Zarain Herzberg y Humberto Villarreal Colmenares por su disposición, tiempo y por sus valiosos comentarios que enriquecieron el presente documento de tesis.

Mi eterno agradecimiento al Dr. Ángel Isidro Campa Córdova, por ser conmigo más que un director de tesis un amigo, que estuvo siempre apoyándome en los momentos más difíciles, por alentarme a seguir adelante y darme la confianza de que esto llegaría a buen término.

Agradezco infinitamente la Dra. Gracia Gómez, por apoyarme en todo momento, por ser mi amiga y tranquilizarme siempre en los momentos más difíciles y de mayor desesperación que me tocaron vivir durante éste periodo de mi vida, a sus hijas Grecia y Sol por hacerme olvidar los malos ratos con sus juegos y risas.

A los laboratorios de Patogénesis Microbiana y Biología Molecular de Plantas y a sus respectivos técnicos; María de Jesús Romero (Chulis) y Julio Antonio Hernández (Julito). Por todo el apoyo brindado, por los buenos momentos y risas compartidas.

Al laboratorio de Nutrición Experimental y a su técnica Sandra de la Paz por su apoyo en el mantenimiento de los organismos utilizados durante los bioensayos.

Mi agradecimiento sincero al M. en C. Pablo Monsalvo por facilitarme las instalaciones del laboratorio de Aclimatación y Mantenimiento de Organismos Acuáticos para el mantenimiento de los organismos utilizados para los bioensayos, por las amenas charlas y su apoyo incondicional.

Al Dr. Roberto Civera Cerecedo y al M. en C. Ernesto Goytortúa Bores por su apoyo en la elaboración de las dietas y las facilidades prestadas en el laboratorio de Nutrición Acuicola.

Al Dr. Amaury Cordero por facilitarme las instalaciones del Bioterio para la realización de los bioensayos.

A mi compañero de generación y amigo Alejandro Ramos que juntos aprendimos a navegar contra corriente en innumerables ocasiones.

Quiero agradecer a mis amigos Gore, Ale y Erick por toda la solidaridad, lealtad y amistad, que me brindaron durante todos estos años, por las muchas tardes y madrugadas llenas de risas, por convertirse en una extensión de mi familia, “mi familia paceña”. Así lo hicieron también los Sres. Leonardo Reyes y Candelaria de Reyes (mis abuelitos) mi eterno agradecimiento por haberme brindado un hogar para vivir, por nuestros breves pero muy agradables encuentros y charlas.

A mis colegas y amigas Irasema y Diana por todas las palabras de aliento, por la solidaridad brindada y sobre todo por las innumerables tardes de sano e intelectual esparcimiento en el majestuoso manglar del Comitán.

Quiero agradecer sinceramente a todos mis compañeros actuales de los laboratorios de Patogénesis Microbiana y Biología Molecular de Plantas y a los que ya no están pero con los que conviví a lo largo de estos años, por darme una gran lección de vida: “En la vida, nada ni nadie es lo que parece” y que la ausencia no significa nada si compartimos la maravilla de las estrellas “llevo tu corazón conmigo lo llevo en el corazón”.

CONTENIDO

LISTA DE FIGURAS	V
LISTA DE TABLAS	IV
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	5
2.1. Generalidades de la biología de camarones peneidos	5
2.2. Importancia económica	7
2.3. Síndrome del virus de la mancha blanca (WSSV)	8
2.4. Inmunidad innata en camarones	9
Mecanismos de defensa celular	10
Mecanismos de defensa humoral	11
2.5. Sistema antioxidante	13
2.5.1. Especies reactivas al oxígeno	13
Oxígeno singlete	13
Anión superóxido	14
Peróxido de hidrógeno	14
Radical hidroxilo	14
Especies reactivas de Nitrógeno	15
2.5.2. Defensa antioxidante	16
Enzimas antioxidantes	16
Antioxidantes no enzimáticos	18
2.6. Efecto de inmunoestimulantes sobre camarones	20
2.7. Nutrigenómica	21
3. JUSTIFICACIÓN	24
4. HIPÓTESIS	24
5. OBJETIVOS	24
5.1. Objetivo general	24
5.2. Objetivos específicos	25
6. METODOLOGÍA	26
6.1. Bioensayo del efecto antioxidante de levaduras	26
6.1.1. Preparación de dietas	26
6.1.2. Organismos experimentales	26
6.1.3. Diseño experimental	26
6.1.4. Obtención y conteo de hemocitos circulantes (CHT)	27
6.1.5. Cuantificación de proteína (CP)	28
6.1.6. Evaluación de enzimas antioxidantes	28
6.2. Primer bioensayo de inmunoestimulación y estrés oxidativo	28
6.2.1. Aditivos alimenticios	28
6.2.2. Preparación de dietas	29
6.2.3. Análisis químicos	30

6.2.4. Hidroestabilidad de las dietas	30
6.2.5. Organismos experimentales	33
6.2.6. Obtención de tejido infectado con WSSV	33
6.2.7. Preparación del inóculo	33
6.2.8. Diseño experimental	34
6.2.9. Infección experimental	34
6.2.10. Colección de muestras	35
6.2.11. Medidas sanitarias	35
6.2.12. Diagnóstico de WSSV por PCR de organismos infectados	35
6.2.13. Evaluación de enzimas antioxidantes	36
6.3. Análisis estadístico	36
6.4. Obtención de ARNm	37
6.5. Construcción de Genoteca Sustractiva	37
6.5.1. Hibridación por Supresión Sustractiva (SSH)	38
6.5.2. Análisis de los clones	38
6.5.3. Secuenciación del ADN plasmídico	39
6.6. Tercer bioensayo. Expresión génica	39
6.6.1. Diseño experimental	39
6.6.2. Extracción de ARN y síntesis de ADN complementario (ADNc)	40
6.6.3. Diseño de primers	41
6.6.4. PCR tiempo real (qPCR)	41
6.6.5. Análisis de expresión	42
7. RESULTADOS	43
7.1. Exposición por inmersión a tres cepas de <i>Debaryomyces hansenii</i> (<i>D. hansenii</i>)	43
7.1.1. Conteo Total de Hemocitos (CTH)	43
7.1.2. Cuantificación de proteína (CP)	44
7.1.3. Actividad de la superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT)	44
7.2. Bioensayo 2.- Inmunoestimulación de camarón café (<i>F. californiensis</i>) e infección experimental con WSSV	46
7.2.1. Composición química de las dietas	46
7.2.2. Crecimiento	47
7.2.3. Mortalidad posterior a la infección experimental con WSSV	47
7.2.4. Conteo total de hemocitos (CTH)	49
7.2.5. Actividad de enzimas antioxidantes	50
7.3. Bioensayo 3.- Análisis de expresión ARN mensajero (ARNm) de Catalasa (CAT) y MnSOD mitocondrial (mMnSOD)	52
7.3.1 Distribución de ARNm de las enzimas CAT y mMnSOD en tejidos de camarones <i>F. californiensis</i> sin inmunoestimulación y sin exposición a WSSV	52
7.3.2. Análisis de la expresión de Catalasa (CAT) y MnSOD mitocondrial (mMnSOD) en hepatopáncreas de <i>F. californiensis</i> inmunoestimulados y retados con WSSV	53
7.4. Genoteca sustractiva (SSH)	58
7.4.1. Identificación de genes inducidos en juveniles <i>F. californiensis</i> inmunoestimulados con β -glucano y retados con WSSV	58
Similar a DIPAS (DIPLA 1 Antisense) de humanos	58
Similar al factor activador plaquetario acetilhidrolasa (PAFAH1B1) isoforma Ib, subunidad alfa de 45kDa de humanos	59

Similar a una proteína con dominio de dedos de zinc FYVE de humanos	60
Similar a Heg de humanos y a una nuclear caseína quinasa	60
Similar a la subunidad 1 activadora de proteasoma	61
8. DISCUSIÓN	62
8.1. Discusión general	62
8.2. Evaluación del efecto de <i>Debaryomyces hansenii</i> sobre la respuesta antioxidante de <i>L. vannamei</i>	63
8.3. Evaluación del efecto de los aditivos alimenticios sobre el crecimiento, mortalidad y concentración de hemocitos totales	66
8.4. Actividad de enzimas antioxidantes	68
8.5. Análisis de expresión de enzimas antioxidantes en tejidos de <i>F. californiensis</i>	70
8.6. Efecto del β -1,3-glucano en la expresión de CAT y mMnSOD	71
8.7. Genoteca sustractiva (SSH)	73
9. CONCLUSIONES	75
10. RECOMENDACIONES	76
11. LITERATURA CITADA	77
12. ANEXOS	105

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Vista lateral de la morfología de los camarones peneidos (Modificado de Dall 1990).6

Figura 2. Conteo Total de Hemocitos Circulares (CTH) en juveniles de camarón blanco *L. vannamei* expuestos durante 15 días a dos concentraciones diferentes (1×10^4 y 1×10^6 UFC mL⁻¹) de levadura marina (*Debaryomyces hansenii*) DH5, DH6 y a una única concentración (0.02 mg L⁻¹) de β -1,3-glucano de laminarina en el primer bioensayo (a), y en el segundo bioensayo (b) a tres concentraciones distintas (1×10^4 , 1×10^5 y 1×10^6 UFC mL⁻¹) con la cepa LL1(*Debaryomyces hansenii*) aislada del limón y a β -1,3-glucano de laminarina. (*) Denota diferencias significativas respecto al control ($P < 0.05$). 43

Figura 3. Contenido de proteínas totales en juveniles de camarón blanco *L. vannamei* expuestos durante 15 días a dos concentraciones diferentes (1×10^4 y 1×10^6 UFC mL⁻¹) de levadura marina (*Debaryomyces hansenii*) DH5, DH6 y a una única concentración (0.02 mg L⁻¹) de β -1,3-glucano de laminarina en el primer bioensayo (a) y en el segundo bioensayo (b) a tres concentraciones distintas (1×10^4 , 1×10^5 y 1×10^6 UFC mL⁻¹) con la cepa LL1(*Debaryomyces hansenii*) aislada del limón y a β -1,3-glucano de laminarina. (*) Denota diferencias significativas respecto al control ($P < 0.05$). 44

Figura 4. Actividad de SOD en hemocitos de juveniles de camarón blanco *L. vannamei* expuestos durante 15 días a dos concentraciones diferentes (1×10^4 y 1×10^6 UFC mL⁻¹) de levadura marina (*Debaryomyces hansenii*) DH5, DH6 y a una única concentración (0.02 mg L⁻¹) de β -1,3-glucano de laminarina en el primer bioensayo (a) y en el segundo bioensayo (b) a tres concentraciones distintas (1×10^4 , 1×10^5 y 1×10^6 UFC mL⁻¹) con la cepa LL1(*Debaryomyces hansenii*) aislada del limón y a β -1,3-glucano de laminarina. (*) Denota diferencias significativas respecto al control ($p < 0.05$). 45

Figura 5. Actividad de CAT en hemocitos de camarón blanco *L. vannamei* expuestos durante 15 días a dos concentraciones diferentes (1×10^4 y 1×10^6 UFC mL⁻¹) de levadura marina (*Debaryomyces hansenii*) DH5, DH6 y a una única concentración (0.02 mg L⁻¹) de β -1,3-glucano de laminarina en el primer bioensayo (a) y en el segundo bioensayo (b) a tres concentraciones distintas (1×10^4 , 1×10^5 y 1×10^6 UFC mL⁻¹) con la cepa LL1(*Debaryomyces*

- hansenii*) aislada del limón y a β -1,3-glucano de laminarina. (*) Denota diferencias significativas respecto al control ($P < 0.05$). 46
- Figura 6.** Peso promedio con las diferentes dietas probadas durante los 23 días del bioensayo. Diferencias significativas ($P < 0.05$) entre Caroteno (a), Vitamina E (b) y el resto de los tratamientos y el control. 47
- Figura 7.** Electroforesis de extracción de ADN con el kit IQ-2000 (Farming Intelligene Tech. Corp, USA) en gel de agarosa/Sybr Safe al 1%. El control y los tratamientos se indican como sigue: Control (C); Caroteno (Car); Vitamina E (VE); y Glucano (G). Las llaves invertidas muestran los tiempos de muestreo. Los signos (-) y (+) son los controles. 48
- Figura 8.** Gel de agarosa/Sybr Safe al 1%. Carril 1.- Corresponden a organismos colectados vivos; Carril 2.- organismos muertos, ambos del día 7 post-infección. Carril 3 y 4 corresponden a los controles. 48
- Figura 9.** Mortalidad (%) de juveniles de *F. californiensis* infectados con WSSV. Los camarones fueron alimentados previamente con β -caroteno, β -1,3 glucano y vitamina E durante 23 días. 49
- Figura 10.-** Representación grafica del comportamiento de la concentración de hemocitos, en cada uno de los tratamientos y el control, durante el reto con WSSV. Barras verticales = error estándar; *diferencias significativas ($P < 0.05$). 50
- Figura 11.** Actividad relativa de SOD en hepatopáncreas (a) y músculo (b) de juveniles de *F. californiensis* infectados con WSSV. La dieta de los camarones fue suplementada con β -caroteno, β -1,3 glucano y vitamina E durante 23 días antes del reto con WSSV. *Significativamente diferente al grupo control ($P < 0.05$). 51
- Figura 12.** Actividad relativa de CAT en hepatopáncreas (a) y músculo (b) de juveniles de *F. californiensis* infectados con WSSV. La dieta de los camarones fue suplementada con β -caroteno, β -1,3 glucano y vitamina E durante 23 días antes del reto con WSSV. *Significativamente diferente al grupo control ($P < 0.05$). 52
- Figura 13.** Análisis de qPCR de CAT y mMnSOD en diferentes tejidos de camarón. 53
- Figura 14.** Gel de agarosa/Sybr Safe al 2%. MPM: Marcador de peso molecular organismos; Carril 1: CAT (tm 60°C) 266pb; Carril 2: CAT (tm 62°C) 266 pb; Carril 3: mMnSOD (tm 60°C) 449 pb; Carril 4: qPCR2L8 (gen endógeno) 180 pb. 54
- Figura 15.** Cambio en la expresión de CAT en juveniles de *F. californiensis* inmunoestimulados con β -glucano. El nivel de expresión fue normalizado con el gen L8 del grupo control (-) (no inmunoestimulados no retados). Las diferencias significativas fueron determinadas con un análisis de varianza de una vía (ANOVA). Barras verticales = DESVEST; las letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$). 54
- Figura 16.** Cambio en la expresión de CAT en juveniles de *F. californiensis* retados con WSSV sin inmunoestimar. El nivel de expresión fue normalizado con el gen L8 del grupo control (-) (no inmunoestimulados no retados). Las diferencias significativas fueron determinadas con un análisis de varianza de una vía (ANOVA). Barras verticales = DESVEST; las letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$). 55

1. INTRODUCCIÓN

El sistema inmune de los organismos se ha desarrollado para protegerlos de sustancias extrañas y microorganismos potencialmente dañinos (Lee & Söderhäll, 2001). Durante la evolución, se han desarrollado dos tipos de sistemas que proveen defensa interna contra agentes infecciosos, el sistema inmune innato (natural) y el adquirido (adaptativo) (Lee & Söderhäll, 2002). Mientras que la inmunidad adquirida solo aparece en vertebrados y opera a través de los linfocitos, la inmunidad innata es filogenéticamente más antigua y se encuentra en todos los organismos multicelulares, representa la primera línea de defensa ayudando a limitar las infecciones en las etapas tempranas (Fearon, 1997). La inmunidad innata en camarones como en todos los invertebrados, está expresado en dos mecanismos de acción: mecanismos de inmunidad humoral, como son la activación del sistema profenoloxidasa (proPO), la síntesis de péptidos antimicrobianos y la activación del sistema de coagulación y los mecanismos de inmunidad celular, que consisten en la fagocitosis, encapsulación, formación de nódulos y producción de componentes reactivos de oxígeno (Ji *et al.*, 2009).

A pesar de toda la batería de mecanismos inmunes con que cuentan los camarones, su cultivo es amenazado por diversas enfermedades infecciosas que han causado grandes pérdidas económicas alrededor del mundo, afectando el desarrollo sustentable de esta industria (Lightner y Redman, 1998). Por lo tanto, las investigaciones en términos de inmunidad son fundamental para el control de enfermedades y son de particular interés el estudio de las respuestas de camarones a enfermedades infecciosas (Robalino *et al.*, 2007). Los camarones son susceptibles a una amplia variedad de patógenos, que incluyen parásitos, hongos, bacterias y virus (Lightner, 1999). Entre éstos últimos, se conocen cerca de veinte diferentes tipos capaces de infectar a los camarones. Destacan por sus efectos negativos en la industria de cultivo, el virus de la necrosis infecciosa hipodérmica y hematopoyética (IHHNV), el virus del síndrome del taura (TSV) y el virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV por sus siglas en inglés) (Lightner *et al.*, 1997).

WSSV es altamente virulento, las mortalidades acumuladas en estanques de cultivo pueden alcanzar el 100% dentro de los 3 a 10 días de la aparición de la enfermedad (Flegel, 1997). Los signos clínicos incluyen anorexia, letargia y coloración rojiza del cuerpo (Ota *et al.*, 1999). La infección por WSSV se caracteriza por ser una infección sistémica, afectando órganos y tejidos tanto de origen mesodermal como ectodermal (Lo *et al.*, 1996a), como lo demuestra la presencia de células degeneradas, con núcleos hipertrofiados en tejidos de organismos infectados (Chang *et al.*, 1996).

Cuando un organismo se encuentra bajo estrés biótico, como lo es una infección por un patógeno, se generan rutas metabólicas anormales provocadas por la reducción repentina del oxígeno molecular, generando estrés oxidativo (Ranby y Rabek, 1978), que es definido como un desequilibrio en la producción de especies reactivas al oxígeno (EROs) y las defensas antioxidantes (Halliwell y Gutteridge, 1996). Efectos negativos debido a la acumulación de EROs son el incremento en las reacciones de oxidación de radicales libres (RL) que pueden dañar membranas celulares, inactivar enzimas, dañar material genético y otros componentes celulares vitales (Chien *et al.*, 2003). Investigaciones sobre el sistema antioxidante de camarones mostraron que la infección con WSSV induce estrés oxidativo, por la generación excesiva de EROs implicadas en la activación de la fagocitosis (Mohankumar y Ramasamy, 2006). Las EROs son conocidas por ser los componentes más importantes en las respuestas de defensa contra microorganismos patógenos en crustáceos (Muñoz *et al.*, 2000). El anión superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el oxígeno singlete y el radical hidroxil (OH^\cdot) son altamente microbicidas (Bachere *et al.*, 1995; Muñoz *et al.*, 2000).

Para reducir los efectos negativos de EROs es esencial un efectivo sistema de defensa antioxidante para mantener la homeostasis celular (Livingstone, 2001). Este sistema está integrado por componentes no enzimáticos; antioxidantes de bajo peso molecular, entre los que se encuentran pequeñas moléculas hidrosolubles como son la vitamina C y moléculas liposolubles como carotenoides y la vitamina E (Packer, 1991; Liu *et al.*, 2007) y componentes enzimáticos, como son superóxido dismutasa (SOD) y Catalasa (CAT) encontradas en todos los organismos de respiración aerobia (Halliwell y Gutteridge,

1996). Se sabe que el sistema de defensa antioxidante y el sistema inmune están ligados estrechamente en la respuesta a patógenos (Holmblad y Söderhäll, 1999). Por lo tanto, las implicaciones que el sistema de defensa antioxidante tiene en el desarrollo de las enfermedades a través de su habilidad para limitar la producción de estrés oxidativo, inducido por el estallido respiratorio y/o efectos deletéreos por condiciones medioambientales y escasamente estudiado en camarones, podría ser de vital importancia (Castex, 2010).

Se ha reportado que los inmunoestimulantes aumentan la resistencia a enfermedades infecciosas en peces y crustáceos, mejorando los mecanismos inmunes no específicos (innatos) (Sakai, 1999). Varios inmunoestimulantes, como son los β -1,3-glucanos derivados de *Schizophyllum commune* (Chang *et al.*, 2003), peptidoglican obtenidos de *Bifidobacterium thermophilum* (Itami *et al.*, 1998), lipopolisacáridos procedentes de *Pantaea agglomerans* (Takahashi *et al.*, 2000), vitamina C (Lee y Shiau, 2003), vitamina E (Lee y Shiau, 2004), alginato de sodio (Cheng *et al.*, 2005) y levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* (Burgents *et al.*, 2004) y *Debaryomyces hansenii* (Sukumaran *et al.*, 2010), han sido administrados como aditivos alimenticios para regular la inmunidad innata de camarones de las especies; *Penaeus monodon*, *P. japonicus* y *L. vannamei*. La prevención de enfermedades regulando la respuesta inmune a través de la dieta, es una estrategia que poco a poco se está abriendo camino en la acuicultura, pudiendo en un momento dado desplazar a la quimioterapia (Verlhac y Kiron, 2004). Como resultado de los trabajos anteriores, actualmente, las investigaciones se han enfocado a las respuestas que tiene el camarón (metabólica y fisiológicamente) a componentes presentes en la dieta, así como a la identificación de genes responsables de tales cambios a nivel molecular (Chávez-Calvillo, *et al.*, 2010). Estos estudios han dado lugar al desarrollo de un nuevo campo de investigación conocido como genómica nutricional o nutrigenómica (Gilles y Faha, 2003).

La nutrigenómica representa una nueva aproximación de las investigaciones en nutrición, que une la aplicación de poderosas tecnologías de la genómica funcional (transcriptómica, proteómica, metabolómica), con la bioinformática técnicas epidemiológicas, nutricionales y bioquímicas (Palou *et al.*, 2002). Entre sus objetivos

esenciales está el determinar los efectos y mecanismos por los cuales la alimentación, sus componentes individuales y la combinación de ellos regulan los procesos metabólicos dentro de las células y tejidos del organismo (Palou *et al.*, 2004).

En el presente trabajo se evaluaron los efectos de la exposición a tres cepas con efecto probiótico; dos aisladas del medio marino [*Debaryomyces hansenii* (DH5 y DH6)] y la otra de cítricos [*D. hansenii* (LL1)], y a dietas suplementadas con un inmunoestimulante (β -glucano) y los antioxidantes (caroteno y vitamina E) sobre la respuesta antioxidante de camarones, además de explorar la posibilidad de identificar genes diferencialmente expresados bajo tales condiciones alimenticias y al mismo tiempo retados con WSSV.

2. ANTECEDENTES

2.1 Generalidades de la biología de camarones peneidos

Los camarones penaeoidea forman parte del antiguo grupo de los Natantia, en el cual fueron ubicados por Boas (1880) como los peneidea (Tabla 1). Como tales, presentan un cuerpo alargado adaptado a la natación, ya sea en la columna de agua o sobre la superficie del fondo (Hendrickx, 1995). Al igual que los demás crustáceos decápodos, estos organismos poseen un caparazón que recubre la cabeza (o cefalón), un tórax (8 segmentos) ambos unidos en un cefalotórax y un abdomen (6 segmentos). Los maxilípedos son los tres primeros pares de apéndices, modificados para manipular la alimentación, le siguen 5 pares de apéndices caminadores (pereiópodos). En el abdomen se concentran cinco pares de apéndices nadadores denominados pleópodos. Los ojos, siempre en par, pedunculados y móviles, son generalmente funcionales en este grupo (Bell y Lightner, 1998; Hendrickx, 1995; Baily-Brock y Moss, 1992) (Figura 1).

Phylum:	Arthropoda
Subphylum:	Crustacea
Clase:	Malacostraca
Orden:	Decapoda
Familia:	Penaeidae
Género:	Litopenaeus (Pérez-Farfante, 1969)
Especie:	vannamei (Bonne, 1931)
Género:	Farfantepeneaus (Burukovsky, 1997)
Especie:	californiensis (Holmes, 1900)

Tabla 1. Taxonomía de los camarones peneidos (ITIS Report)

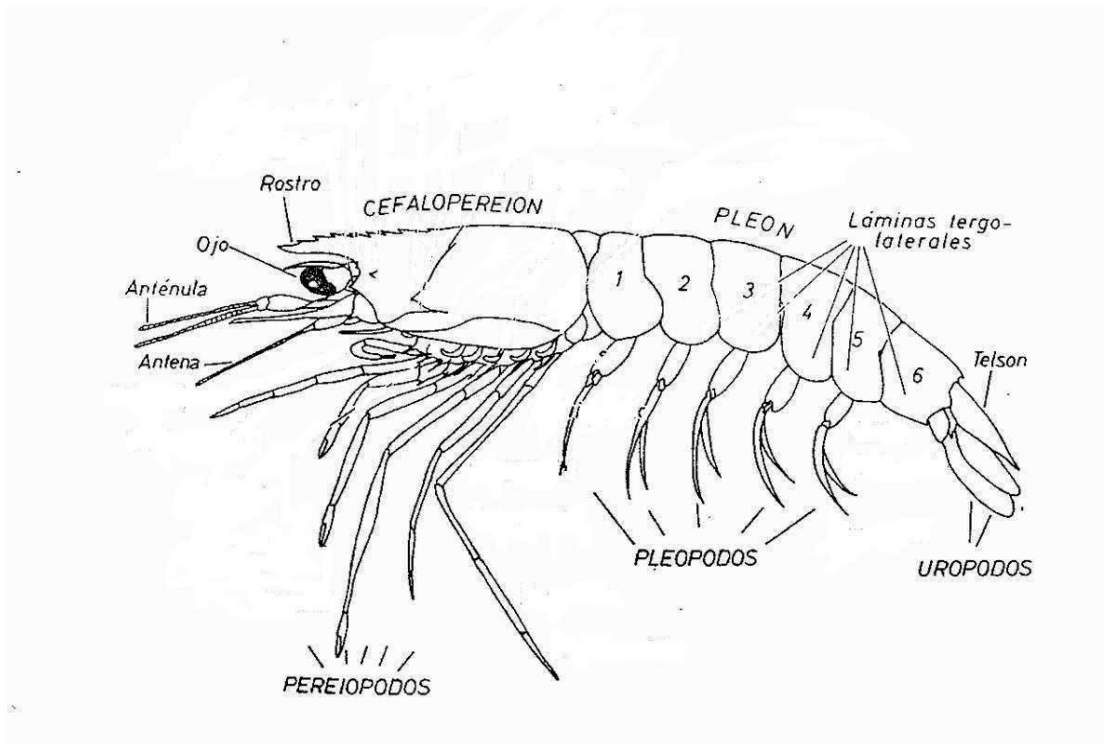


Figura 1. Vista lateral de la morfología de los camarones peneidos (Modificado de Dall, 1990).

Los peneidos tienen un sistema circulatorio abierto (Alpuche *et al.*, 2005). Es decir, el corazón que se encuentra localizado dorsalmente en el cefalotórax impulsa la sangre (hemolinfa) hacia los vasos sanguíneos que desembocan en los senos o lagunas tisulares llamados hemocele, irrigando todos los órganos del cuerpo y donde el intercambio de sustancias se lleva a cabo (van de Braak *et al.*, 2002). Después de pasar por las branquias, la hemolinfa regresa al corazón ingresando por los ostiolas (válvulas que impiden el flujo retrogrado) (Bauchau, 1981). El hepatopáncreas ocupa gran parte del cefalotórax. Esta glándula digestiva se compone de los divertículos del intestino, los espacios entre estos túbulos hepatopancreáticos son los senos o lagunas tisulares y su principal función es la absorción de nutrientes, almacenamiento de lípidos y producción de enzimas digestivas (Johnson, 1980). Además, sintetiza y secreta numerosas proteínas implicadas en la defensa inmune, tales como péptidos antimicrobianos (AMPs) (Ried *et al.*, 1996); β -1,3-glucano ligando a proteínas (Roux *et al.*, 2002), y lectinas (Sekine *et al.*, 2001). Así mismo, el

hepatopáncreas secreta enzimas antioxidantes involucradas en la respuesta antioxidante y estrés oxidativo incluyendo catalasa y superóxido dismutasa (Borkovic *et al.*, 2008).

El ciclo de vida del camarón inicia en la plataforma continental, cuando los adultos se reproducen, los huevos fecundados son liberados al océano y quedan a merced de las corrientes marinas donde eclosionan como larvas nauplio. Todos los estadios larvarios son de vida planctónica, por lo que son arrastrados por las corrientes hacia la zona costera. Durante la fase de postlarva, estas migran hacia las lagunas estuarinas en busca de zonas de refugio y alimentación, los camarones permanecen en estas áreas salobres con vegetación sumergida y son utilizadas como áreas de crecimiento durante 7 a 9 meses, antes de migrar nuevamente al mar a donde llegan como adultos (Alpuche *et al.*, 2005).

Al igual que en otros mares, las especies de camarones Penaeidae del Pacífico americano presentan una distribución netamente tropical. Este es el caso de las cinco especies de mayor interés para la acuicultura y la pesca. Estas 5 especies (*Litopenaeus vannamei*, *L. stylirostris*, *L. occidentalis*, *F. brevirostris* y *F. californiensis*) se encuentran distribuidas desde las costas de California hasta Perú (Hendrickx, 1995) y de ellas, sólo *F. californiensis* penetra en aguas templadas (Hendrickx, 1996).

2.2. Importancia económica

En el mundo se producen alrededor de 6 millones 400 mil toneladas de camarón, de esta cantidad, se estima que un 45%, esto es 1 millón 872 mil toneladas, se destinan a los mercados mundiales con un valor aproximado a los 12,820 millones de dólares (FIRA 2009). El mercado de camarón en los principales países importadores creció con una tasa media de crecimiento anual del 6.45%, de 2002 con 878 mil toneladas a 2008 con 1 millón 278 mil toneladas esto es un incremento del 145% en tan solo 7 años. No obstante en la actualidad los mercados presentan un lento crecimiento del 1.18% producto de la crisis económica mundial (FAO, 2009).

En México, el camarón fue la especie pesquera que mayor actividad económica generó durante el año 2009, se pescaron y cultivaron un poco más de 162 mil toneladas de camarones, con un valor comercial total de 8 mil millones de pesos esta suma representó 46.8% de los ingresos pesqueros totales en el país (Conapesca, 2009).

La pesquería del camarón en el pacífico mexicano se sostiene principalmente de 4 especies de peneidos: *F. californiensis*, *L. stylirostris*, *L. vannamei* y *F. brevirostris*. De éstas, el camarón café es el más abundante. Se ha estimado que cerca del 70% de las capturas que provienen del Golfo de California corresponden al camarón café (*Farfantepenaeus californiensis*) (Morales-Bojórquez, 2001). Recientemente la sustentabilidad de las pesquerías comerciales de peneidos, se ha visto amenazada por la sobrepesca, destrucción del hábitat, contaminación y la dispersión de enfermedades infecciosas liberadas al medio, por granjas acuícolas establecidas en la zona costera (Páez-Osuna, 2005).

2.3. Síndrome del virus de la mancha blanca (WSSV)

El agente responsable de la enfermedad de la mancha blanca es un virus de forma ovoide a bacilariforme con un apéndice en forma de flagelo en la parte terminal. Tiene un genoma circular de doble cadena de ADN, el tamaño varía 293 a 307 kbp (van Hulten *et al.*, 2001a; Yang, 2001). Los reportes iniciales lo catalogaron como un baculovirus de no-oclusión, pero subsecuentes análisis de su secuencia genética rechazaron esta afirmación (Lightner, 1999). Otros investigadores como Vlak *et al.*, (2005) basado en toda la información reunida sobre la morfología, el genoma y análisis filogenéticos lo catalogó como miembro del género *Whispovirus* dentro de una nueva familia llamada *Nimaviridae*. La literatura sin embargo le ha nombrado de diferentes maneras, la más generalizada de ellas como Virus de la Mancha Blanca ó WSSV por sus siglas en inglés (OIE, 2000). Los camarones infectados con WSSV, se vuelven letárgicos, muestran reducción en el consumo de alimento y expansión de cromatóforos en todo el cuerpo. La tasa de mortalidad puede alcanzar el 100 % en los estanques de cultivo sobre todo en organismos bajo condiciones de

estrés, en la primera semana después del inicio de la enfermedad (Lightner *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1999). Los cambios histopatológicos observados están caracterizados por una amplia degeneración celular, severa hipertrofia nuclear y presencia de cuerpos de inclusión en tejidos de origen ectodérmico y mesodérmico (Lo *et al.*, 1996b; Wang *et al.*, 1999).

Los primeros reportes del virus de la mancha blanca se dieron en Japón, Taiwán y China continental entre 1991 y 1993 (OIE, 2000). Posterior a esta fecha se ha reportado prácticamente en todo el este y sureste asiático (Chang *et al.*, 1999). En el continente americano se reportó por primera vez en Texas, EE.UU. (Lightner, 1997). Para el año de 1999 al menos ocho países de Latinoamérica lo reportaron, Colombia, Ecuador, Guatemala, Honduras, México, Nicaragua, Panamá y Perú (Subasingue *et al.*, 2001). Desde su aparición en Asia, WSSV ha sido el agente infeccioso de peneidos, que mayores pérdidas económicas ha causado a la industria del cultivo de camarón a nivel mundial (Chen, 1995; Flegel *et al.*, 1997). Lo anterior, implica un riesgo potencial, debido a que los sistemas acuícolas son abiertos, es decir, están en contacto directo con el medio ambiente poniendo en riesgo a poblaciones silvestres con enfermedades infecciosas. En este sentido, WSSV infecta un amplio rango de crustáceos acuáticos, poliquetos marinos, y larvas de algunos insectos acuáticos (Lightner *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1999; Sahul Hameed *et al.*, 2003; Flegel, 1997; Ramírez-Douriet *et al.*, 2005). Si bien, en muchas de estas especies ha sido inducida la infección experimentalmente, otras se han colectado del medio silvestre y han dado positivo por PCR a este virus (Escobedo-Bonilla *et al.*, 2008). Esto indica, que muchas de estas especies no necesariamente son hospederos naturales, si no que pueden ser organismos portadores de este agente infeccioso.

2.4. Inmunidad innata en camarones

Una característica clave de la inmunidad innata, es su habilidad para limitar las infecciones en las primeras horas posteriores a la transmisión de la enfermedad. Esto es posible debido a que el sistema inmune innato es disparado por patrones moleculares conservados, presentes en las paredes celulares de la mayoría de los patógenos pero no en

los tejidos propios del hospedero y que se les conoce de manera genérica como: patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) (Janeway, 1989). Los receptores celulares encargados del reconocimiento de los PAMPs se denominan receptores de reconocimiento de patrones (PRR: Pattern Recognition Receptor), los cuales se han seleccionado en el transcurso de la evolución para reconocer estructuras o productos microbianos (Janeway y Medzhitov, 1998). Estos productos pueden ser: lipopolisacáridos (LPS) de bacterias Gram negativas, glicolípidos de micobacterias, ácido lipoteicoico de bacterias Gram positivas, monosacáridos (manosas) de levaduras, ARN de doble cadena de virus, β -1,3-glucano de hongos y levaduras (Hoffmann *et al.*, 1999). El reconocimiento de estas moléculas desencadenan diferentes respuestas de defensa como son: defensa celular y defensa humoral (Lee y Söderhäll, 2002).

2.4.1 Mecanismos de defensa celular

Las reacciones de respuesta celular son llevadas a cabo directamente por los hemocitos. Estas células sanguíneas se cree pueden ser análogas a los leucocitos de vertebrados y están clasificados en tres tipos dependiendo de la presencia y tamaño de gránulos citoplasmáticos: hialinos, semi-granulares y granulares (Holmblad y Söderhäll, 1999). Aunque la proporción y la función de los hemocitos puede variar de una especie a otra, en general se considera que los hemocitos granulares y semi-granulares son capaces de producir melanina por medio del sistema pro-fenoloxidasa (Johansson y Söderhäll, 1988), en cambio los hemocitos hialinos y en menor proporción los semi-granulares son responsables de realizar el proceso de fagocitosis (Giulianini *et al.*, 2007).

La fagocitosis es la más común de las reacciones de defensa celular, proceso durante el cual células fagocíticas reconocen y se unen a partículas extrañas como bacterias, esporas, virus o células envejecidas del propio organismo y posteriormente son internalizadas en una vacuola llamada fagosoma donde son destruidas (Vázquez *et al.*, 1998; Kim, 2006). La formación de nódulos y la encapsulación son respuestas multicelulares para eliminar las partículas extrañas, que por su tamaño, no pueden ser fagocitadas por células individualmente (Vázquez *et al.*, 1998). Cuando la invasión se

produce por una excesiva cantidad de microorganismos, que no pueden ser fagocitados, los hemocitos proceden a formar nódulos o bien encapsularlos (Bayne, 1990).

2.4.2 Mecanismos de defensa humoral

Las reacciones de respuesta humoral involucran la liberación y activación de moléculas almacenadas dentro de los hemocitos. En los crustáceos el sistema profenoloxidasa (proPO) está localizado en forma de proenzima (zimógeno) en vesículas de hemocitos granulares y semigranulares (Söderhäll y Cerenius, 1992). Este sistema al ser estimulado por los PAMPs, se manifiestan reacciones en cascada de serín proteasas que rompen el zimógeno proPO pasando a su forma activa fenoloxidasa (Kim, 2006). Esta enzima es responsable de la oxidación de fenoles en quinonas, siendo esta última precursora de la melanina, pigmento pardo-negro al cual, se le adjudican diversas propiedades biológicas tal como la inhibición de la actividad de enzimas bacterianas y fúngicas (Smith y Söderhäll, 1983).

Ligado a la activación del sistema proPO por serín proteasas, el sistema de coagulación también es activado durante este proceso (Iwanaga *et al.*, 1998). Forma parte importante de las reacciones de defensa en crustáceos, previniendo la pérdida sanguínea (hemolinfa) a través de las heridas en el exoesqueleto y evitando la diseminación de patógenos por todo el cuerpo (Martin *et al.*, 1991). Como reflejo de la heterogeneidad de los invertebrados, existen diferentes sistemas de coagulación de la hemolinfa (Wang *et al.*, 2001). En camarones la coagulación es iniciada por la activación y lisis de hemocitos hialinos, los cuales liberan transglutaminasa (TGasa) dependiente de Ca^{2+} que cataliza la polimerización de la proteína coaguladora (CP) que se encuentra en el plasma y de esta manera formar el coágulo que cubre la herida (Yeh *et al.*, 1999).

En términos de mecanismos humorales, los péptidos antimicrobianos son efectores clave en la destrucción y eliminación de patógenos (Rowley y Powell, 2007). Estas proteínas se sintetizan en los hemocitos, se almacenan en los gránulos citoplasmáticos en

forma inactiva y se liberan en respuesta a un estímulo (van de Braak *et al.*, 2002). Estos péptidos son proteínas que presentan actividad antibacteriana (bacterias Gram positivas), antifúngica, antiparasitaria, antiviral y hasta antitumoral (Supungul *et al.*, 2004). Se han aislado de diversos organismos desde plantas hasta animales superiores (vertebrados) (Bartlett *et al.*, 2002) y su modo de acción es perforando e interrumpiendo la síntesis de la membrana celular de microorganismos patógenos (Yeaman y Yount 2003). Las penedinas, son péptidos antimicrobianos aislados del plasma y hemocitos de *P. vannamei*. Se han caracterizado 3 tipos con alta homología nombradas peneidina 1, 2 y 3. Su actividad antimicrobiana está dirigida predominantemente hacia bacterias Gram positivas y hongos (Destoumieux *et al.*, 1997, 1999).

Las lectinas de la hemolinfa de crustáceos, también presentan actividad antimicrobiana. Son glicoproteínas sin actividad catalítica que se encuentran en la mayoría de los seres vivos, presentan uno o más dominios conservados de reconocimiento a carbohidratos, capaces de discriminar y unirse alternativamente a mono y oligosacáridos en solución o en la superficie celular (Costa *et al.*, 2011). En camarones, las lectinas tipo C (dependientes de Ca^{2+}) han mostrado su participación en la respuesta inmune innata, actuando como proteínas antimicrobianas y antivirales (Zhao *et al.*, 2009), de reconocimiento a PRR (Ji *et al.*, 2009), aglutinando y encapsulando hasta su eliminación patógenos (Wang *et al.*, 2009b), además de funcionar como opsoninas incrementando la eficiencia de la fagocitosis (Kawasaki *et al.*, 1989). Se ha documentado que su nivel de expresión es regulada transcripcional y transduccionalmente después de una infección viral y bacteriana (Soonthornchai *et al.*, 2010).

Otra proteína que presenta propiedades antimicrobianas es la lisozima. Esta proteína cataliza la hidrólisis de las paredes celulares de bacterias (Prager y Jollés, 1996). La lisozima en camarones peneidos ha sido bien caracterizada, es una proteína específica de hemocitos que posee actividad lítica en contra de bacterias Gram positivas y Gram negativas, incluyendo a *Vibrio* spp. (de la Re Vega *et al.*, 2006). Su actividad enzimática es específica en hemocitos lisados y se estima que comprende el 4% de la proteína total de hemocitos en *L.vannamei* (Sotelo-Mundo *et al.*, 2003).

2.5. Sistema antioxidante

El oxígeno es vital para los procesos de vida aeróbica. Sin embargo, alrededor del 5% del oxígeno respirado, se reduce por mecanismos mono o divalente a especies parcialmente reducidas y reactivas conocidas como especies reactivas de oxígeno (EROs) (Harman, 1999; Halliwell y Gutteridge, 1989). De esta manera, los organismos aeróbicos, están continuamente generando EROs en respuesta tanto a estímulos externos como internos y los intermediarios reactivos de oxígeno (IROs), como anión superóxido ($\cdot\text{O}^{-2}$), oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) producidos durante este proceso son altamente tóxicos a microorganismos, por lo que son reconocidos por tener un papel importante en la defensa inmune, además de intervenir en múltiples procesos biológicos (Lambeth, 2004). Cuando el balance entre la producción de EROs y las defensas oxidantes se pierde producen estrés oxidativo, lo que puede ocasionar daño en membranas celulares, material genético y otros componentes celulares (Liu *et al.*, 2007). Cuando se produce una reacción en cadena generada por un estrés oxidativo agudo o crónico, puede provocar daños masivos en tejidos y órganos ocasionando incluso la muerte del organismo (Chien *et al.*, 2003).

2.5.1. Especies reactivas al oxígeno

Oxígeno singlete

En su estado basal el oxígeno molecular (O_2) no es reactivo, sin embargo durante la actividad metabólica y bajo ciertas condiciones de factores de estrés abióticos y bióticos (temperaturas extremas, radiación, enfermedades, etc), puede alcanzar excesivos estados de excitación y reactividad, dando lugar a radicales libres (Scandalios, 2005). El $^1\text{O}_2$ se produce por varias rutas químicas y fotoquímicas, frecuentemente se produce por reacciones de fotosíntesis, en donde las moléculas absorben luz de una longitud de onda específica alcanzando un estado de alta energía, en este estado puede interactuar directamente con otras moléculas transfiriendo la energía adicional a otra molécula blanco (Asada y Takahashi, 1987).

Anión superóxido

En sistemas biológicos, el $\cdot\text{O}^{-2}$ puede actuar tanto como oxidante o como reductor, su dismutación produce H_2O_2 espontáneamente o por catálisis de la enzima antioxidante superóxido dismutasa (Fridovich, 1998). Durante el proceso de fagocitosis los hemocitos hialinos liberan agentes citotóxicos con el fin de eliminar microorganismos patógenos, esto se conoce como explosión respiratoria y es acompañado de un rápido incremento en el consumo de oxígeno (Rosales, 2006). La explosión respiratoria es activada por la estimulación de la membrana del hemocito y tras dicha estimulación, la enzima NADPH oxidasa presente en la membrana celular reduce el O_2 en $\cdot\text{O}^{-2}$ (Roos *et al.*, 2003).

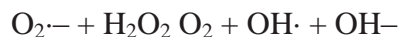
Peróxido de hidrógeno

La reducción del anión superóxido produce peróxido de hidrógeno, el cual no es un radical libre, es un intermediario reactivo de oxígeno, porque todos sus electrones están apareados (Loschen *et al.*, 1974). A menudo, la reducción de algunos productos de oxígeno son referidos erróneamente como radicales libres, porque químicamente un radical libre es definido como un átomo o molécula que en su orbital más extremo de su estructura tiene un electrón sin aparear (Velázquez-Paniagua *et al.*, 2004). La ausencia de carga, le permite al H_2O_2 difundirse fácilmente a través de las membranas celulares, no se encuentra dentro de compartimentos celulares (Fridovich, 1998). La exposición a H_2O_2 puede dañar directamente muchos componentes celulares, también está involucrado en rutas como muerte celular programada o apoptosis (Halliwell y Gutteridge, 1999). La bien conocida reactividad del H_2O_2 no se debe a su reactividad *per se*, requiere la presencia de una metal reductor, como es el caso del Fe para formar el altamente reactivo y tóxico radical hidroxilo (Fridovich, 1998).

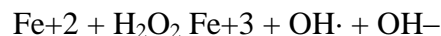
Radical hidroxilo

Es el más reactivo de los radicales de oxígeno, con un fuerte potencial de daño biológico porque es capaz de reaccionar con todas las moléculas (Halliwell y Gutteridge, 1999). Tiene una vida muy corta *in vivo* (del orden de 10^{-7} segundos), lo que le permite

actuar únicamente en el lugar de su formación o en su proximidad (Pastor *et al.*, 2000). Se genera a partir del anión superóxido y del peróxido de hidrógeno mediante la reacción de Haber-Weiss:



Sin embargo, como el peróxido de hidrógeno y el superóxido no pueden reaccionar directamente *in vivo*, la activación es catalizada por iones de metales en transición (hierro y cobre), siendo los iones hierro, aparentemente los más probables promotores de las reacciones de los radicales libres (Liochev y Fridovich, 1994). Esta reacción ocurre según se describe en la llamada reacción de Fenton:



El daño biológico causado por el $\cdot\text{OH}$ que mejor se ha estudiado, es la reacción en cadena conocida como peroxidación lipídica o lipoperoxidación. Cuando este radical se forma cerca de las membranas celulares, puede atacar los ácidos grasos presentes en los fosfolípidos que las constituyen, preferentemente los poli-insaturados como el ácido araquidónico (Korc *et al.*, 1995).

Especies reactivas de Nitrógeno

Muchas células también producen óxido nítrico, o monóxido de nitrógeno ($\text{NO}\cdot$), que es sintetizado a partir de la L-arginina por la enzima óxido nítrico sintetasa. El $\text{NO}\cdot$ puede reaccionar con el $\cdot\text{O}^-$ para formar el anión peroxinitrito (ONOO^-) un potente agente oxidante (Fang, 2004). Cumple funciones de señalización importantes en el control de la presión y flujo sanguíneo, su solubilidad es similar a la de H_2O , por lo que se difunde fácilmente a través de las membranas celulares (Moncada *et al.*, 1991). Es muy tóxico dado que puede aumentar la toxicidad del superóxido al reaccionar con él y formar peroxinitrito y en ciertas condiciones, se descompone dando lugar a la formación del radical hidroxilo y dióxido de nitrógeno (NO_2) (Marla *et al.*, 1997).

2.5.2. Defensa antioxidante

La mitocondria es la principal responsable de la transformación de energía a través de la fosforilación oxidativa, proporcionando el adenosín trifosfato (ATP) requerido para la función celular (Skulachev, 1999). Durante éste proceso se consumen grandes cantidades de oxígeno, y se estima que del 0.2 al 2% se transforma en $\cdot\text{O}^{-2}$, por lo que se considera que el 90% de la producción basal de las EROs proviene de este orgánulo celular (Balaban *et al.*, 2005). De tal manera, que es necesario que existan defensas que detoxifiquen dentro y fuera de la mitocondria y para ello el aspecto nocivo de las EROs es contrarrestado por mecanismos antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos.

Enzimas antioxidantes

La Superóxido dismutasa (SOD) (EC 1.15.1.1), representa la primera línea de defensa contra el estrés oxidativo, pertenece a un familia de metaloenzimas que requieren de un metal como cofactor y de acuerdo con el grupo metálico que contengan se dividen en 3 clases (Fridovich, 1974): cupro-zinc superóxido dismutasa (Cu/Zn-SOD), manganeso superóxido dismutasa (Mn-SOD) y ferro-superóxido dismutasa (Fe-SOD). En crustáceos decápodos se conocen 2 tipos de MnSOD: citosólica (cMnSOD) y mitocondrial (mMnSOD), la primera carece de un péptido de tránsito por lo que es retenida en el citosol y la segunda es transportada a la mitocondria con la ayuda de un péptido de tránsito mitocondrial después de la traducción (Brouwer *et al.*, 2003). La función de SOD es catalizar la dismutación de los radicales superóxido en peróxido de hidrógeno y oxígeno que pasan libremente a través de las membranas celulares.

En camarones la actividad de la SOD ha sido estrechamente relacionada con la estimulación inmune, enfermedades y estatus de salud (Itami *et al.*, 1994; Chang *et al.*, 1999, 2003; Campa-Córdova *et al.*, 2002; Mohankumar y Ramasamy, 2006; Wang y Chen, 2006; Cheng *et al.*, 2007; Chiu *et al.*, 2007). Así mismo, aunque son escasos los trabajos, se han investigado los cambios en los perfiles de expresión tanto de cMnSOD y mMnSOD bajo diferentes estímulos (inmunoestimulantes, infección por parásitos y virus) en

hemocitos y hepatopáncreas (Cheng *et al.*, 2005; Gómez-Anduro *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2008).

La Catalasa (CAT) (EC 1.11.1.6) Es una hemoproteína formada por cuatro subunidades idénticas de aproximadamente 50-60 Kd, se localiza en la matriz de la mitocondria y en los peroxisomas (García *et al.*, 2000). Cataliza la descomposición de H₂O₂ a agua y oxígeno, protegiendo de esta manera a las células del daño oxidativo producido por H₂O y .OH (Chelikani *et al.*, 2005). Esta enzima es una de las más eficientes, no es saturada bajo ninguna concentración de H₂O₂ y juega un papel importante en la adquisición de tolerancia al estrés oxidativo en la respuesta adaptativa de las células (Hunt *et al.*, 1998; Lledías *et al.*, 1998).

Se ha detectado la actividad de catalasa en varias especies de crustáceos, como el langostino *Macrobrachium malcolmsonii* (Arun *et al.*, 2003), el cangrejo *Carcinus maenas* (Orbea *et al.*, 2000), el camarón rojo *Aristeus antennatus* (Mourente y Díaz-Salvago, 1999) y el camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (Tavares-Sánchez *et al.*, 2004). También se ha determinado su actividad como defensa antioxidante ante diferentes factores de estrés, como son radiación solar, en los anfípodos *Pallasea cancelloides*, *Eulimnogammarus verrucosus* y *Gammarus lacustris* (Timofeyev, 2006), infecciones por bacterias del género *Vibrio* en *L. stilyrostris* (Castex *et al.*, 2010) y de WSSV en *Fenneropenaeus indicus* (Mohankumar y Ramasamy, 2006). Así mismo, se ha estudiado el efecto que vitaminas, probióticos e inmunoestimulantes tienen sobre su actividad (Liu *et al.*, 2007; Castex *et al.*, 2010; Gopalakrishnan *et al.*, 2011, respectivamente) y en su perfil de expresión (Zhang *et al.*, 2008; Ji *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2010).

La Glutación peroxidasa (GPX) (EC 1.11.1.9) es una enzima tetramérica formada por cuatro subunidades idénticas y cada una con un átomo de selenio, es encontrada en el citosol y mitocondrias de tejidos de animales (Halliwell y Gutteridge 1999). GPx comparte sustrato con la CAT, reduce los hidroperóxidos de ácidos grasos y el H₂O₂ usando como agente reductor el glutatión reducido (GSH) (Sies *et al.*, 1997). La GPx y la glutatión

reductasa (GSH) se encuentran formando parte de un sistema antioxidante (GPx/GSH), y la CAT de otro (SOD/CAT). Se ha observado que ambos sistemas no actúan a la par; la CAT actúa en presencia de altas concentraciones de H₂O₂ y la GPx lo hace a concentraciones bajas, lo que demuestra una correlación inversa en la actividad de ambas enzimas.

La actividad de GPx se ha detectado en el cangrejo *Carcinus maenas* (Orbea *et al.*, 2000), en branquias y hepatopáncreas de *M. rosenbergii* (Dandapat *et al.*, 2003) y en *Fenneropenaeus chinensis* (Ren *et al.*, 2009). Además, se ha determinado que la actividad de GPx puede ser modificada por la suplementación de vitamina E y alginato de sodio en el alimento de *M. rosenbergii* y *L. vannamei* respectivamente (Dandapat *et al.*, 2000; Cheng *et al.*, 2005).

Antioxidantes no enzimáticos

El ácido ascórbico o vitamina C, es un antioxidante soluble que se pierde fácilmente por lixiviación (Coklin, 1995). Posee un alto potencial reductor, permitiéndole participar en la reducción directa del oxígeno y funcionando de esta manera como sustrato donante en las reacciones de las peroxidasas (Mayes, 1997). Así mismo, inhibe la formación de radicales superóxido, radical hidroxilo e hidroperóxidos de lípidos (Halliwell y Gutteridge, 1999; Chao, 2002).

En la acuicultura se tiene conciencia de la importancia de la vitamina C. Mientras que la mayoría de los animales pueden sintetizar esta vitamina, los peces y crustáceos carecen de la enzima gulonolactona oxidasa, que es necesaria para su biosíntesis (Chatterjee, 1973). La deficiencia de esta vitamina en la dietas de camarones causa disminución del crecimiento, problemas durante la muda, menor resistencia al estrés y altas mortalidades (He y Lawrence, 1993a). Su función antioxidante ha sido propuesta para asegurar una mayor resistencia de *P. monodon*, *F. japonicus* y *L. vannamei* a factores de estrés medioambiental y a infecciones bacterianas (Kontara *et al.*, 1995; Montoya y Molina, 1995; Merchie *et al.*, 1998; Teshima, 1998; Lavens *et al.*, 1999; López *et al.*, 2003; Kanagu *et al.*, 2010).

Los Carotenoides son moléculas liposolubles que protegen tanto a plantas y animales del estrés oxidativo. Mientras que las plantas producen carotenoides de *novo*, los animales deben adquirirlo en la dieta (Krinsky 1989). Estos pigmentos pueden proteger las células del estrés oxidativo eliminando las EROs que causan daño a las células y prevenir la peroxidación de lípidos en animales marinos (Miki *et al.*, 1994). La función de los carotenoides en la acuicultura va desde pigmentación, funciones antioxidantes, como fuente de provitamina A, protección celular de daño fotodinámico, aumento del potencial reproductivo y de crecimiento, además de incrementar la resistencia a enfermedades bacterianas (Meyers y Latcha, 1997; Supamattaya *et al.*, 2005). Existen algunas investigaciones que sugieren que estos pigmentos, pueden ser de vital importancia para el crecimiento y el éxito reproductivo de crustáceos. Sin embargo, los resultados reportados por varios autores aún son contradictorios (Liñan-Cabello *et al.*, 2002).

El α -tocoferol (vitamina E), es un antioxidante liposoluble que remueve las EROs de las células (Fridovich, 1998). Debido a su naturaleza hidrofóbica, se localiza exclusivamente dentro de la bicapa lipídica de la membrana celular de plantas, mientras que los animales deben adquirirla en la dieta (Halliwell y Gutteridge, 1999). Las propiedades del α -tocoferol son resultado de su habilidad para eliminar tanto el anión superóxido y los peróxidos, representa la primera línea de defensa contra la peroxidación lipídica y del colesterol de las membranas celulares (Frigg *et al.*, 1990).

Investigaciones han demostrado que la vitamina E actúa sobre el sistema inmune y antioxidante de langostinos *Macrobrachium rosenbergii* y camarones *P. monodon* y *L. vannamei* incrementando la actividad de enzimas antioxidantes y su resistencia a cambios de salinidad (Lee y Shiau 2004; Liu *et al.*, 2007).

2.6. Efecto de inmunoestimulantes sobre camarones

Los niveles de respuesta inmune varían entre las diferentes especies de crustáceos, por lo cual se considera que ciertos factores tanto ambientales como fisiológicos contribuyen de manera importante en la inmunidad de estas especies (Vázquez *et al.*, 1998). Investigaciones actuales, sobre el sistema inmune de camarones, han demostrado que es posible aumentar la resistencia a enfermedades mediante la ingestión de aditivos alimentarios llamados inmunoestimulantes (Carrillo-Fuentes, 2000). Estos compuestos, se encuentran disponibles como tratamientos alternativos, actuando como moléculas de alarma que activan el sistema inmune. La mayoría son compuestos químicos los cuales se encuentran como elementos estructurales de bacterias, micelios de hongos y levaduras, que accidentalmente se han encontrado que poseen propiedades inmunoestimulantes (Raa, 1996). Las levaduras son bien conocidas en el área de nutrición animal por producir poliaminas, las cuales incrementan la maduración intestinal (Peulen *et al.*, 2000). Además, se ha reportado que dietas suplementadas con algunas cepas vivas de *Saccharomyces cerevisiae* y *Debaryomyces hansenii* estimulan el sistema inmune de peces y camarones (Gatesoupe 2007; Soltanian *et al.*, 2007). En este sentido, se ha demostrado que *Debaryomyces hansenii* estimulan tanto el sistema inmune como antioxidante de peces expuestos a patógenos (Reyes-Becerril *et al.*, 2008a).

A nivel experimental, los aditivos alimentarios más utilizados para evaluar los efectos que provocan sobre el sistema inmune de camarones retados con WSSV han sido los LPSs y los β -1,3/1,6 glucano (Itami, *et al.*, 1998; Chang *et al.*, 1999, 2003). Los β -glucanos son estructuralmente conjuntos de homopolímeros de glucosa, generalmente aislados de paredes de bacterias, hongos, algas, cereales, levaduras y hongos (Zekovic y Kwiatowski, 2005). Su actividad está influenciada por su grado de divergencia, tamaño y su ultraestructura molecular. Los más activos tienen una estructura en común: consiste en una cadena principal que integran unidades de β -D-glucopiranosil (glucosa) unidas unas a otras en la posición (1,3) con cadenas laterales de β -D-glucopiranosil unidas a la posición (1,6).

Éstas son referidas como beta - 1,3/1,6 glucano (Bohn y BeMiller, 1995; Zekovic y Kwiatowski, 2005).

En camarones, los glucanos o peptidoglicanos han mostrado, que el incremento de la resistencia a enfermedades está relacionado directamente a muchas respuestas celulares y humorales tales como la fagocitosis, el estallido respiratorio, el sistema proPO, y la actividad de enzimas antioxidantes como SOD y CAT (Song *et al.*, 1994; Sung *et al.*, 1996; Song y Huang 2000; Campa-Córdova *et al.*, 2002; Chang *et al.*, 2003). Sin embargo, pocos estudios se han conducido para conocer los efectos de los β -1,3 glucanos sobre el sistema antioxidante a nivel molecular (Wang *et al.*, 2008).

2.7. Nutrigenómica

Mientras que las investigaciones tradicionales sobre nutrición se enfocaban en la deficiencia de nutrientes y en el deterioro de la salud, en la actualidad estos estudios se orientan en la mejora de la salud a través de la dieta (McClean y Graig, 2007). Durante las últimas décadas, estudios clínicos y epidemiológicos, han indicado muchas relaciones entre la nutrición y la salud. La desequilibrada ingesta de nutrientes son conocidos por estar asociados con el desarrollo de enfermedades crónicas que demuestran que los productos químicos alimenticios tienen efectos directos sobre procesos genéticos moleculares (Lau *et al.*, 2008). Los genes se activan y desactivan de acuerdo a las señales metabólicas que el núcleo celular recibe de factores internos, por ejemplo las hormonas, y factores externos como nutrientes, los cuales se encuentran entre los más influyentes de los estímulos ambientales (Harland, 2005).

A principios del desarrollo evolutivo, los nutrientes ingeridos por los organismos funcionaban como señales primitivas que encendían y apagaban las vías de síntesis o de almacenamiento durante los periodos de hambre o en periodos de abundancia de alimento. A medida que los organismos se volvieron más complejos, se conservó la capacidad de responder a las señales que un nutriente o nutrientes ejercen sobre la regulación de la

expresión de genes que codifican a las proteínas del metabolismo energético, la diferenciación celular y del crecimiento (Kaput *et al.* 2005).

Numerosos componentes de la dieta pueden alterar los eventos genéticos y así influir en la salud. Además de los nutrientes esenciales, tales como carbohidratos, aminoácidos, ácidos grasos, calcio, zinc, selenio, ácido fólico y vitaminas A, C y E, hay una gran variedad de componentes bioactivos esenciales que influyen significativamente en la salud (Corthésy-Theulaz, 2005; Trujillo *et al.* 2006). Estos bioactivos esenciales y no esenciales que componen los alimentos se sabe que modifican una serie de procesos celulares relacionada con la prevención de la salud y la enfermedad. A menudo los componentes bioactivos de los alimentos modifican varios procesos simultáneamente (Törrönen *et al.*, 2005).

Los productos químicos alimenticios pueden afectar la expresión de genes directa o indirectamente. A nivel celular, los nutrientes pueden: 1) actuar directamente como ligandos para los receptores de factores de transcripción, 2) son metabolizados por las vías metabólicas primarias o secundarias, alterando así concentraciones de sustratos o intermediarios involucrados en la regulación génica o la señalización celular, o 3) alterar las vías de transducción de señales y la señalización (Kaput *et al.*, 2004; Kaput y Rodríguez 2004).

La secuenciación del genoma humano y de otros organismos ha provocado el desarrollo de toda una serie de metodologías científicas. Estas nuevas áreas de estudio científico generalmente incluyen el sufijo “ómicas”. Los avances técnicos han proporcionado nuevas herramientas que permiten un alto rendimiento en el enfoque genómico. De las 50 o más términos “ómicas” acuñados, la nutrigenómica abarca sólo cuatro, nombrados como: transcriptómica o tecnología de microarreglos, el cual supervisa la alteración de los niveles de ARNm presentes en una célula, tejido u órgano (Scheel *et al.*, 2002), proteómica, abarca la determinación de la estructura proteica, la expresión e interacciones moleculares (Kussman *et al.*, 2005), metabolómica, examina los cambios en los metabolitos (intermediarios de bajo peso molecular) involucrados en el metabolismo

(German *et al.*, 2003) y epigenómica, que determina los patrones de metilación, impresión y empaquetamiento del ADN tanto espacial como temporalmente (Beck *et al.*, 1999).

Esta información ha disparado un rápido avance en la industria alimenticia acuícola, que comienza a utilizar las herramientas técnicas comprendidas dentro de la nutrigenómica para entender como diferentes componentes de la dieta influyen los mecanismos moleculares los cuales a su vez determinan la fisiología de camarones (Gillies y Faha, 2003; Paoloni-Giacobino *et al.*, 2003). En este sentido, se ha reportado que la sustitución de proteína animal por proteína vegetal en dietas pueden causar cambios significativos en la expresión de genes de peces, debido al alto contenido de compuestos bioactivos como agentes fitoquímicos, antioxidantes, ácidos grasos poliinsaturados, vitaminas y precursores de vitaminas (Gómez, 2007).

Las respuestas inmunes en los organismos imponen costos energéticos muy altos. Por lo tanto, el requerimiento de nutrientes para un estatus de salud óptimo se espera sea más alto que para su crecimiento. Por otro lado, ciertos nutrientes están especialmente implicados en el incremento de la inmunidad. Estos incluyen algunas vitaminas, minerales, ácidos grasos ω_3 , fosfolípidos, carotenoides y nucleótidos (Merchie *et al.*, 1998; He y Lawrence 1993a; Liu *et al.*, 2007; Lavens y Sorgeloos, 2000; Liñan-Cabello *et al.*, 2002; Supamattaya *et al.*, 2005). Así mismo, existen moléculas ampliamente utilizadas como inmunoestimulantes, los tres más comunes probados en camarones son: Lipopolisacáridos (LPS), glucanos y peptidoglicanos (Newman y Bullies 2001). El efecto que se ha demostrado en la mayoría de estos estudios es un aumento en la resistencia de los camarones a factores de estrés medioambiental y a enfermedades infecciosas, y sólo unos pocos se han enfocado en las implicaciones fisiológicas de los cambios en los niveles de expresión de genes, provocados por los cambios en la dieta (Wang *et al.*, 2008; Chávez-Calvillo *et al.*, 2010).

3. JUSTIFICACIÓN

Los camarones *Farfantepenaeus californiensis*, es una especie que se desarrolla bien a temperaturas más frías que *Litopenaeus vannamei*. Además de tener potencial acuícola, se está trabajando para intensificar su cultivo, particularmente durante el invierno que es factible su rotación con *L. vannamei* (Ocampo *et al.*, 2003; Morán-Morales *et al.*, 2006). Por lo tanto, es fundamental conocer las bases moleculares involucradas en los procesos de defensa que ayudarían a diseñar estrategias para la prevención y control de las enfermedades. Además, los invertebrados comprenden más del 90% de las especies conocidas y el estudio del sistema de defensa de estos organismos, puede proporcionar bases para conocer el origen de la inmunidad de vertebrados y explicar la resistencia o susceptibilidad a infecciones (Beck y Habicht, 1996). En años recientes, los aditivos alimentarios o inmunoestimulantes se han utilizado para aumentar la resistencia de peces y camarones a infecciones bacterianas y virales (Song y Hsieh, 1994; Itami *et al.*, 1998; Chang *et al.*, 1999). Sin embargo, han sido probados por varios autores y los resultados son controversiales, principalmente por la falta de un indicador apropiado de la respuesta inmune del camarón (Chang *et al.*, 1999, 2003).

4. HIPÓTESIS

Si los componentes principales de la pared celular de la levadura *Debaryomyces hansenii* son los glucanos que al igual que la vitamina E y β -caroteno se han reportado son capaces de inhibir la formación de Especies Reactivas de Oxígeno en organismos bajo diferentes factores de estrés a través de la activación de respuestas de defensa celulares y humorales entre las que se encuentran las enzimas antioxidantes SOD y CAT, entonces la administración de *Debaryomyces hansenii* directamente en tanques de cultivo incrementará la actividad de enzimas antioxidantes en camarones. Del mismo modo, dadas las características anteriores, camarones alimentados con dietas suplementadas con β -glucano, vitamina E y β -caroteno tendrán una mayor resistencia a una infección experimental con WSSV. Además, el uso de métodos de tamizaje a gran escala basados en técnicas

genómicas como son las genotecas sustractivas, pueden revelar genes nuevos involucrados en el sistema inmune de camarones.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Determinar si levaduras (*Debaryomyces hansenii*) y aditivos alimenticios como β -glucano, vitamina E y β -caroteno incluidos en dietas para camarones modifican el sistema antioxidante. Además, identificar genes inducidos bajo tales condiciones alimenticias y al mismo tiempo retados con WSSV.

5.2. Objetivos específicos

- 1.- Evaluar la respuesta antioxidante en camarones expuestos a tres cepas de *Debaryomyces hansenii*.
- 2.- Evaluar dietas enriquecidas con β -glucano, vitamina E y β -caroteno, en función a su potencial para proveer de mayor resistencia a camarones infectados con WSSV.
- 3.- Evaluar el efecto de β -glucano, vitamina E y β -caroteno sobre la actividad de enzimas antioxidantes en hepatopáncreas y músculo de *F. californiensis* retados con WSSV.
- 4.- Identificar genes relacionados con el sistema inmune en hepatopáncreas de *F. californiensis* alimentados con β -glucano y retados con WSSV.
- 5.- Evaluar los cambios en la expresión de genes del sistema antioxidante en respuesta a la infección con WSSV en camarones inmunoestimulados.

6. METODOLOGÍA

6.1. Bioensayo del efecto antioxidante de levaduras.

6.1.1. Cultivo de cepas

Las tres cepas experimentales fueron obtenidas de la colección de levaduras del Centro Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR). Dos de las cepas utilizadas fueron aisladas del medio marino [*Debaryomyces hansenii* (DH5 y DH6)] y la otra de cítricos [*D. hansenii* (LL1)]. Previo a los bioensayos, las cepas mantenidas en cri-conservación (-80°C) fueron descongeladas y cultivadas en placas con agar YPD (2% dextrosa, 2% peptona, 1% extracto de levadura, 2% agar) a 30°C por 24 h. Las colonias fueron extraídas del agar y suspendidas en tubo de ensaye conteniendo 10 mL de agua de mar estéril (filtrada con poro de 0.2 µm), la suspensión de levaduras fue concentrada hasta alcanzar una absorbancia de 1.0 a una densidad óptica de 540 nm (colorímetro, Linson 3, USA) equivalente a 1×10^9 UFC/mL. Además, se empleó β-1,3-glucano extraído de la macroalga *Laminaria digitata* (Sigma, L-9634, USA) como inmunoestimulante comercial.

6.1.2. Organismos experimentales

Los organismos para el desarrollo de los bioensayos fueron proporcionados por el laboratorio de genética acuícola del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. (CIBNOR). Los camarones juveniles de *L. vannamei* (8 ± 0.2 g) fueron aclimatados durante 15 días en tanques de fibra de vidrio de 1500 L con agua de mar filtrada (5 µm) a 28°C con aireación continua y fueron alimentados *ad libitum* con una dieta comercial (PIASA, 35% de proteína) por la mañana y la tarde (9:00 y 17:00 h).

6.1.3. Diseño experimental

El primer bioensayo tuvo una duración de 15 días. Los organismos experimentales fueron seleccionados al azar y distribuidos en tinas de fibra de vidrio de 60 L (unidades experimentales). En cada unidad experimental se colocaron 7 camarones, las levaduras y β-1,3-glucano se inocularon en el agua de cada una de las unidades experimentales y los

tratamientos se hicieron por duplicado. La alimentación diaria fue *ad libitum* con la dieta comercial y horario señalados en el punto anterior. Las condiciones de la calidad de agua en las que se mantuvieron fueron: temperatura $28\pm 1^\circ\text{C}$, salinidad: 35 ± 1 ups; oxígeno disuelto: >4 mg/L. Mediante sifoneo se eliminó diariamente la materia particulada del fondo de las unidades experimentales, recuperando enseguida el volumen de agua perdido (80%). Los tratamientos utilizados fueron los siguientes: 1) Control (sin levaduras); 2) DH5 (1×10^4 UFC/mL); 3) DH5 (1×10^6 UFC/mL); 4) DH6 (1×10^4 UFC/mL); 5) DH6 (1×10^6 UFC/mL) y 6) β -1,3-glucano (0.20 mg/mL). Las dosis de levaduras suministradas estuvieron de acuerdo a las reportadas por Reyes-Becerril *et al.* (2008a). Las dosis de laminarina (β -1,3-glucano) se basaron en el trabajo de Campa-Córdova *et al.* (2002). La inoculación de los tratamientos en el agua de cultivo se repitió después de cada recambio, excepto laminarina que se agregó una dosis cada 7 días.

El segundo experimento tuvo la misma duración y condiciones de cultivo que se señalaron en el primer bioensayo. Los tratamientos utilizados fueron los siguientes: 1) Control (sin inmunoestimulante); 2) LL1 (1×10^4 UFC/mL); 3) LL1 (1×10^5 UFC/mL); 4) LL1 (1×10^6 UFC/mL); y 5) β -1,3-glucano (0.20 mg/mL).

6.1.4. Obtención y conteo de hemocitos circulantes (CTH)

La hemolinfa se obtuvo en el periodo de intermuda y se extrajo con jeringas para insulina (27G x 13 mm, BD Plastipak^{MR}, México) a partir de la región ventral del primer segmento abdominal. La jeringa se cargó con una solución isotónica para camarón y EDTA como anticoagulante descrita por Vargas-Albores *et al.* (1996): (SIC- EDTA- Na_2) (NaCl 450 mM, KCl 10 mM, Hepes 10 mM, EDTA- Na_2 10 mM, pH 7.3, 850 mOsm/kg) previamente enfriada a 4°C en una proporción 2:1 (2 volúmenes de SIC-EDTA por cada volumen extraído de hemolinfa). El CTH se realizó conforme a la técnica descrita por Campa-Córdova *et al.* (2002) en donde a 100 μL de hemolinfa con anticoagulante se le aplican 400 μL (1:4) de formaldehído al 4%. Los hemocitos se cuantificaron en una cámara Neubauer, utilizando un microscopio óptico binocular (Olympus CX21, USA) con el objetivo de 400x.

6.1.5. Cuantificación de proteína (CP)

La CP en los hemocitos provenientes de la hemolinfa (mg/mL) se determinó por el método de Bradford (1976), en un lector de micro placa (Modelo 3550, Bio Rad Laboratories, USA) y una prueba de micro-determinación de proteína (N° Cat. 500-0006, Bio-Rad Laboratories, USA) realizándose la lectura a una longitud de onda de 595 nm. Se efectuó una curva a partir de los reactivos estándares que posee la prueba antes señalada.

6.1.6. Evaluación de enzimas antioxidantes

La SOD se determinó por el método descrito por Campa-Córdova *et al.* (2002); Reyes-Becerril *et al.* (2008a). Brevemente, se utilizó NBT en presencia de riboflavina. Se colocaron 10 μ L v/v de hemolinfa y buffer fosfatos de potasio (50 mM, pH 7.8) con 200 μ L de la mezcla de reacción (0.1 mM EDTA, 13 μ M metionina, 0.75 mM NBT, 20 μ M riboflavina, 50 mM buffer de fosfatos, pH 7.8). Esta solución fue expuesta a luz fluorescente (1 min) o cuando el control lograra una densidad óptica de 0.2-0.25 a 570 nm.

La actividad CAT se evaluó con una prueba comercial (Sigma, C-9284). El método determina el decremento de la concentración de peróxido de hidrógeno a una longitud de onda de 240 nm y un coeficiente de extinción de $40 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Se consideró que una unidad de CAT descompone 1 μ mol de $\text{H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1}$ en 50 mM de buffer fosfato a pH 7 ajustando la absorbancia de la solución a 0.5 ± 0.01 . La actividad de CAT fue expresada en términos de unidades (μ moles de substrato transformado a producto min^{-1}) por miligramo de proteína.

6.2. Bioensayo de inmunoestimulación y estrés oxidativo

6.2.1. Aditivos alimenticios

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

6.2.2. Preparación de dietas

Las dietas para camarones fueron formuladas con la ayuda del paquete MIXIT-Win^{MR} (Agricultural Software Consultants, Inc., San Diego, Ca., USA). Para la fabricación de las dietas se siguió la metodología empleada por Civera y Guillaume (1989). Se fabricó un alimento base (control) de acuerdo a los requerimientos nutricios reportados para camarón (Colvin & Brand, 1977; Akiyama y Dominy, 1989;), al cual se le adicionó el aditivo alimenticio a evaluar; la vitamina E se adicionó al 0.01%, el β -glucano se incorporó al alimento base a un nivel de inclusión del 0.1% y el β -caroteno al 0.01% (Tabla 2). Se usó aceite de girasol para compensar el aporte lipídico de los pigmentos carotenoides. Para garantizar una granulometría uniforme y eliminar impurezas de cada ingrediente que pudiera afectar la composición final del alimento, fueron tamizados todos los ingredientes sólidos a través de un tamiz de 250 μ m. Se mezclaron los macroingredientes (harina de pescado, pasta de soya, harina integral de trigo y gluten de trigo) y los microingredientes (premezclas de vitaminas, premezclas de minerales, vitamina C y fosfato dibásico de sodio) en una mezcladora (KITCHEN AID^{MR}) durante 20 minutos (Tabla 3 y 4).

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

6.2.3. Análisis químicos

En las diferentes dietas se determinaron por triplicado la humedad (A.O.A.C.,1995, N° 930.15), proteína cruda (A.O.A.C., 1995, N° 976.05), extracto etéreo (A.O.A.C., 1995, N°. 920.39), fibra cruda (A.O.A.C., 1995, N°. 962.09), cenizas (A.O.A.C., 1995, N° 942.05) y energía (cal/g) en un calorímetro adiabático (Parr 1261).

6.2.4. Hidroestabilidad de las dietas

Se pesaron por triplicado 2 g de cada una de las dietas y se colocaron en matraces Erlenmeyer de 250 ml, los cuales contenían 200 ml de agua destilada a 27°C. El alimento se mantuvo en inmersión durante una hora, sin agitación y el contenido del matraz se filtro a través de un papel filtro Whatman N° 1, previamente secado y pesado, con la ayuda de una bomba de vacío. El papel filtro con el alimento residual se secó en una estufa con flujo de aire a 70 °C por 24 horas. Los cálculos para determinar la estabilidad de las muestras en el agua, fue en base a la siguiente fórmula: %MSR = (PSAR/PSAI) X 100 Donde:

%MSR = Porcentaje de materia seca residual

PSAR = Peso seco del alimento residual

PSAI = Peso seco del alimento inicial

Tabla 2. Composición de las diferentes dietas utilizadas durante el primer experimento.

Ingrediente	Control ©	Glucano	Caroteno	Vitamina E
(g/100 g dieta)	EB Hum	EB Hum	EB Hum	EB Hum
Harina de pescado (HP0607)	29.50	29.50	29.50	29.50
Harina integral de Trigo (HIT0607)	40.25	40.14	40.24	40.23
Pasta de Soya (PSoy0607)	20.00	20.00	20.00	20.00
Aceite de hígado bacalao (AcHB0704)	2.46	2.46	2.46	2.46
Lecitina de soya (LSoy0607)	1.50	1.50	1.50	1.50
Ácido algínico (Sigma A-7128)	2.00	2.00	2.00	2.00
Premezcla vitaminas (VITCRU0604)	1.80	1.80	1.80	1.80
Fosfato dibásico sodio (S-0876)	1.20	1.20	1.20	1.20
Premezcla mineral crus (MINCRUS0409)	0.50	0.50	0.50	0.50
Colesterol (C-8503)	0.50	0.50	0.50	0.50
Cloruro de colina	0.20	0.20	0.20	0.20
Vitamina C (Stay-C 35% aa)	0.09	0.09	0.09	0.09
Glucano (laminaria)	0.00	0.10	0.00	0.00
Caroteno	0.00	0.00	0.01	0.00
Vitamina E	0.00	0.00	0.00	0.01
BHT (ICN101162)	0.004	0.004	0.004	0.004
Emulsión EPAX1040	0.00	0.00	0.00	0.00
Emulsión EPAX4510	0.00	0.00	0.00	0.00

Tabla 3. Composición de la premezcla de vitaminas

Premezcla de Vitaminas	Catálogo		g/kg de premezcla
Vitamina A Acetato (20,000 UI/g)	ICN ¹	160079	5
Vitamina D ₃ (850,000 UI/g)	ICN	160107	0.001
acetato dl-alfa-tocoferol (250 UI/g)	SIGMA ²	T-3376	8
Menadiona (vitamina K)	ICN	102259	2
Tiamina-HCl	ICN	103029	0.5
Riboflavina (B ₂)	ICN	102813	3
Piridoxina-HCl (B ₆)	ICN	102777	1
Pantotenato de Calcio	ICN	101228	5
Ácido nicotínico (B ₃)	ICN	102446	5
Biotina	ICN	101023	0.05
Inositol	ICN	102052	5
Vitamina B ₁₂	ICN	103271	0.002
Ácido fólico	ICN	101725	0.18
alfa-celulosa	SIGMA	C- 8002	865.267

¹ ICN Biomedicals Inc. Ohio, USA. ² Sigma Co. St. Louis, USA

Tabla 4. Composición de la premezcla de minerales

Minerales	Catálogo SIGMA ¹	g/100 g de premezcla
Cloruro de cobalto	C - 2644	0.004
Sulfato de cobre pentahidratado	C - 6917	0.25
Sulfate ferroso	F - 7002	4
Sulfato de magnesio heptahidratado	M - 9697	28.398
Sulfato de manganeso monohidratado	M -3634	0.65
Potasio de yodo	P - 4286	0.067
Selenita de sodio	S - 1382	0.01
Sulfato de zinc heptahidratado	Z - 0501	13.193
alfa-celulosa	C- 8002	53.428
TOTAL		100

¹ Sigma Co. St. Louis, USA

6.2.5. Organismos experimentales

Los organismos silvestres *F. californiensis* fueron capturados en Bahía de La Paz, BCS, y trasladados a las instalaciones del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. (CIBNOR). El lote de aproximadamente 400 juveniles con peso promedio de 1.5 g fueron mantenidos en tanques de fibra de vidrio con capacidad de 300 L con aireación constante, se realizaron recambios diarios del 30-50% y se alimentaron *ad libitum* con alimento peletizado con 30% de proteína. Las condiciones de la calidad de agua en las que se mantuvieron fueron: temperatura $24\pm 1^{\circ}\text{C}$, salinidad: 35 ± 1 ups; oxígeno disuelto: >4 mg L⁻¹. Los organismos se mantuvieron en estas condiciones hasta alcanzar los 1.5 gramos de peso promedio. Antes de iniciar el bioensayo, se llevo a cabo un análisis para determinar si los organismos a utilizar durante el bioensayo se encontraban libres de WSSV utilizando la técnica de la PCR con el kit comercial IQ-2000 (Farming Intelligene Tech. Corp, USA).

6.2.6. Obtención de tejido infectado con WSSV

Los organismos utilizados para llevar a cabo la infección, provienen de brotes de WSSV de granjas acuícolas dedicadas al cultivo de camarón de la zona centro del estado de Sinaloa, durante los meses de Febrero-Marzo del 2008 y mantenido en congelación a -70°C . Para confirmar que el tejido a utilizar es positivo para WSSV, se llevó a cabo una reacción de PCR utilizando el kit comercial IQ-2000 (Farming Intelligene Tech. Corp, USA).

6.2.7. Preparación del inóculo

Previo a la realización de los bioensayos, tejidos de camarones infectados con WSSV y almacenados a -80°C fueron macerados y homogenizados de acuerdo a la metodología descrita por Huang y colaboradores (2001). Los tejidos infectados fueron macerados y homogenizados en una licuadora doméstica (Osterizer® 4655, USA) en proporción 1:4 (v/w) en buffer TN (Tris-HCL 10 mM, NaCl 400 mM, pH 7.4). El tejido fue centrifugado a 6000 rpm durante 20 min a 4°C . El sobrenadante fue filtrado utilizando un filtro estéril Acrodisc® de 5 μm (Gelman Sciences, USA), el producto de esta filtración se

pasó a través de un filtro de membrana de 0.45 μm de poro y finalmente, el producto de esta segunda filtración fue alicuotado y almacenado a -80°C hasta su posterior uso.

6.2.8. Diseño experimental

Se prepararon 5 dietas experimentales y un control, el nivel de inclusión de cada inmunoestimulante que se utilizó, se estableció de acuerdo a experimentos anteriores en donde previamente se determinó la concentración que mejor estimula el sistema de defensa del camarón: Caroteno 0.01%, Glucano 0.1% (Flores-Leyva, 2006; Chang *et al.*, 2003, respectivamente), la vitamina E se suministró en un nivel de 0.01% (Fernández-Giménez *et al.*, 2004). Los organismos de 1.0-1.5 g de peso fueron distribuidos de manera aleatoria en las unidades experimentales de 30 L de capacidad. En cada unidad se colocaron 10 juveniles, y cada dieta fue aleatoriamente asignada, se manejaron 4 réplicas por dieta. En las tablas 1, 2 y 3 se muestran la composición de cada una de las dietas. Los juveniles de *F. californiensis* durante 23 días previos al reto, fueron alimentados *ad libitum*, ajustando la cantidad diariamente en función del alimento consumido. Las condiciones de la calidad de agua en las que se mantuvieron fueron: temperatura $24\pm 1^{\circ}\text{C}$, salinidad: 35 ± 1 ups; oxígeno disuelto: >4 mg/L. Se hicieron recambios de agua diarios del 30%. Se registró diariamente la temperatura (termómetro de mercurio), el oxígeno (oxímetro YSI 55-12FT), pH (Potenciómetro Orión Research Sa250) y salinidad (refractómetro Sper Scientific 300011).

6.2.9. Infección experimental

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

6.2.10. Colección de muestras

Antes del reto fueron colectados de 3-5 organismos por tratamiento, se extrajo la hemolinfa e inmediatamente los organismos fueron congelados en nitrógeno líquido, para la cuantificación de parámetros inmunitarios como: cuantificación de hemocitos totales, actividad fenoloxidasa y enzimas antioxidantes (CAT y SOD). Posterior, al reto con WSSV, se colectaron muestras a las 1, 6, 12, 24 y 48 h y al final del experimento. De cada uno de los tratamientos se sacrificarán de 3-5 camarones y como en la etapa anterior, fueron congelados inmediatamente en nitrógeno líquido, para su posterior análisis.

6.2.11. Medidas sanitarias

Para evitar una contaminación cruzada, el equipo de uso común para las mediciones de parámetros físico-químicos, y todo el material y equipo necesario para llevar a cabo el bioensayo (redes, cubetas, línea de aire, piedras aireadoras, etc.) fue enjuagado cada vez que se utilizó con una solución de cloro al 2%. Otra medida de prevención fue separar físicamente los controles negativos de los acuarios con las replicas de cada bioensayo (Hasson *et al.*, 1995). Además cada uno de los acuarios se cubrió con una malla mosquitera, para evitar que los camarones saltaran fuera de los acuarios. Estas medidas también incluyeron un adecuado lavado y desinfección de todo el material al iniciar y finalizar el experimento. Para la desinfección se utilizó hipoclorito de sodio al 0.05%, neutralizando los residuos de cloro con tiosulfato de sodio al 0.07% (Lotz, 1997a). Por último, el agua producto de los recambios, fue desinfectada por hipercloración con cloro activo en polvo al 90% de pureza por 24 horas (Lotz, 1997 a). Se evitó el tránsito a la sala de bioensayos a personas ajenas al estudio. Así como también, se usaron dentro de la sala, bata de laboratorio y botas de caucho.

6.2.12. Diagnóstico de WSSV por PCR de organismos infectados

A las muestras obtenidas durante el desarrollo de los experimentos, se les disectaron los pleópodos y fueron preservados en congelación hasta su posterior análisis por PCR; esta es una de las herramientas de diagnóstico más efectivas para la detección de WSSV. En

este estudio se llevó a cabo la reacción en cadena de la polimerasa de acuerdo a la técnica descrita por Lo *et al.* (1996b), y siguiendo las recomendaciones del fabricante del kit comercial IQ-2000 (Farming Intelligene Tech. Corp, USA).

6.2.13. Evaluación de enzimas antioxidantes

Para la determinación las enzimas catalasa y superóxido dismutasa, se seccionó del camarón el hepatopáncreas y los 2 primeros segmentos abdominales, los cuales fueron mantenidos en congelación a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el momento de realizar los análisis. De acuerdo a Campa-Córdova *et al.* (2002), la enzima superóxido dismutasa (SOD), es considerada una molécula asociada a la modulación de la respuesta inmune en crustáceos. Para esto, se maceraron aproximadamente 100 mg de tejido (hepatopáncreas y músculo) en 1 mL de buffer fosfatos (50 mM pH 7.0), este extracto crudo se almacenó a -80°C y posteriormente fue utilizado en la determinación de la actividad enzimática. La actividad de SOD se determinó de acuerdo al método descrito por Beauchamp y Fridovich (1971), utilizando NBT en presencia de riboflavina. La actividad específica será calculada en unidades por mg de proteína, utilizando un programa de computadora (Vázquez-Juárez *et al.*, 1993). La actividad enzimática relativa se expresó como la tasa de actividad enzimática de camarones tratados con respecto a la actividad de camarones del control y fue usado como un índice de la actividad de MnSOD. La actividad de la enzima catalasa se determinó utilizando el método Downs *et al.* (2001), El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) es el sustrato de la catalasa, la actividad se determinó sobre la base del cambio de la absorbancia a 240 nm durante 3 min. El cálculo de la actividad se realizó con el empleo del coeficiente de extinción del H_2O_2 igual a $0.04\text{ mM}^{-1}\text{ cm}^{-1}$. Se define la unidad de actividad enzimática como la cantidad de enzima que cataliza la transformación de un μmol de H_2O_2 por minuto bajo las condiciones del ensayo.

6.3. Análisis estadístico

Se hicieron análisis de varianza de un vía (ANOVA). Los valores $P < 0.05$ fueron considerados significativamente diferentes. Cuando se presentaron diferencias

significativas, se utilizó un análisis a *posteriori*, usando la prueba de Tukey (HSD) para identificar la naturaleza de estas diferencias ($p < 0.05$).

6.4. Obtención de ARN mensajero (ARNm)

El ARNm fue aislado del hepatopáncreas utilizando TriPure (Roche, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. El tejido congelado con nitrógeno líquido fue triturado en mortero y homogenizado en 1 mL de TriPure. El homogenizado se centrifugó a 12 000 x g por 10 min, se pasó el sobrenadante a un tubo nuevo de 1.5 mL y se incubó a temperatura ambiente por 5 min. Posteriormente, se agregó 200 μ L de cloroformo, se agitó vigorosamente y se incubó de nuevo a 3 min a temperatura ambiente. A continuación se centrifugó a 12 000 x g, por 5 min, se separó la fase acuosa a un tubo limpio y se precipitó con isopropanol. Se lavó el pellet con etanol al 75%, se decantó el alcohol, se dejó secar, se resuspendió en 30 μ L de agua DEPC y se almacenó a -70°C hasta su uso. Se cuantificó la concentración de ARN total (ARNt) en un espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, USA) y se analizó su integridad por electroforesis en un gel al 1% de agarosa-formaldehído.

6.5. Construcción de Genoteca Sustractiva

La síntesis de ADN complementario (ADNc), la transcripción inversa del ARNm del control y del tratamiento (β -glucano) donde se observó mayor resistencia a WSSV se llevó a cabo utilizando el kit SMART PCR cDNA Synthesis, siguiendo las instrucciones del fabricante (Clontech, USA). En resumen, 1 μ g de ARNt fue mezclado con 7 μ L del primer 3' SMART CDS II A 12 μ M y 7 μ L del oligonucleótido SMART II A μ M. La mezcla fue incubada a 72°C por 2 min en un termociclador DNA Engine (BIO-RAD, USA), después se redujo a 42°C y se agregó a la mezcla 20 μ L de 5X First-Strand Buffer, 2 μ L de DTT a una concentración de 100 mM, 10 μ L de 50X dNTP 10 mM, 2.5 de RNAsa out y 5 μ L de Superscrip II. Incubándose a 42°C por 95 min. Posteriormente, se agregó 2 μ L de EDTA para detener la reacción. A continuación, el ADNc fue purificado por cromatografía de columna para eliminar nucleótidos no incorporados y pequeños fragmentos de ADNc (< 0.1 kb). La primera hebra de ADNc obtenida, fue alicuotada en 80

μL y combinada con 30 μL de 10X Advantage 2 PCR buffer, 6 μL 50X dNTP 10 mM, 6 μL del primer 5' PCR IIA 12 μM , 4.5 μL de la mezcla 50X Advantage 2 polymerase y 173.5 μL de agua desionizada. La mezcla fue amplificada por PCR por 26 ciclos. Estos productos de PCR fueron utilizados para los siguientes experimentos de SSH.

6.5.1. Hibridación por Supresión Sustractiva (SSH)

La SSH se llevó a cabo utilizando el kit PCR-Select cDNA Subtraction (Clontech, USA) y siguiendo las instrucciones del fabricante. En resumen, el ADNc sintetizado con SMART de control y tratamiento fue digerido con la enzima RsaI para generar extremos romos y cortos del ADNc de doble cadena. Después se purificó el ADN digerido, usando un sistema de purificación basado en columnas con matriz sílica utilizando el kit NucleoTrap PCR (Clontech, USA) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Después, de la precipitación del ADN con acetato de amonio 4 M, el ADN del tratamiento fue ligado con el adaptador 1 y con el adaptador 2 al final 5' de cada hebra del ADN del tratamiento. El adaptador 1 ligado y el adaptador 2 ligado fueron hibridados por separado con un exceso del ADN control a 68°C durante 8 h, después de desnaturalizar las muestras a 98°C por 90 min. A continuación, las dos hibridaciones fueron mezcladas y sin desnaturalizar fueron hibridadas a 68°C toda la noche con un exceso del ADN control recién desnaturalizado. La mezcla resultante fue diluida con 200 μL de buffer de dilución. Posteriormente, se llevaron a cabo 2 PCR. En el primer PCR fueron utilizados los primers específicos para el adaptador 1 y el adaptador 2 para amplificar selectivamente el ADN expresado diferencialmente. En seguida, el producto del primer PCR fue utilizado como templado con primers anidados. Finalmente el producto del segundo PCR fue clonado dentro del vector pGEM®-T (Promega, USA), y los productos de la ligación fueron utilizados para transformar células de *E. coli* One Shot® electrocompetentes (Invitrogen). Las células transformadas fueron sembradas en cajas de petri LB/Ampicilina y se incubaron toda la noche a 37°C.

6.5.2. Análisis de los clones

Cada una de las clonas aisladas fueron picadas con palillos estériles, los cuales fueron lavados en 2 μL de agua milli-Q estéril, este volumen fue utilizado como templado

para amplificar por PCR utilizando los primers específicos para el vector de clonación utilizado. Se seleccionaron las clonas que tenían un tamaño de 250 a 600 pb. Estas fueron crecidas en 3 ml de caldo LB adicionado con 50 µg/mL de Ampicilina. El cultivo fue incubado toda la noche a 37°C con agitación constante a 200 rpm. Se tomaron alicuotas de 800 µL para almacenar a -80°C en stock de glicerol al 80%. El volumen restante fue utilizado para la extracción de ADN plasmídico siguiendo el método de Sambrook y colaboradores (1989).

6.5.3. Secuenciación del ADN plasmídico

Los productos clonados fueron secuenciados siguiendo la técnica descrita por Sanger *et al.*, (1977). Como DNA molde se utilizó cada plásmido y como oligonucleótidos se utilizaron el primer universal de M13. La secuenciación la realizó el Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad del CINVESTAV Campus Irapuato.

6.6. Tercer Bioensayo. Evaluación de expresión génica

6.6.1. Diseño experimental

Para el tercer bioensayo se fabricaron dos alimentos base uno que sirvió como control y otro que se formuló como dieta experimental al se le adicionó el aditivo alimenticio a evaluar que en este caso fue el β-glucano y fue incorporado al alimento base a un nivel de inclusión del 0.1%. Las dietas para este tercer bioensayo se prepararon como se describe en el punto 6.2.2. Juveniles de *F. californiensis* con un peso promedio de 1±0.5 capturados en la Bahía de La Paz, BCS, fueron distribuidos de manera aleatoria en 2 grupos; el primero de ellos fue alimentado con la dieta control y el segundo con la dieta experimental durante 23 días previos al reto. La alimentación y mantenimiento de los organismos se llevo a cabo como se describe en el punto 6.2.8. Posterior a la etapa de estimulación, el reto se llevó a cabo con 120 camarones que fueron divididos en 4 grupos, identificados como A, B, C y D. Cada grupo de 30 camarones fue entonces dividido en 3 replicas iguales y colocados en unidades experimentales con capacidad de 30 L. El grupo A fue alimentado con la dieta control (control -), el grupo B fue alimentado con la dieta

control y retado con WSSV (control +), el grupo C fue alimentado con la dieta experimental (β -1,3 glucano) y el grupo D fue alimentado con la dieta experimental y retado con WSSV. Los organismos de los grupos A y C fueron inyectados intramuscularmente con 20 μ L de PBS camarón⁻¹ en el cuarto segmento abdominal con una jeringa de tuberculina de 1 mL. Los organismos de los grupos B y D fueron inyectados con 20 μ L de inóculo de WSSV. De cada grupo experimental se muestrearon 3 camarones a los que se les seccionó el hepatopáncreas, los muestreos se realizaron a la 0 h (antes del reto), 30 min, 6 h, 12 y 24 h posteriores al reto e inmediatamente fueron almacenados a -80°C para la posterior extracción de ARN. Los pleópodos de los organismos muestreados fueron seccionados y colocados en tubos de 1.5 mL y almacenados a -20°C para el diagnóstico de WSSV de acuerdo a la técnica descrita por Lo *et al.* (1996b).

6.6.2. Extracción de ARN y síntesis de ADN complementario (ADNc)

Se aisló el ARN total (ARNt) de hepatopáncreas, músculo, hemocitos, intestino, branquias y pleópodos utilizando TriPure (Roche, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante, su integridad fue confirmada por electroforesis en un gel de agarosa desnaturalizante al 1% (Sambrook, 1989) y su cantidad cuantificada utilizando un espectrofotómetro a 260 nm (NanoDrop 1000 Thermo Fisher Scientific, USA). Para la síntesis de ADNc se empleó el kit QuantiTect Reverse Transcription (QIAGEN, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. El procedimiento del kit comprende 2 pasos principales: eliminación del ADN genómico (ADNg) utilizando un tampón de destrucción de ADNg denominado Wipeout; 1 μ g de ARNt es incubado con 2 μ L de Wipeout a 42°C por 2 min. Después de la eliminación del ADNg el segundo paso es la transcripción reversa usando una mezcla maestra preparada con transcriptasa inversa “Quantiscript”, tampón RT “Quantiscript”, mezcla de primers RT y agua hasta completar un volumen de 20 μ L. La reacción de la RT se llevó a cabo a 42°C durante 15 min y posteriormente inactivada a 95°C durante 3 min. El ADNc obtenido fue almacenado a -20°C hasta ser usado como templado para las reacciones de PCR tiempo real (qPCR).

6.6.3. Diseño de primers

Para el diseño de los primers, se buscaron las secuencias de CAT y mMnSOD en la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI por sus siglas en inglés; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Para CAT se alinearon las secuencias del cangrejo azul (*Portunus trituberculatus*), mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*), camarón chino (*Fenneropenaeus chinensis*) y camarón blanco (*L. vannamei*) (GenBank accession numbers FJ152102, U00145, EU102287 and AY518322, respectivamente) y para mMnSOD se alinearon las secuencias del cangrejo de río (*Procambarus clarkii*), langostino gigante (*Macrobrachium rosenbergii*), camarón chino (*Fenneropenaeus chinensis*), camarón tigre (*Marsupenaeus japonicus*), y camarón café norteño (*Farfantepenaeus aztecus*) (GenBank accession numbers (FJ892724, EU077525, DQ205424, GQ478988, AY211086, respectivamente). Los primers fueron diseñados en el programa en línea PRIMER 3 (http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi), sus secuencias se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 5. Secuencia de los primers utilizados.

Nombre	Primer Fw/Rv	Amplificación
DFcCAT2	GGAGAGGCCGTCTACTGCAAG/ ACGGCCTACTGGGATGAGTGG	266
DFcmMnSOD1	TGGAACCTGTCATCTGTGCCG/ TAGGCATGCTCCCACACATCG	449
qPCR2L8	TAGGCAATGTCATCCCCATT/ TCCTGAAGGAAGCTTACACG	180

6.6.4. PCR tiempo real (qPCR)

La PCR en tiempo real se ensambló con el reactivo *SsoFast*TM *EvaGree*[®] *supermix* (BIO-RAD USA). Las reacciones fueron efectuadas en el equipo Rotor-GeneTM 6000 Real Time rotary analyzer (Corbett Life Science, USA) mediante el uso del software Rotor-Gene

Q-Pure Detection versión 1.7. Los volúmenes de la reacción se detallan a continuación y el programa para la amplificación de los genes se detalla en la tabla 6.

Tabla 6. Volúmenes de cada componente de la reacción de qPCR

Componente	Concentración inicial	Volumen	Concentración en la reacción
SsoFast EvaGreen supermix	2X	7.5	1X
Primer Fw	10 μ M	0.3	400 nM
Primer Rv	10 μ M	0.3	400 nM
Agua libre de DNAsas/RNAsas	-	1.9	-
Total*		10	

*El volumen de ADNc usado fue de 5 μ L (dilución 1:20) para obtener un volumen final de 15 μ L

Tabla 7. Condiciones de PCR para los fragmentos de CAT, mMnSOD y qPCR2L8

Procedimiento	Temperatura	Tiempo	N° de ciclos
Activación de la enzima	95°C	30 s	1
Desnaturalización	95°C	10 s	
Alineación	60°C	20 s	40
Extensión	72°C	30 s	
Análisis de disociación	65°C-95°C con incrementos de 0.5°C	5 s por incremento	-

6.6.5. Análisis de expresión

El equipo proporcionó los valores de C_T de los 3 genes, CAT, mMnSOD y qPCR2L8, los cuales fueron exportados a una hoja de cálculo de Microsoft Office Excel para su análisis correspondiente. Para el análisis de la expresión relativa de los 3 genes se utilizó el método $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (Livak y Schmittgen, 2001).

7. RESULTADOS

7.1. Exposición por inmersión a tres cepas de *Debaryomyces hansenii* (*D. hansenii*)

7.1.1. Conteo Total de Hemocitos (CTH)

El CTH obtenido en el presente trabajo tras la aplicación de las diferentes cepas y dosis de levaduras se observa en la Figura 2a. Se detectó un incremento significativo ($p < 0.05$) en los tratamientos con las cepas DH6 (14×10^6 hemocitos mL^{-1}) y LL1 (6×10^6 hemocitos mL^{-1}) de *D. hansenii* en la dosis de 1×10^6 UFC mL^{-1} comparada con los grupos controles ($3-4 \times 10^6$ hemocitos mL^{-1}). β -1,3-glucano de laminarina y demás dosis de levadura no generaron incrementos significativos de CTH comparados con sus respectivos grupos control (Figura 2b).

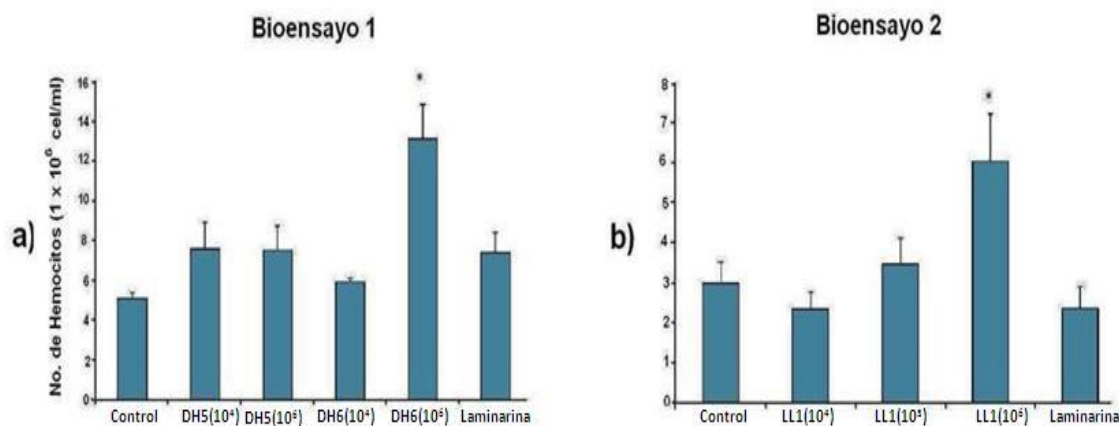


Figura 2. Conteo Total de Hemocitos Circulares (CTH) en juveniles de camarón blanco *L. vannamei* expuestos durante 15 días a dos concentraciones diferentes (1×10^4 y 1×10^6 UFC mL^{-1}) de levadura marina (*Debaryomyces hansenii*) DH5, DH6 y a una única concentración (0.02 mg L^{-1}) de β -1,3-glucano de laminarina en el primer bioensayo (a), y en el segundo bioensayo (b) a tres concentraciones distintas (1×10^4 , 1×10^5 y 1×10^6 UFC mL^{-1}) con la cepa LL1 (*Debaryomyces hansenii*) aislada del limón y a β -1,3-glucano de laminarina. (*) Denota diferencias significativas respecto al control ($P < 0.05$).

7.1.2. Cuantificación de proteína (CP)

El contenido de proteína de los hemocitos provenientes de juveniles de *L. vannamei* expuestos a la dosis de 1×10^4 UFC mL^{-1} de *D. hansenii* de origen marino (DH5 y DH6) revela valores significativamente altos ($P < 0.05$) comparado con el grupo control (3.3, 2.4, y 1.7 mg mL^{-1} respectivamente) (Figura 3a). Los camarones expuestos a la cepa LL1 revela fluctuaciones de proteína en los hemocitos de $2.4 - 3.6 \text{ mg mL}^{-1}$ en sus diferentes dosis de aplicación, pero sin que estos valores sean significativos comparados con su grupo control (3.0 mg mL^{-1}) (Figura 3b).

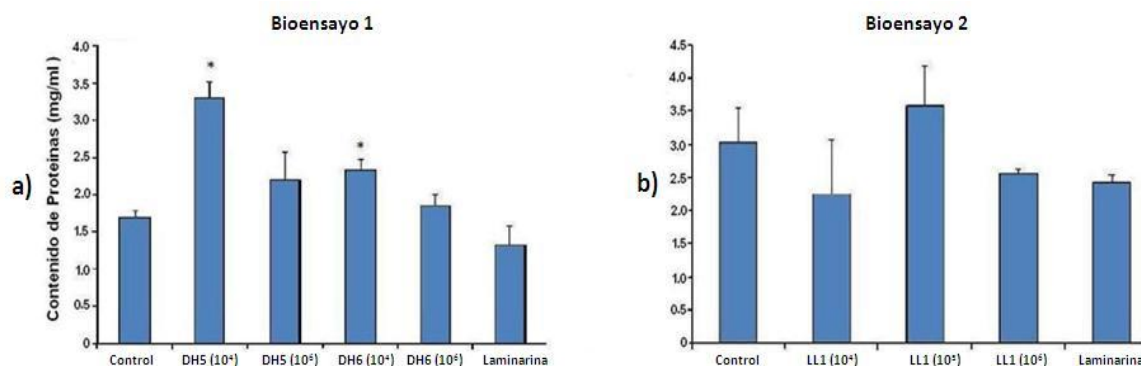


Figura 3. Contenido de proteínas totales en juveniles de camarón blanco *L. vannamei* expuestos durante 15 días a dos concentraciones diferentes (1×10^4 y 1×10^6 UFC mL^{-1}) de levadura marina (*Debaryomyces hansenii*) DH5, DH6 y a una única concentración (0.02 mg L^{-1}) de β -1,3-glucano de laminarina en el primer bioensayo (a) y en el segundo bioensayo (b) a tres concentraciones distintas (1×10^4 , 1×10^5 y 1×10^6 UFC mL^{-1}) con la cepa LL1 (*Debaryomyces hansenii*) aislada del limón y a β -1,3-glucano de laminarina. (*) Denota diferencias significativas respecto al control ($P < 0.05$).

7.1.3. Actividad de la superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT)

La actividad SOD en hemocitos de *L. vannamei* expuestos a la laminarina en el bioensayo 1 revela valores significativamente superiores (45.86 U mg^{-1}) comparados con el grupo control (35.29 U mg^{-1}). Contrariamente, los organismos expuestos a la dosis de 1×10^4 UFC mL^{-1} de DH5 muestran valores significativamente inferiores ($P < 0.05$) comparados con el grupo control (Figura 4a). La cepa LL1 no generó diferencias significativas en la actividad

SOD respecto al grupo control, presentando valores promedios desde 12 a 18 U mg⁻¹ (Figura 4b).

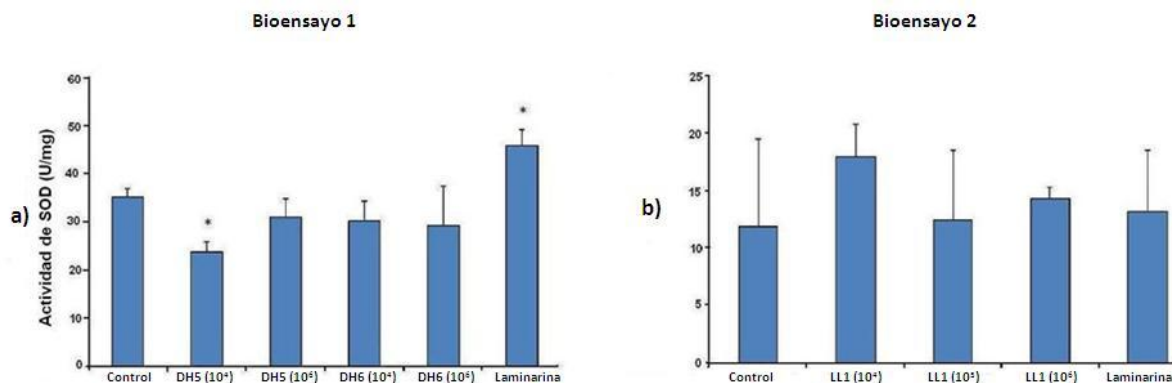


Figura 4. Actividad de SOD en hemocitos de juveniles de camarón blanco *L. vannamei* expuestos durante 15 días a dos concentraciones diferentes (1×10^4 y 1×10^6 UFC mL⁻¹) de levadura marina (*Debaryomyces hansenii*) DH5, DH6 y a una única concentración (0.02 mg L⁻¹) de β -1,3-glucano de laminarina en el primer bioensayo (a) y en el segundo bioensayo (b) a tres concentraciones distintas (1×10^4 , 1×10^5 y 1×10^6 UFC mL⁻¹) con la cepa LL1 (*Debaryomyces hansenii*) aislada del limón y a β -1,3-glucano de laminarina. (*) Denota diferencias significativas respecto al control ($P < 0.05$).

La actividad CAT proveniente de los hemocitos de *L. vannamei* del bioensayo 1 muestran un patrón similar al observado en la actividad de SOD, registrando un incremento significativo en los camarones tratados con β -1,3-glucano (Figura 5a). La actividad de CAT obtenida de hemocitos de *L. vannamei* expuestos a la cepa LL1 revelan diferencia significativa ($P < 0.05$) al ser expuestos a la dosis de 1×10^6 UFC mL⁻¹ con respecto al grupo control (2357.33 y 2032.7 U mg⁻¹, respectivamente) (Figura 5b).

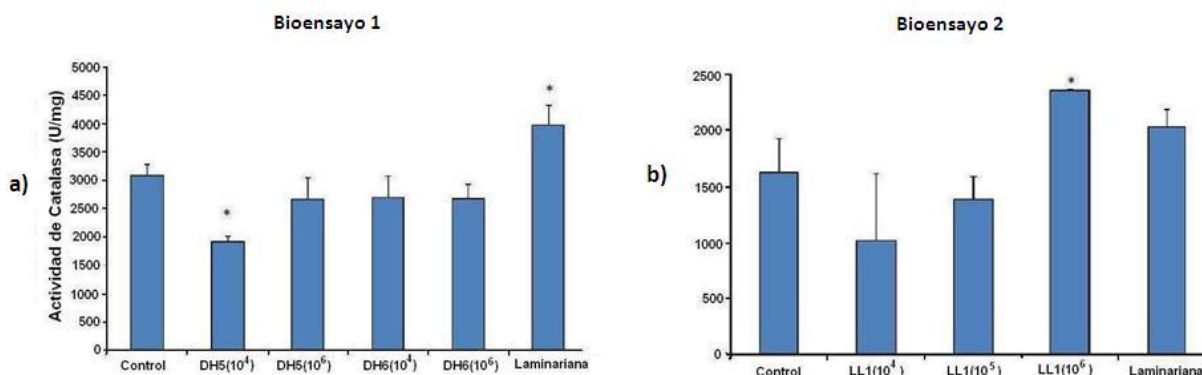


Figura 5. Actividad de CAT en hemocitos de camarón blanco *L. vannamei* expuestos durante 15 días a dos concentraciones diferentes (1×10^4 y 1×10^6 UFC mL^{-1}) de levadura marina (*Debaryomyces hansenii*) DH5, DH6 y a una única concentración (0.02 mg L^{-1}) de β -1,3-glucano de laminarina en el primer bioensayo (a) y en el segundo bioensayo (b) a tres concentraciones distintas (1×10^4 , 1×10^5 y 1×10^6 UFC mL^{-1}) con la cepa LL1 (*Debaryomyces hansenii*) aislada del limón y a β -1,3-glucano de laminarina. (*) Denota diferencias significativas respecto al control ($P < 0.05$).

7.2. Bioensayo 2.- Inmunoestimulación de camarón café (*F. californiensis*) e infección experimental con WSSV.

7.2.1. Composición química de las dietas

En la tabla 8 se muestran los análisis proximales (en base seca) de todos los tratamientos. Como se puede observar, la composición química de las 6 dietas es muy similar, sólo varía en los niveles de inclusión de los aditivos alimenticios a experimentar.

Tabla 8.- Análisis proximales comparativos de cada uno de los tratamientos.

	Humedad	Proteína	Extracto	Fibra	Cenizas	ELN	Energía
	(%)	(%)	Cruda	(%)	(%)	(%)	(cal/g)
Muestra	(%)	(%)	Etéreo (%)	(%)	(%)	(%)	(cal/g)
CONTROL	7.54 ± 0.05	36.49 ± 0.34	8.32 ± 0.20	0.47 ± 0.07	9.01 ± 0.18	45.71	4535.96 ± 13
CAROTENO	7.13 ± 0.15	36.30 ± 0.18	8.32 ± 0.21	0.64 ± 0.10	9.08 ± 0.06	45.78	4435.48 ± 25
GLUCANO	6.88 ± 0.05	36.24 ± 0.42	8.32 ± 0.22	1.02 ± 0.21	9.04 ± 0.03	45.62	4619.36 ± 17
VITAMINA E	6.79 ± 0.24	36.60 ± 0.16	8.32 ± 0.25	0.72 ± 0.08	9.57 ± 0.72	45.16	4507 ± 15

7.2.2. Crecimiento

Se observaron diferencias significativas en el peso, al final del experimento de alimentación con cada uno de los inmunoestimulantes ($P < 0.05$). Los organismos que fueron alimentados con la dieta que contenía un nivel de inclusión 0.01% de β -caroteno obtuvieron el mayor peso promedio con 4 g, y el menor rendimiento se obtuvo con la dieta que contenía un nivel de inclusión de 0.01% de vitamina E con 3.04 g (Figura 6).

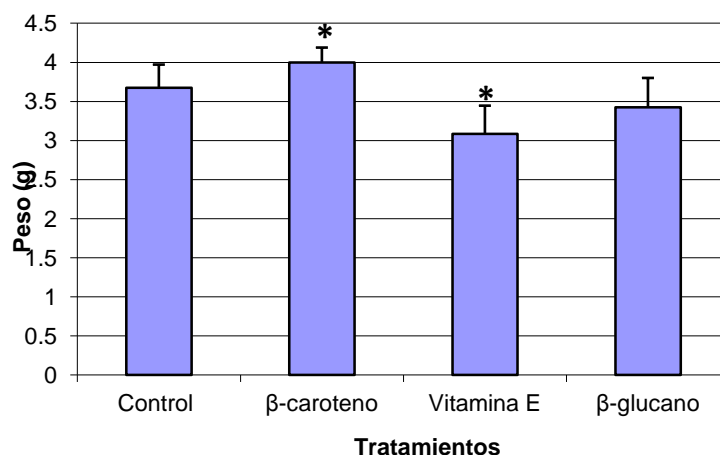


Figura 6. Peso promedio con las diferentes dietas probadas durante los 23 días del bioensayo. Barras verticales = error estándar. * Diferencias significativas ($P < 0.05$).

7.2.3. Mortalidad posterior a la infección experimental con WSSV

Se hicieron extracciones de ADN para la detección de WSSV por PCR en cada tiempo de muestreo. Todos los camarones alimentados con los tratamientos experimentales fueron susceptibles a la infección por WSSV. Los signos clínicos inmediatos posterior a la infección fueron: letárgia y reducción en la alimentación. Los resultados de PCR mostraron que a las 24 h se amplificó una banda de 296 pb en los organismos del control y los del tratamiento con β -1,3-glucano, son los únicos que dan positivo a WSSV (Figura 7 los carriles están marcados con un asterisco). A partir de las 48 h que se generaliza la infección en todos los tratamientos y se generan las mayores mortalidades. Los camarones alimentados con β -1,3-glucano y β -caroteno mostraron una mortalidad acumulada de 95%

y 100% a las 144h (6 días) postinfección, respectivamente. Al séptimo día los organismos vivos en el tratamiento con β -1,3-glucano fueron analizados por PCR, dando positivo para WSSV (Figura 8) Mientras que los organismos alimentados con vitamina E y los organismos del grupo control alcanzaron el 100% de mortalidad a las 72 h después de la infección (Figura 9).

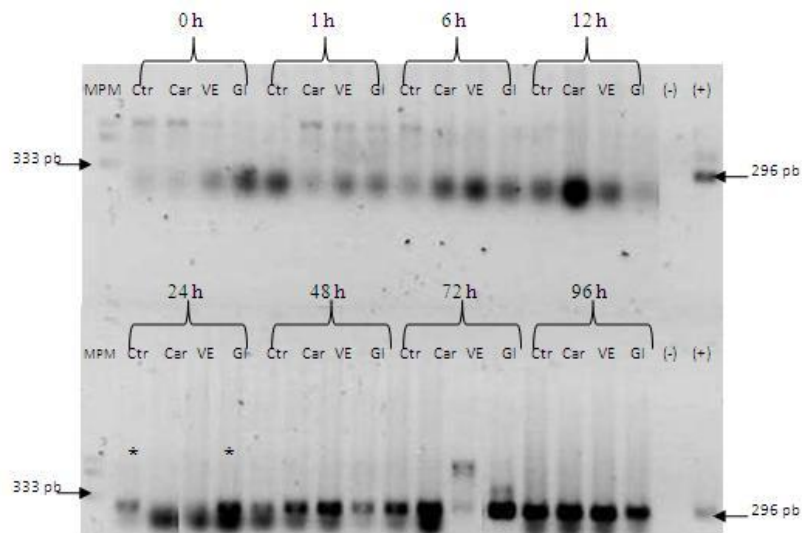


Figura 7. Electroforesis de extracción de ADN con el kit IQ-2000 (Farming Intelligene Tech. Corp, USA) en gel de agarosa/Sybr Safe al 1%. El control y los tratamientos se indican como sigue: Control (C); Caroteno (Car); Vitamina E (VE); y Glucano (G). Las llaves invertidas muestran los tiempos de muestreo. Los signos (-) y (+) son los controles.

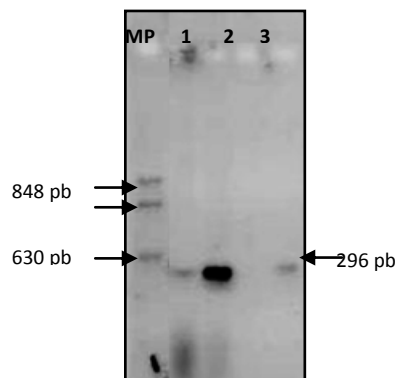


Figura 8. Gel de agarosa/Sybr Safe al 1%. Carril 1.- Corresponden a organismos colectados vivos; Carril 2.- organismos muertos, ambos del día 7 post-infección. Carril 3 y 4 corresponden a los controles.

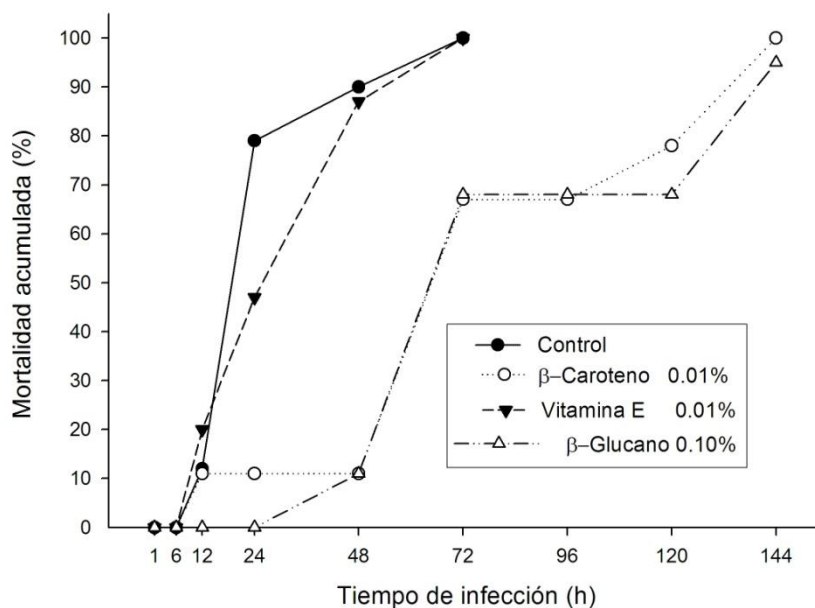


Figura 9. Mortalidad (%) de juveniles de *F. californiensis* infectados con WSSV. Los camarones fueron alimentados previamente con β -caroteno, β -1,3 glucano y vitamina E durante 23 días.

7.2.4. Conteo total de hemocitos (CTH)

Durante este experimento se observaron diferencias significativas ($P < 0.05$) en el CTH en todos los tiempos de muestreo (Figura 10). Después de 1 h postinfección se observó una mayor concentración de hemocitos en camarones alimentados con los tratamientos experimentales que en el control. Sin embargo, es a las 6 h donde se registró una caída drástica en la concentración en todos los tratamientos junto con el control. En los organismos tratados con β -caroteno a las 12 h se observó la mayor concentración de hemocitos con respecto a los demás tratamientos y el control. En general los organismos alimentados con β -glucano y β -caroteno registraron las mayores concentraciones de hemocitos durante todo el experimento, siendo las 12 y 48 h donde observaron las mayores concentraciones para β -caroteno y β -glucano respectivamente.

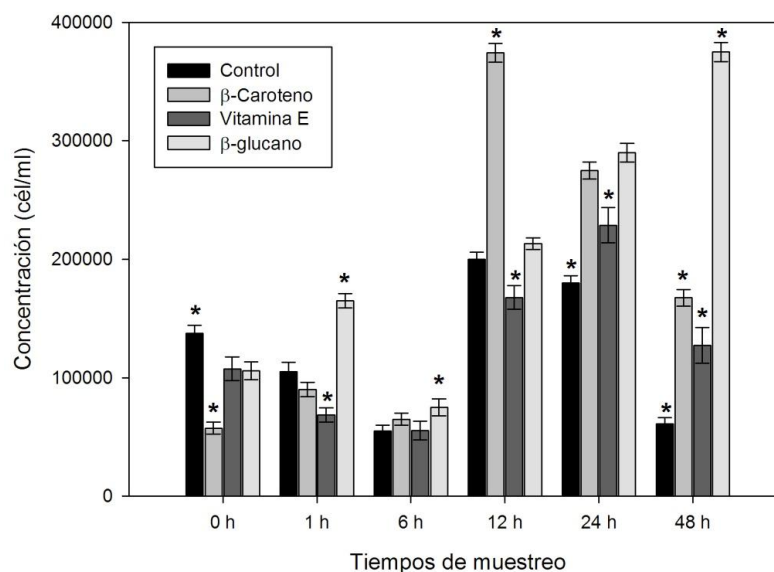


Figura 10. Comportamiento de la concentración de hemocitos en *F. californiensis* para cada uno de los tratamientos y el control, durante el reto con WSSV. Barras verticales = error estándar; *diferencias significativas ($P < 0.05$).

7.2.5. Actividad de enzimas antioxidantes

En hepatopáncreas se observó un incremento significativo ($P < 0.05$) en la actividad relativa de SOD (RSOD) a las 12 h posteriores a la infección, se registró una mayor actividad RSOD (2 veces más) en camarones alimentados con los 3 tratamientos con respecto al control (Figura 11a). Mientras que a las 24 h, sólo se registraron diferencias significativas (Tukey, $P < 0.05$) en la actividad RSOD en los camarones alimentados con vitamina E y β -glucano. Al tiempo 0 (antes de la infección) se observó un incremento significativo en la actividad de RSOD en músculo de camarones alimentados con β -caroteno (Figura 11b). Aunque no se observaron diferencias significativas a la 1 y 6 h post infección, la actividad RSOD de los organismos alimentados con β -glucano se fue incrementando de manera gradual y es a las 12 h donde se observa un incremento significativo en camarones alimentados tanto con β -glucano como con vitamina E. A las 24 h todos los organismos tratados presentan diferencias significativas con respecto al control.

Mientras que a las 48 h sólo los camarones alimentados con β -glucano y con vitamina E mantuvieron diferencias significativas (*Tukey*, $P < 0.05$) con el control.

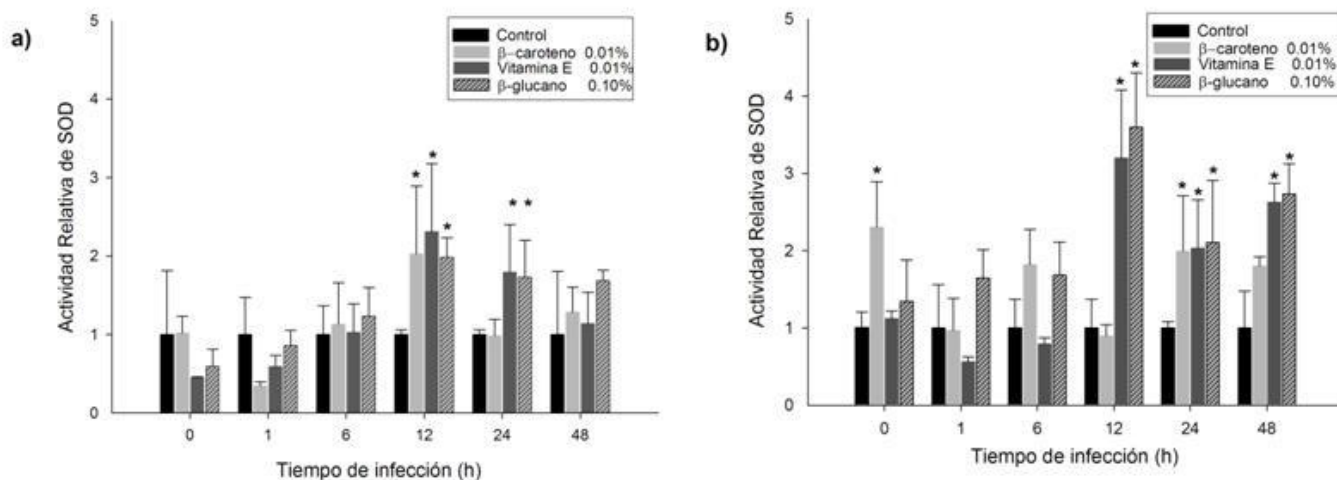


Figura 11. Actividad relativa de SOD en hepatopáncreas (a) y músculo (b) de juveniles de *F. californiensis* infectados con WSSV. La dieta de los camarones fue suplementada con β -caroteno, β -1,3 glucano y vitamina E durante 23 días antes del reto con WSSV. Barras verticales = error estándar; *diferencias significativas ($P < 0.05$).

La actividad relativa de CAT en hepatopáncreas fue significativamente mayor (*Tukey*, $P < 0.05$) en los camarones tratados con vitamina E y β -1,3-glucano al final del periodo de inmunoestimulación (0 h) (Figura 12a). En los camarones alimentados con β -1,3-glucano se observa una respuesta de CAT más temprana, que mantiene durante las 12 h postinfección, cayendo la actividad a las 24 y 48 h. En el músculo, la actividad de CAT se incrementa significativamente (*Tukey*, $P < 0.05$) en todos los tratamientos a la 1 h posterior al reto con WSSV (Figura 12b). La mayor actividad de la enzima se observa a las 12 y 24 h en organismos tratados con vitamina E (hasta 3 veces más con respecto al control). En todos los tratamientos se registra una disminución de CAT a las 24 h. Sin embargo, a las 48 h se observó un leve incremento en la actividad en organismos tratados con β -1,3-glucano en relación al control y el resto de los tratamientos.

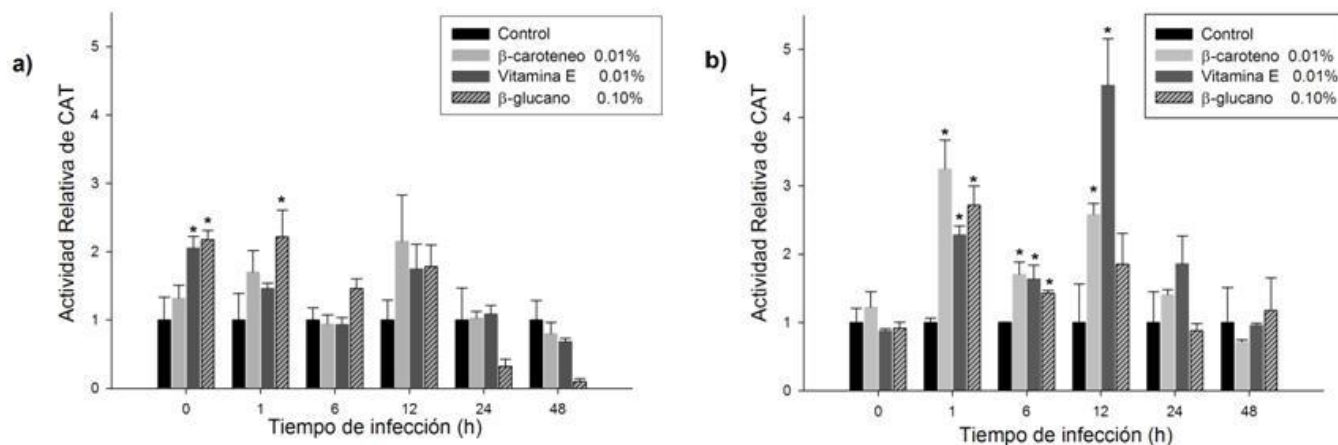


Figura 12. Actividad relativa de CAT en hepatopáncreas (a) y músculo (b) de juveniles de *F. californiensis* infectados con WSSV. La dieta de los camarones fue suplementada con β-caroteno, β-1,3- glucano y vitamina E durante 23 días antes del reto con WSSV. * Significativamente diferente al grupo control ($P < 0.05$).

7.3. Bioensayo 3.- Análisis de expresión ARN mensajero (ARNm) de Catalasa (CAT) y MnSOD mitocondrial (mMnSOD)

7.3.1 Distribución de ARNm de las enzimas CAT y mMnSOD en tejidos de camarones *F. californiensis* sin inmunoestimulación y sin exposición a WSSV.

Se utilizó la técnica de PCR tiempo real (qPCR) para investigar la distribución de los transcritos de CAT y mMnSOD en tejidos de camarón. Los resultados obtenidos mostraron que el transcrito de mMnSOD fue más abundante en todos los tejidos que el transcrito de CAT (Figura 13), observándose en pleópodos la mayor abundancia, seguido de intestino y branquias. En CAT el nivel de expresión más alto se observó en hepatopáncreas y pleópodos, mientras que el nivel más bajo se detectó en músculo, al igual que para el transcrito de mMnSOD.

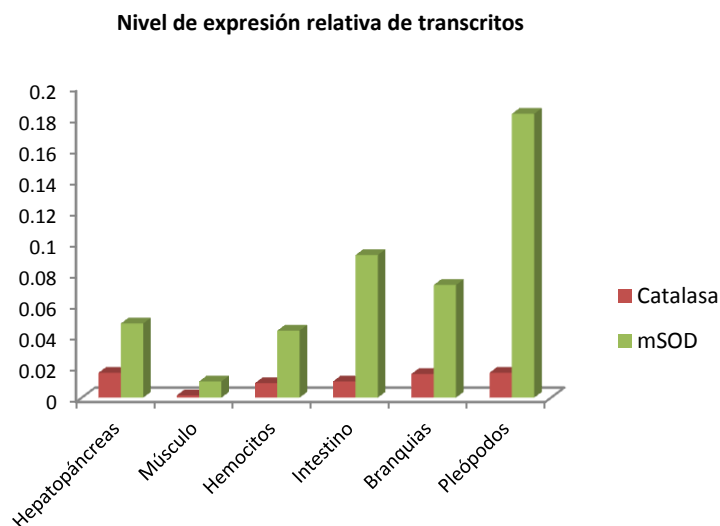


Figura 13. Análisis de qPCR de CAT y mMnSOD en diferentes tejidos de camarón.

7.3.2. Análisis de la expresión de Catalasa (CAT) y MnSOD mitocondrial (mMnSOD) en hepatopáncreas de *F. californiensis* inmunoestimulados y retados con WSSV.

Durante el análisis de la curva estándar de la qPCR se obtuvo un solo producto de amplificación de cada uno de los genes a analizar sin fragmentos inespecíficos. Así mismo, se verificó físicamente a través de una electroforesis y los productos esperados se visualizaron en un gel de agarosa al 2% (Figura 14). En cuanto al análisis de la expresión de CAT en camarones inmunoestimulados con β -1,3-glucano, se observaron diferencias significativas ($P < 0.05$) al principio (T0) y al final del experimento (24 h), en los tiempos intermedios de muestreo el nivel de expresión relativa de CAT se mantuvo constante (Figura 15). En los organismos retados con WSSV sin inmunoestimar, se observó una inducción de la expresión de CAT con respecto al tiempo, se alcanzó la máxima expresión a las 12 h, para posteriormente, a las 24 h regresar a los niveles de expresión más bajos (Figura 16).

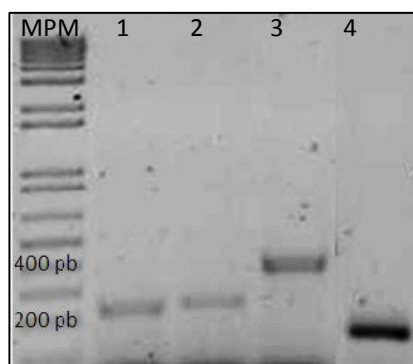


Figura 14. Gel de agarosa/Sybr Safe al 2%. MPM: Marcador de peso molecular organismos; Carril 1: CAT (tm 60°C) 266pb; Carril 2: CAT (tm 62°C) 266 pb; Carril 3: mMnSOD (tm 60°C) 449 pb; Carril 4: qPCR2L8 (gen endógeno) 180 pb.

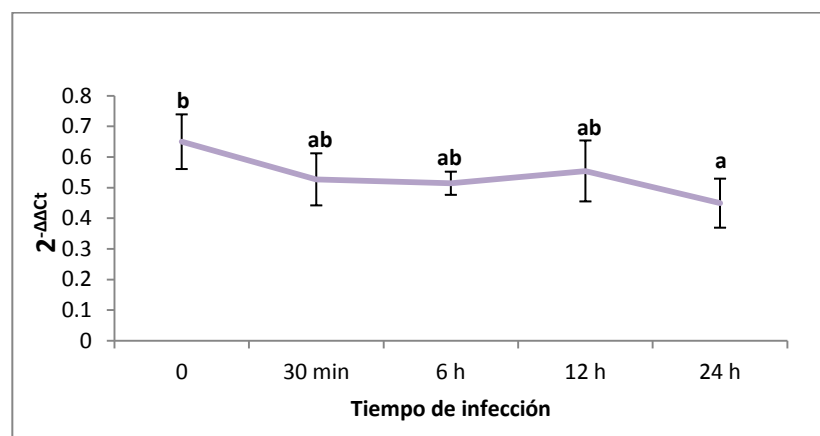


Figura 15. Cambio en la expresión de CAT en juveniles de *F. californiensis* inmunostimulados con β-1,3-glucano. El nivel de expresión fue normalizado con el gen L8 del grupo control (-) (no inmunostimulados no retados). Las diferencias significativas fueron determinadas con un análisis de varianza de una vía (ANOVA). Barras verticales = DESVEST; las letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

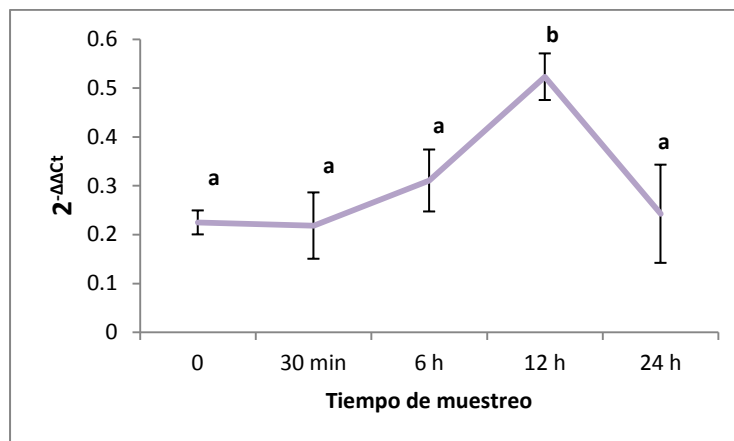


Figura 16. Cambio en la expresión de CAT en juveniles de *F. californiensis* retados con WSSV sin inmunoestimular. El nivel de expresión fue normalizado con el gen L8 del grupo control (-) (no inmunoestimulados no retados). Las diferencias significativas fueron determinadas con un análisis de varianza de una vía (ANOVA). Barras verticales = DESVEST; las letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

La expresión relativa de CAT en camarones inmunoestimulados y retados presentó diferencias significativas ($P < 0.05$) a partir de las 6 h donde se observó una disminución gradual de la expresión hasta caer al nivel más bajo a las 12 h (Figura 17), para finalmente restablecer el nivel de expresión a las 24 h de postinfección.

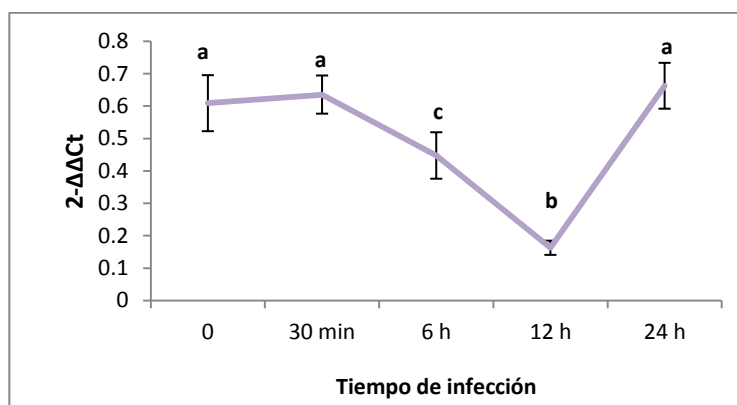


Figura 17. Cambio en la expresión de CAT en juveniles de *F. californiensis* retados con WSSV e inmunoestimulados con β -1,3-glucano. El nivel de expresión fue normalizado con el gen L8 del grupo control (-) (no inmunoestimulados no retados). Las diferencias significativas fueron determinadas con un análisis de varianza de una vía (ANOVA). Barras verticales = DESVEST; las letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

En el análisis de expresión de mMnSOD en camarones inmunoestimulados con β -1,3-glucano, se observaron diferencias significativas en todos los tiempos de muestreo ($P < 0.05$), un aumento gradual del nivel de expresión relativa a partir de los 30 min postinfección hasta alcanzar el nivel máximo a las 12 h, posteriormente el nivel de inducción descendió hasta casi llegar al nivel inicial (Figura 18). El reto con WSSV indujo un incremento gradual de la expresión relativa de mMnSOD hasta alcanzar la máxima expresión a las 24 h postinfección (Figura 19).

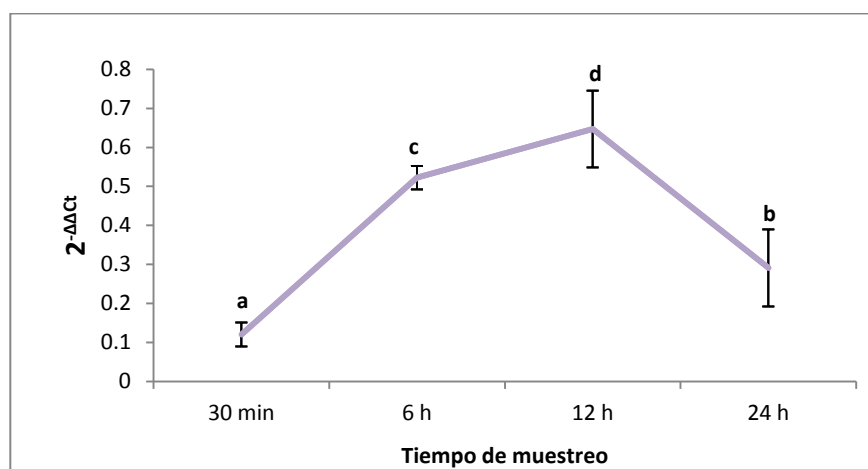


Figura 18. Cambio en la expresión de mMnSOD en juveniles de *F. californiensis* inmunoestimulados con β -1,3-glucano. El nivel de expresión fue normalizado con el gen L8 del grupo control (-) (no inmunoestimulados no retados). Las diferencias significativas fueron determinadas con un análisis de varianza de una vía (ANOVA). Barras verticales = DESVEST; las letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

En camarones inmunoestimulados y retados con WSSV se observaron cambios significativos en los niveles de expresión de mMnSOD ($P < 0.05$), se registró una disminución gradual de la inducción de mMnSOD posterior a la infección hasta caer al nivel mínimo de expresión a las 6 h, posteriormente los niveles de expresión relativa se incrementaron gradualmente hasta alcanzar el nivel máximo de expresión a las 24 h postinfección (Figura 20).

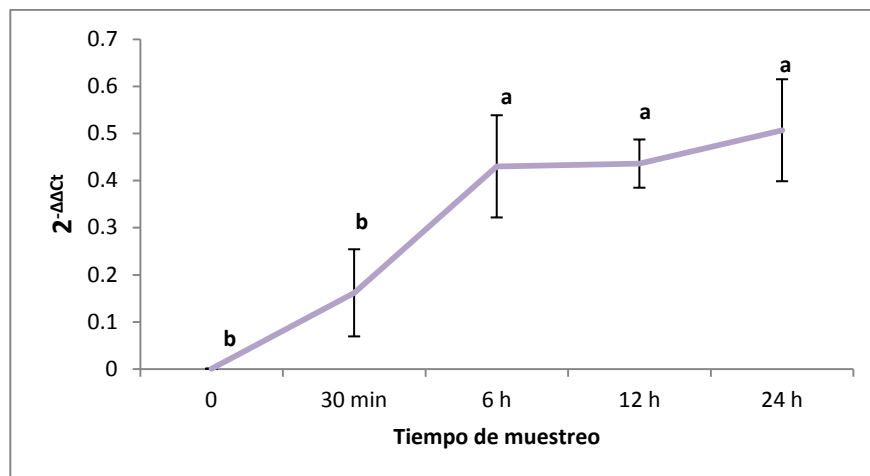


Figura 19. Cambio en la expresión de mMnSOD en juveniles de *F. californiensis* retados con WSSV sin inmunoestimular. El nivel de expresión fue normalizado con el gen L8 del grupo control (-) (no inmunoestimulados no retados). Las diferencias significativas fueron determinadas con un análisis de varianza de una vía (ANOVA). Barras verticales = DESVEST; las letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

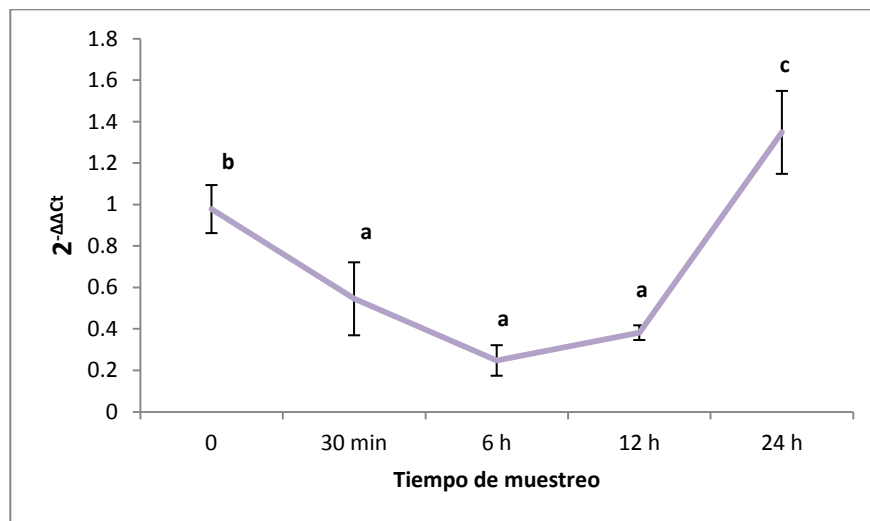


Figura 20. Cambio en la expresión de mMnSOD en juveniles de *F. californiensis* retados con WSSV e inmunoestimulados con β -1,3-glucano. El nivel de expresión fue normalizado con el gen L8 del grupo control (-) (no inmunoestimulados no retados). Las diferencias significativas fueron determinadas con un análisis de varianza de una vía (ANOVA). Barras verticales = DESVEST; las letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

7.4. Genoteca sustractiva (SSH)

7.4.1. Identificación de genes inducidos en juveniles *F. californiensis* inmunoestimulados con β -1,3-glucano y retados con WSSV.

Para aislar e identificar genes inducidos de hepatopáncreas de camarón, bajo condiciones de inmunoestimulación y retado con WSSV, se construyó una genoteca sustractiva (SSH). Para la condición problema, se utilizó ARN de hepatopáncreas de camarones muestreados a las 24 h postinfección y para la condición control ARN de hepatopáncreas de camarones no inmunoestimulados y retados con WSSV muestreados a la misma hora que los organismos para la condición problema. El experimento de sustracción que se diseñó fue tipo “Forward”. De esta manera se enriquecieron las secuencias expresadas diferencialmente presentes en el tratamiento pero no en el control. De la genoteca fueron seleccionados aleatoriamente 370 clonas que tenían un tamaño de inserto >300 pb. Los fragmentos se secuenciaron con el primer universal M13. Posteriormente, se realizó un análisis *in silico* de las secuencias con el programa Edit Seq II (DNA Star Inc.) eliminando el vector y los oligos. Las secuencias obtenidas fueron comparadas con las bases de datos del GenBank/NCBI, utilizando como herramienta el programa Blast para ADN y de proteínas del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>). Como resultado se obtuvieron hasta ahora 5 fragmentos de genes que se encuentran reportados e involucrados en el sistema inmune innato para humano, pero no en camarón; con extremos 3' poliadenilados lo cual nos habla de genes transcritos (ARNm). A continuación, se discute el posible papel de los fragmentos de genes expresados diferencialmente en camarones inmunoestimulados con β -1,3-glucano y retados con WSSV.

Similar a DIPAS (DIPLA 1 Antisense) de humanos

Este gen se localiza en la región cromosómica 9q 33.1, se expresa predominantemente en placenta y con expresiones más bajas en cerebro, riñones y testículos de humano. Tiene un tamaño de 2.7 kb y posee un marco de lectura abierta (ORF) que codifica para una proteína con similitud parcial a la isoforma gamma de proteína quinasa II dependiente de calcio calmodulina de humano (García y Castrillo, 2004). En

camarones, se conoce que el proceso de muda depende de la síntesis proteica y que es inhibido por la hormona inhibidora de la muda mediada por el aumento de AMPc y antagonizado por el sistema calcio- calmodulina. El órgano Y contiene actividad proteina quinasa C que estimula la producción de ecdisteroides y la síntesis proteica (Huberman, 1990). Estudios realizados en camarones, muestran que WSSV acelera el proceso de muda, observándose los mayores porcentajes de organismos mudados entre el primer y segundo día post infección (Echeverría *et al.*, 2002). Por otra parte, el ARNm de DIPAS hibridiza con una región UTR 3' del ARNm de PAPP-A (Pregnancy-Associated Plasma Protein A) se han observado niveles altos de expresión de este gen en enfermedades que son ocasionadas por estrés oxidativo (Huanqui-Guerra, 1997).

Similar al factor activador plaquetario acetilhidrolasa (PAFAH1B1) isoforma Ib, subunidad alfa de 45kDa de humanos.

Este gen PAFAH1B1 codifica la subunidad no catalítica alfa de la isoforma intracelular Ib del factor activador plaquetario acetilhidrolasa, esta enzima cataliza la hidrólisis del PAF. Se encuentra presente tanto en el citosol de las células (Blanck *et al.*, 1981) como en el plasma sanguíneo (Stafforini *et al.*, 1987, 1989), es independiente de calcio y se encuentra asociada a lipoproteínas de alta (HDL) y baja densidad (LDL), es mucho más activa la forma unida a lipoproteínas de baja densidad (Stafforini *et al.*, 1989). El factor activador plaquetario acetilhidrolasa (FAP-AH) y la glutathionperoxidasa (GPx), previenen la formación de productos bioactivos degradados de la oxidación LDL. Los antioxidantes lipofílicos en HDL son para rescatar de su eliminación a los radicales libres derivados del oxígeno y para interrumpir la oxidación de las LDL catalizada por iones de transición (Assmann y Nofer, 2003). Esta enzima se secreta por los macrófagos, pero no por los monocitos, que son los precursores de los macrófagos. Además, durante la diferenciación de monocitos a macrófagos aumenta 260 veces la síntesis de la acetilhidrolasa (Elstad *et al.*, 1989). De esta manera, la migración de los monocitos a los tejidos y su conversión a macrófagos, permitiría la liberación de esta enzima, de forma que ayudaría a controlar la formación del PAF en un proceso de daño tisular (García-Rodríguez, 1993).

Similar a una proteína con dominio de dedos de zinc FYVE de humanos.

Esta nueva proteína pertenece a la familia de las Rab GTPasas (Nielsen *et al.*, 2000). Son proteínas altamente conservadas lo que significa que estas proteínas juegan un papel esencial en la vida celular (Pan *et al.* 2005). Están implicadas en un gran número de procesos celulares en eucariontes incluyendo proliferación, desarrollo, endocitosis, fagocitosis y transportación de vesículas (Simonsen *et al.*, 1998; Christoforidis *et al.*, 1999a). En camarones, se ha encontrado que un gen Rab (PjRab) aumenta su nivel de expresión en camarones resistentes a infecciones virales. Lo que sugiere que Rab GTPasa está involucrado en la respuesta innata al virus (Wu *et al.*, 2008).

Similar a Heg de humanos y a una nuclear caseína quinasa.

Se encontraron 3 clonas individuales que corresponden al mismo gen, el análisis bioinformático mostró identidad con 2 genes: el gen Heg de células mononucleares humanas y el gen de una caseína quinasa nuclear. El ARN mensajero del Heg, se expresa en células mononucleares humanas y está correlacionado con los ARN mensajeros que dan origen a los receptores CD14 en macrófagos (Christensen *et al.*, 2008). En camarones, la función fagocítica la poseen los hemocitos hialinos que tienen la capacidad de reconocer e ingerir partículas extrañas como bacterias, hongos, esporas o células envejecidas. (Bachère, 2000). La fosforilación de residuos de serina, treonina y tirosina por proteínas cinasas (K), juegan un papel importante en la regulación de varios procesos celulares. Particularmente, la caseína cinasa 1 (CK1) interacciona con varias estructuras celulares y proteínas, así como también se encuentra involucrada en su autofosforilación y fragmentación proteolítica de los dominios reguladores de la región C-terminal (Gross y Anderson, 1998). La CK1 en mamíferos fosforilan en varias isoformas con diferentes sustratos lo que es clave en la regulación de proteínas involucradas en la diferenciación celular, proliferación, segregación cromosómica y ritmos circadianos (Knippschild *et al.*, 2005). La información de proteínas quinazas en mitocondria de animales, son escasos y están relacionados sólo a mamíferos. Existen pocos datos disponibles sobre la función de estas proteínas en invertebrados.

Vallejo y colaboradores (1997) demostraron la presencia de caseína quinasa 2 en mitocondria de *Artemia franciscana*.

Similar a la subunidad 1 activadora de proteasoma.

Es una de las principales proteinasas celulares multicatalítica, su actividad está sobreexpresada por altos niveles de estrés oxidativo (Osna *et al.*, 2008). El proteasoma está distribuido en todas las células eucariotas en altas concentraciones y en péptidos clave en procesos dependientes de ATP/ubiquitina. Una función esencial de un proteasoma modificado, el inmunoproteasoma es el procesamiento de los péptidos MHC clase 1 (Schmid *et al.*, 2008).

8. DISCUSIÓN

8.1. Discusión general

El sistema inmune innato es la primera línea de defensa en la protección de camarones durante las primeras horas y días después de una infección (Lee y Söderhäll 2002). En la respuesta inmune inmediata a patógenos, varias proteínas y péptidos son sintetizados y almacenados en los hemocitos y liberados en la hemolinfa después de la infección (Söderhäll y Cerenius, 1992). Entre las funciones de defensa de los hemocitos en camarones se encuentra la fagocitosis, durante este proceso conocido como estallido respiratorio se producen grandes cantidades de moléculas altamente reactivas, principalmente de radicales de oxígeno conocidas como Especies Reactivas al Oxígeno (EROs) (Muñoz *et al.*, 2000).

El hepatopáncreas no sólo es un importante órgano digestivo, también es un órgano indispensable en el sistema inmune de invertebrados, puede sintetizar y excretar numerosas proteínas involucradas en el sistema de defensa como péptidos antimicrobianos, proteínas ligando a β -1,3-glucano, lectinas y enzimas antioxidantes las cuales están involucradas en la respuesta antioxidante y estrés oxidativo, incluyendo catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD) y glutatión-s-transferasa (GST) (Sekine *et al.*, 2001; Roux *et al.*, 2002; Borkovic *et al.*, 2008). Debido a que el hepatopáncreas es el principal órgano responsable de la detoxificación y una glándula con una actividad metabólica alta (Mourente, 1996), es de esperar que se generen grandes cantidades de especies reactivas de oxígeno (EROs). Por consiguiente, enzimas antioxidantes como CAT y SOD juegan un papel fundamental en la inhibición y eliminación de EROs. Investigaciones previas, han encontrado que la actividad de enzimas antioxidantes disminuye en camarones infectados con el virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV), debido posiblemente a un exceso en la producción de oxígeno singlete y radicales hidroxilo en el medioambiente inmediato, dando como resultado la inactivación de la actividad enzimática (Escobar *et al.*, 1996; Mohankumar y Ramasamy, 2006). Por otra parte, algunos autores han reportado que es posible incrementar la actividad de enzimas antioxidantes con polisacáridos sulfatados, β - 1,3/1,6-glucano, zymosan A y

ácido ascórbico, administrándolos por diferentes rutas como inmersión, inyección y *Artemia* sp., como vehículo (Campa-Córdova *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2006, respectivamente).

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

8.2. Evaluación del efecto de *Debaryomyces hansenii* sobre la respuesta antioxidante de *L. vannamei*.

En la última década se ha incrementado el uso de levaduras vivas en la acuicultura por su potencial benéfico. Reyes-Becerril *et al.* (2008a) reportaron una estimulación en la respuesta antioxidante e inmunoestimulante, especialmente a nivel celular, de la dorada (*Sparus aurata* L) alimentada con 1×10^6 UFC g⁻¹ de dieta con una cepa de la levadura *Debaryomyces hansenii*. En camarones Yang *et al.* (2010) encontraron que la levadura roja (*Rhodospiridium paludigenum*) administrada viva promueve el crecimiento, la competencia antioxidante y supervivencia de *L. vannamei*. El efecto positivo de estas levaduras podría deberse a las sustancias bioactivas producidas por las levaduras como

proteínas, aminoácidos, polisacáridos, vitaminas, ácidos grasos y carotenoides (Yang *et al.*, 2010).

Como se ha revisado anteriormente, los hemocitos juegan un papel importante en la respuesta inmune de los crustáceos (Söderhäll y Cerenius, 1992), y se ha visto que a mayor concentración de hemocitos hay una mejoría en la resistencia de los camarones hacia las infecciones producidas por agentes patógenos (Le Moullac *et al.*, 1998). Valores promedio que van de 1×10^3 a 1×10^7 hemocitos mL^{-1} de CTH han sido observados en *F. californiensis*, *L. schmitt*, *L. setifirus*, *L. vannamei*, *Marsupenaeus japonicus*, y *P. monodon* (van de Braak *et al.*, 2002; Sritunyalucksana *et al.*, 2005). Sajeevan *et al.* (2009) observaron que las células completas de levaduras le proporcionaron a *F. indicus* un mayor CHT que el uso de productos purificados (glucanos). Esto sugiere una vez más, que las células completas de levaduras aportan una mayor cantidad de elementos que fortalecen e incrementan la respuesta inmune (aminoácidos, vitaminas, minerales, etc.). El CTH en crustáceos puede ser alterado por estrés, enfermedades y medio ambiente (Sritunyalucksana *et al.*, 2005; Laria *et al.*, 2008; Sajeevan *et al.*, 2010). En el presente estudio se presentó un incremento en el número de hemocitos circulantes cuando los camarones fueron expuestos a *D. hansenii*, obteniendo incrementos significativos con una dosis de 1×10^6 UFC mL^{-1} ; así mismo se observó que cepas diferentes de una misma especie de levadura puede generar resultados distintos como es el caso del CTH en juveniles de *L. vannamei*.

El contenido de proteínas presente en los hemocitos y en la hemolinfa también está relacionado directamente con el estado inmune de los organismos; un valor alto indica un buen estado de salud (van de Braak *et al.*, 2002; Laria *et al.*, 2008). Entre las proteínas detectadas hay moléculas asociadas a la coagulación, metabolitos moduladores del sistema inmune, profenoloxidasas, proteínas de reconocimiento, peneidinas, peroxinectinas, hemocianina, entre otras (Aguirre-Guzmán *et al.*, 2010; van de Braak *et al.*, 2002). Boonyaratpalin *et al.* (2001) observaron que los niveles de proteína en hemolinfa de *P. monodon* disminuyen por el efecto creciente del aflatoxina contenida en la dieta. A diferencia del estudio anterior, las dosis de 1×10^4 UFC mL^{-1} de las levaduras marinas (*D. hansenii*, cepa DH5 y DH6) administradas en el presente trabajo incrementaron significativamente los niveles de proteína en los hemocitos de *L. vannamei*. Resultados

similares con nuestro trabajo, fue reportado por Campa-Córdova *et al.* (2002), quien observó que la doble estimulación de los camarones con β -1,3-glucano, permite alcanzar un incremento más rápido en los valores de la proteína soluble en hemocitos que utilizando una sola inmunestimulación.

Como respuesta al estrés oxidativo, el metabolismo aerobio de los crustáceos genera sustancias reactivas al oxígeno que son eliminadas por un sistema de defensa antioxidante que incluye principalmente las enzimas SOD, CAT, y GPx (Orbea *et al.*, 2000). Los valores de la actividad de SOD en hemocitos se incrementaron significativamente ($p < 0.05$) en los camarones tratados con β -1,3-glucano (Laminarina) presentando un comportamiento similar en la actividad de CAT en los camarones tratados con β -1,3-glucano y *D. hansenni* (cepa LL1). Esta inducción de la respuesta antioxidante por las levaduras, se debe posiblemente a que además de aportar β -glucanos, mananoligosacáridos y otros componentes de la pared celular, son una fuente importante de antioxidantes atribuidos a la presencia de pigmentos carotenoides (Scholz *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 2010) Como era esperado, β -1,3-glucano generó un incremento de SOD y CAT en los hemocitos de los camarones tratados con este inmunestimulante comercial (Campa-Córdova *et al.*, 2002), posiblemente este efecto se deba a una mayor disponibilidad de glucanos entre los tratamientos. Mientras que β -1,3-glucano de laminarina se adicionó puro en las unidades experimentales, el contenido de glucanos en las levaduras estuvo menos accesible. Las células de las levaduras están rodeadas por una pared celular compuesta principalmente por β -1,3 y β -1,6-glucanos, manoproteínas y quitina (Magnelli *et al.*, 2002). Dependiendo de la fase de crecimiento en que se encuentre las levaduras al momento de ser utilizadas, el contenido de manoproteínas en la pared celular puede ser hasta del 48% (Coutteau *et al.*, 1990). Por consiguiente, posiblemente las levaduras no fueron apropiadamente digeridas por los camarones. De acuerdo a Márquez *et al.* (2004), la digestibilidad de las levaduras está correlacionada positivamente con niveles altos de quitina y glucanos y se correlaciona negativamente con niveles altos de manoproteínas en las paredes celulares de las levaduras.

8.3. Evaluación del efecto de los aditivos alimenticios sobre el crecimiento, mortalidad y concentración de hemocitos totales

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

En el presente trabajo, la mayor mortalidad acumulada se registró en los organismos del control y los del tratamiento con vitamina E en donde se registró el 100% de mortalidad a las 72 h. De igual forma, los camarones alimentados con vitamina E tuvieron el menor rendimiento en peso (3.04 g) y una menor concentración de hemocitos totales con respecto a los demás tratamientos (Figura 6). Nuestros resultados contrastan con lo reportado por Lee y Shiau (2004), quienes aseveran que un nivel de inclusión de 0.008-0.01% de vitamina E en dietas, maximizan el crecimiento y las respuestas inmunes no específicas de *P. monodon*. Esta discrepancia en los resultados se debe posiblemente a los diferentes

requerimientos de vitamina E que tienen ambas especies. Hasta este momento no existe una investigación dirigida a determinar los requerimientos de vitamina E para *F. californiensis*, por lo que el nivel de inclusión que se utilizó para este trabajo, se basó en los requerimientos de vitamina para *L. vannamei*. He *et al.* (1992) confirma lo encontrado en el presente trabajo, ellos reportan tasas de crecimiento y supervivencia significativamente más bajas cuando las dietas de camarones son deficientes en vitamina E.

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

8.4. Actividad de enzimas antioxidantes

La activación de hemocitos también produce sustancias bactericidas como peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y anión superóxido ($\cdot O^{-2}$) que pueden incrementar la resistencia a enfermedades (Song y Hsieh, 1994). En este sentido, la superóxido dismutasa (SOD) es una de las principales enzimas de defensa antioxidante, convierte el $\cdot O^{-2}$ que es altamente tóxico en H_2O_2 (Fridovich, 1995). En el presente trabajo, la actividad de SOD en hepatopáncreas fue significativamente mayor (*Tukey*, $P < 0.05$) a las 12 h en los 3 tratamientos (β -1,3-glucano, β -caroteno y vitamina E) con respecto al control y a las 24 h en organismos tratados con β -glucano y vitamina E, esto nos sugiere que los aditivos utilizados mostraron su potencial antioxidante aumentando la actividad de SOD en hepatopáncreas. Así mismo, en músculo de camarones alimentados con β -1,3-glucano y β -caroteno tuvieron una respuesta más temprana a la infección con WSSV (Figuras 7a, 7b). Además fueron los tratamientos con la mayor actividad relativa a partir de las 12 h postinfección, aunque se registró una ligera disminución de la actividad RSOD a las 24 h, a las 48 h volvió a incrementarse. Esto se vio reflejado en una mortalidad más baja en los tratamientos con β -1,3-glucano y β -caroteno que en camarones alimentados con vitamina E y el control.

Los resultados anteriormente descritos nos indican que posiblemente el mecanismo antioxidante se mantuvo activo en respuesta al reto, confiriendo una mayor resistencia al estrés oxidativo provocado por la infección con WSSV. Estos hechos coinciden con lo reportado por Campa-Córdova *et al.*, (2002); Chang *et al.*, (2003) y Flores-Leyva (2006). Ellos encontraron que β -1,3-glucano y β -caroteno mejoran significativamente la defensa antioxidante de postlarvas, juveniles y adultos de camarón ante infecciones de WSSV (Chang *et al.*, 2003; Flores-Leyva, 2006), así como también, ante infecciones de *Vibrio damsela*, *V. harveyi* (Campa-Córdova *et al.*, 2002).

Una de las enzimas antioxidantes más eficientes hasta ahora conocida es la catalasa (CAT), tanto que no puede ser saturada por el H_2O_2 a ninguna concentración (Olalla y

Matés, 1999). Aunque la CAT no es esencial para algunos tipos de células en condiciones normales, tiene un importante papel en la adquisición de tolerancia al estrés oxidativo en la respuesta adaptativa de las células (Hunt *et al.*, 1998). En el presente estudio, se observa una respuesta temprana de la actividad relativa de CAT tanto en hepatopáncreas como en músculo y una tendencia a disminuir a partir de las 12 h en todos los tratamientos excepto en músculo de camarones alimentados con β -1,3-glucano que se recupera a la 48 h (Figuras 8a y 8b). Esta respuesta temprana de CAT posiblemente se debió a un efecto de los tratamientos, que confirieron una mayor capacidad antioxidante en los camarones para hacer frente al exceso de H_2O_2 generado por la explosión respiratoria y / o la alteración del metabolismo inducidos por WSSV. Trabajos recientes muestran que las infecciones bacterianas y virales inducen la movilización del sistema de defensa antioxidante y el desarrollo del estrés oxidativo y por ende el daño de tejidos 24 h posteriores a la infección (Mathew *et al.*, 2007). Castex y colaboradores (2010), reportaron que la actividad relativa de CAT en hepatopáncreas de camarones bajo tratamiento con probióticos y retados con *Vibrio nigripulchritudo* mostraron un incremento a las 12 h postinfección antes de disminuir significativamente a las 24 h. Así mismo, Chang *et al.* (2010) registró que *L. vannamei* alimentado con una dieta suplementada con glicirricina (componente extraído del regaliz) y retado con *Vibrio Alginolyticus* tienen un aumento de algunos parámetros inmunológicos y enzimas antioxidantes a las 12 h seguido de una disminución a las 24 h. Este mismo patrón lo reportó Sarathi *et al.* (2007), comparando la respuesta inmune de *Fenneropenaeus indicus* a *Vibrio Alginolyticus* y WSSV. Estos resultados concuerdan con los presentados en este trabajo, por lo que podría inferirse que es parte de la evolución de la patogénesis de WSSV y que esta condición en la actividad enzimática podría deberse a un proceso metabólico natural conocido como regulación por retroalimentación, que adapta el flujo de metabolitos a través de una vía determinada mediante un aumento o una disminución temporal de la actividad en las enzimas (Alberts *et al.*, 1996). Por otra parte, en hepatopáncreas la actividad de CAT presentó una posible inhibición a las 48 h, posiblemente debido a un exceso de óxido nítrico ($NO\bullet$) generado durante la patogénesis (Song *et al.*, 2007). El $NO\bullet$ se une al hierro del grupo hem de catalasa y compite con el H_2O_2 por estos sitios de unión, provocando un incremento en la acumulación de H_2O_2 en

las células (Brown y Borutaite, 1999). Sin embargo el efecto del NO• sobre la actividad de CAT es reversible y no tiene efectos inhibitorios sobre la expresión de la proteína o a nivel de expresión génica por lo tanto, el incremento en la expresión de CAT puede ayudar a la célula a sobrevivir al efecto deletéreo de radicales libres (Sigfrid *et al.*, 2003).

8.5. Análisis de expresión de enzimas antioxidantes en tejidos de *F. californiensis*

Las EROs se incrementan como resultado del estrés oxidativo durante condiciones fisiológicas particulares y/o durante reacciones de defensa. En este sentido, la expresión de ARNm de las enzimas CAT y mMnSOD han sido ampliamente utilizadas para evaluar la capacidad de defensa en contra de patógenos de camarones (Gómez-Anduro *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2008; Ji *et al.*, 2009; Castex *et al.*, 2010). Se ha observado que la actividad de estas enzimas muestran diferentes perfiles de expresión en órganos y tejidos de camarones (Tavares-Sánchez *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2007). En el presente estudio CAT y mMnSOD fueron detectadas en hepatopáncreas, hemocitos, pleópodos, branquias e intestino. El transcrito de CAT fue más abundante en hepatopáncreas; debe considerarse que la ruta principal de penetración de pro-oxidantes y EROs exógeno en los organismos es durante la alimentación, por lo tanto es de esperarse que los principales órganos implicados en el estrés oxidativo sea el sistema digestivo (Timofeyev, 2006). Además se ha de señalar que el hepatopáncreas es un órgano con una alta actividad metabólica. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Tavares-Sánchez y colaboradores (2004) para *L. vannamei*. Por otra parte, en pleópodos se observó el transcrito de mMnSOD más abundante, seguido de intestino y branquias. Tomando en cuenta que los organismos utilizados para este estudio fueron capturados del medio silvestres, posiblemente más de uno estaba infectado con bacterias tipo *Vibrio* sp. Los organismos infectados por este tipo de bacterias presentan una colonización masiva en los apéndices y en el inicio del tracto digestivo (Figura 9). Posteriormente, conforme la infección avanza, las bacterias van colonizando el intestino medio y el hepatopáncreas para terminar en una septicemia generalizada (Lightner, 1993). Considerando que el anión superóxido es el primer producto liberado por el estallido respiratorio como estrategia de defensa contra patógenos,

posiblemente a esto se debió que los niveles de expresión relativa de mMnSOD en todos los tejidos hayan sido los más abundantes, debido a que el anión superóxido sirvió como sustrato para que esta enzima lleve a cabo su función que es catalizar la eliminación del anión superóxido a través de su transformación en peróxido de hidrógeno y oxígeno (Olalla y Matés, 1999).

8.6. Efecto del β -1,3-glucano en la expresión de CAT y mMnSOD

Los β -glucanos han sido utilizados con éxito para aumentar la resistencia de crustáceos en contra de infecciones bacterianas y virales (Wang *et al.*, 2008). El modo de acción de estos compuestos sobre el sistema inmune está lejos de ser entendido, pero estudios recientes han comenzado a arrojar algo de luz sobre los mecanismos detrás de la respuesta proinflamatoria inducida por β -glucanos (Soltanian *et al.*, 2007). Estos polisacáridos, junto con manosas y otros componentes de la pared celular juegan un papel importante en el reconocimiento de patógenos. La habilidad para detectar patógenos es de vital importancia para los organismos multicelulares, y se ha alcanzado a través de la evolución de receptores de línea germinal; llamados receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) los cuales pueden reconocer estructuras no propias (Janeway y Medzhitov, 1998). Las estructuras reconocidas por estos receptores son conocidas como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), no se encuentran en eucariontes y se piensa que normalmente son esenciales para microorganismos patógenos. Los mejores ejemplos de PAMPs son lipopolisacáridos (LPS), peptidoglicanos, ácido lipoteicoico, manosas, ADN bacteriano, ARN de doble cadena y β -glucanos de hongos (Medzhitov y Janeway, 2000). El reconocimiento de estas estructuras dispara respuestas diseñadas a proteger al hospedero de microorganismos patógenos formando parte del sistema inmune innato (Brown y Gordon, 2003).

Ejemplo de estas estructuras de reconocimiento en crustáceos son los β -1,3-glucanos ligando a proteína (GBP) (Sritunyalucksana *et al.*, 2002). Recientemente Varios investigadores han enfatizado el uso β -1,3-glucano para inducir la expresión de genes

involucrados en la respuesta antioxidante de camarones (Wang *et al.*, 2008, Ji *et al.*, 2009; Castex *et al.*, 2010). En el presente trabajo, camarones inmunoestimulados con β -1,3-glucano de Laminarina no registraron una variación marcada en el nivel de expresión de CAT en hepatopáncreas (Figura 11). Resultados similares fueron reportados por Dandapat y colaboradores (2000), quienes observaron que *M. rosenbergii* alimentados con dietas suplementadas con vitamina E disminuye la peroxidación lipídica en hepatopáncreas aunque la actividad de CAT permaneció sin cambios. En contraste, en camarones retados con WSSV sin inmunoestimar, el nivel del transcrito de CAT empezó a incrementarse a los 30 min postinfección alcanzando un pico máximo a las 12 h. No existen muchos trabajos que evalúen la expresión de CAT en camarones retados con WSSV, por lo que se infiere que el sistema antioxidante podría estar intentando neutralizar durante las primeras horas, el daño oxidativo provocado por la infección (Figura 12). El efecto inverso sucede en los organismos inmunoestimulados y retados. El nivel de expresión de CAT disminuyó drásticamente a partir de las 6 h postinfección, cayendo en su nivel más bajo a las 12 h y recuperando su estado basal a las 24 h (Figura 13). De acuerdo a los resultados presentados, es posible inferir que los β -1,3-glucanos confieren protección antioxidante en los primeros minutos y horas posteriores a la infección con WSSV, aumentando la actividad antioxidante de CAT para proteger las células del estrés oxidativo inducido por WSSV.

En previos estudios, el transcrito de mMnSOD en hepatopáncreas de *Marsupenaeus japonicus* inyectados con β -glucanos se incrementó significativamente a las 6 y 12 h posteriores a la inyección (Lin *et al.*, 2010). Estos resultados coinciden con los observados en este trabajo, lo que nos indica que la inducción de mMnSOD es en corto tiempo (Figura 14). Con respecto al nivel de expresión registrado en camarones retados con WSSV, se observó un aumento gradual inmediato al reto, con un leve aumento a las 6 y 24 h postinfección (Figura 15). En un estudio similar pero con MnSOD citosólica (cMnSOD) en hemocitos de *L. vannamei*, el nivel de expresión se incrementó significativamente ($p < 0.001$) a las 12 h posteriores a la infección con WSSV (Gómez-Anduro *et al.*, 2006). Posiblemente la discrepancia entre ambos resultados se deba a las características fisiológicas de los tejidos, debido que el hepatopáncreas posee una mayor tasa metabólica

que hemocitos (Mourente, 1996). En este sentido, en el presente estudio se registró una mayor abundancia del transcrito de mMnSOD en hepatopáncreas que en hemocitos. Resultados que coincidieron con lo reportado por Gómez-Anduro y colaboradores (2006). Por otro lado, los camarones retados con WSSV e inmunoestimulados con los β -1,3-glucanos registraron un decremento gradual en el cambio de expresión de mMnSOD a partir de la infección hasta las 6 h, y posteriormente fue inducida la expresión a partir de las 12 h (Figura 16). Ji *et al.* (2009) reportaron un comportamiento similar en el nivel de expresión de cMnSOD de *L. vannamei*; después de un decremento inmediato a la inyección con Laminarina el nivel de expresión fue recuperándose a partir de las 12 h hasta llegar al nivel más alto de expresión de cMnSOD a las 24 h.

Durante el análisis del presente trabajo, se observó una correlación en los niveles de expresión de CAT y mMnSOD. Se sabe que SOD es la primera enzima antioxidante que hace frente a los radicales libres acelerando la dismutación del $\cdot\text{O}^{-2}$ generado principalmente por el estallido respiratorio, CAT cataliza la remoción del H_2O_2 formado durante la reacción catalizada por SOD. De esta manera los EROs generados pueden modificar los niveles de SOD lo cual lleva a la alteración de los niveles de CAT; cualquier cambio en los niveles de expresión de SOD es acompañado por un cambio equiparable de CAT. Tendencias similares a las encontradas en este estudio fueron reportadas por Liu *et al.* (2010) y por Gopalakrishnan *et al.* (2011). Sin embargo, el incremento en los niveles de ARNm en hepatopáncreas para ambas enzimas antioxidantes no se refleja en la actividad enzimática, lo cual indica que, la regulación postranscripcional y/o postransduccional tiene un papel importante.

8.7. Genoteca sustractiva (SSH)

El método de hibridación por supresión sustractiva es una técnica simple y eficiente para generar ADN complementarios (ADNc) enriquecidos para transcritos diferencialmente expresados de baja abundancia (Diatchenko *et al.*, 1996). Sin embargo, la técnica presenta una desventaja, al cortar los ADNc en pequeños fragmentos con enzimas de restricción, de

tal manera que genes relacionados pero de diferentes familias con secuencias similares pueden ser hibridizados de manera cruzada y ser eliminados durante el proceso de substracción (Ko, 1990), por ello son genotecas poco abundantes. La genoteca construida en el presente trabajo fue de tipo “Forward”, es decir, se obtuvieron secuencias expresadas diferencialmente en el tratamiento y no en el control.

El sistema inmune innato es la primera línea de defensa que protege al hospedero en las primeras horas y días después de una infección (Lee y Söderhäll, 2002). La primera fase distintiva de respuesta inmune en camarones es aproximadamente a las 12 h después de un reto con patógenos (Bachère *et al.*, 2004). Basados en esta información y considerando que el 10 al 20% de camarones inmunoestimulados con β -1,3-glucanos y retados con WSSV sobrevive en comparación con menos del 1% observado durante un brote de WSSV en estanques de cultivo (Chang *et al.*, 2003; Pan *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2008), es posible considerar que estos camarones inmunoestimulados poseen una fuerte habilidad de defensa que los lleva a sobrevivir más tiempo a la infección. Apoyados en estos fundamentos, se decidió que 24 h posteriores al reto podría ser una importante etapa cuando sólo se expresan genes en camarones inmunoestimulados que le confieren una mayor resistencia a la infección con WSSV. Por lo tanto, se seleccionaron hepatopáncreas de camarones inmunoestimulados con β -1,3-glucano 24 h después de ser retados con WSSV para la hibridación por supresión sustractiva.

Como fueron descritos previamente en este trabajo, los 5 genes aislados de la genoteca sólo han sido descritos para el sistema inmune innato de humanos y su posible función en el sistema inmune de camarones podrían jugar un papel esencial en el proceso de resistencia a la infección de WSSV.

9. CONCLUSIONES

- Las cepas DH5, DH6 y LL1 de *Debaryomyces hansenii* tienen valor nutricional reflejado en el contenido de proteínas en hemocitos y la concentración de hemocitos totales en *L. vannamei*, además de inducir respuestas antioxidantes.
- La especie de camarón *Farfantepenaeus californiensis* fue altamente susceptible a la infección con WSSV como lo son otras especies de camarones.
- Las dietas suplementadas con β -caroteno y β -1,3-glucano aumentaron la actividad de enzimas antioxidantes e incrementaron el número de días de supervivencia en camarones con respecto al control.
- La vitamina E mostró potencial antioxidante aumentando la actividad de SOD y CAT en hepatopáncreas y músculo. Sin embargo, todos los camarones murieron a las 72 h posteriores a la infección.
- El transcrito de CAT es más abundante en hepatopáncreas y muy poco en músculo. Mientras que el transcrito de mMnSOD es más abundante en pleópodos e intestinos. En general, mMnSOD es más abundante en todos los tejidos que CAT.
- Los β -1,3-glucanos confieren protección antioxidante en los primeros minutos y horas posteriores a la infección con WSSV, aumentando la actividad antioxidante de CAT y mMnSOD para proteger las células del estrés oxidativo inducido por WSSV.
- Existe una correlación en los niveles de expresión de CAT y mMnSOD, cualquier cambio en los niveles de expresión de SOD es acompañado por un cambio equiparable de CAT.
- Los cambios en los niveles de ARNm en hepatopáncreas para ambas enzimas antioxidantes no se reflejan en la actividad enzimática, lo cual indica que son reguladas postranscripcional y/o postransduccionalmente.
- El método de hibridación por supresión sustractiva es efectivo para identificar transcritos diferencialmente expresados de baja abundancia, revelando genes nuevos involucrados en la respuesta inmune y resistencia a patógenos en camarones.

10. RECOMENDACIONES

Evaluar diferentes dosis y etapas de crecimiento de las cepas DH5, DH6 y LL1 de *Debaryomyces hansenii* y su efecto en la respuesta inmune y antioxidante de camarones.

Son necesarios estudios de campo que validen los resultados obtenidos en laboratorio, debido a las diferencias en cuanto a la patogénesis en los estanques de cultivo; como lo son las rutas de infección y por ende los niveles de inoculación de WSSV.

Completar los genes aislados de la genoteca sustractiva, caracterizarlos y medir los niveles de expresión de dichos genes en respuesta a una activación previa del sistema inmune de camarones y retarlos con WSSV. Estos resultados podrían contribuir a un mayor conocimiento de la interacción hospedero-patógeno en la respuesta inmune y la resistencia a las infecciones virales.

11. LITERATURA CITADA

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson J.D. 1996. *Biología Molecular de la Célula*. Tercera Edición. Ediciones Omega, S.A., Barcelona, España. 85-86

Alpuche, J., Pereyra, A. y Agundis, C. 2005. Biochemical responses in shrimps to marine environmental factors. *Revista Electrónica de Veterinaria REDVET*. 6 (5): 113-116.

Akiyama, D.M. & Dominy, W.G. 1989. Penaeid shrimp nutrition for the comercial feed industry. p. 20 In: *Texas Shrimp Farming Manual*, Vol. 1: Grow-out Technology. Texas Agricultural Extension Service and Texas A&M University, Sea Grant College Program.

Arun, S., Thirumurugan, R., Visakan, R., Balamurugan, S., Arunachalam, V., Subramanian, P., 2003. Optimal analytical conditions for catalase in fresh water prawn, *Macrobrachium malcolmsonii*. *Biotech. Histochem.*78: 1-4.

Asada, K., & Takahashi, M. 1987. Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis. In *Photoinhibition*, ed. DJKyle, CB Osmond, CJ Arntzen, Elsevier: Amsterdam. 228-87.

Assmann, G. & Nofer, J.R. 2003. Atheroprotective effects of high-density lipoproteins. *Annu. Rev. Med.* 54: 321-341.

Bachère, E., Milalhe, E., Noel, D., Boule, V., Morvan, A., Rodríguez, J., 1995. Knowledge and research prospects in marine mollusk and crustaceans immunology. *Aquaculture*, 132: 17-32.

Bachère, E. 2000. Shrimp immunity and disease control. *Aquaculture* 191: 3-11.

Bachère, E., Gueguen, Y., Gonzalez, M., de Lorgeril, J., Garnier, J. and Romestand, B. 2004. Insights into the anti-microbial defense of marine invertebrates: the penaeid shrimps and the oyster *Crassostrea gigas*. *Immun. Reviews* 198: 149-168.

Balaban, R.S., Nemoto, S., Finkel, T. 2005. Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell*. 120 (4): 483–495

Baily-Brock, J. H., Moss, S.M. 1992. Penaeid taxonomy, biology and zoonography In: Fast A. W. and Lester L. J. (Editors). *Marine shrimp culture: principles and practices* Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 9-28.

Bartlett, T.C., Cuthbertson, B.J., Shepard, E.F., Chapman, R.W., Gross P.S., Warr, G.W. 2002. Crustin, homologues of an 11.5-kDa antibacterial peptide, from two species of penaeid shrimp, *Litopenaeus vannamei* and *Litopenaeus setiferus*. *Mar Biotechnol* 4: 278–293.

Bauchau, A.G. 1981. Crustaceans. In: Ratcliffe N. A. and Rowley, A. F. (editors). *Invertebrate blood cells*. Academic Press, London and New York. 385-420.

Bayne, J.C., 1990. Phagocytosis and non-self recognition in invertebrates. *BioScience*, 40 (10): 723-731.

Beck, S., A. Olek and J. Walter. 1999. From genomics to epigenomics: a loftier view of life. *Nature Biotech.* 17: 114-124.

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

Bell, T.A., Lightner, D.V. 1998. *A handbook of normal penaeid shrimp histology*. The World Aquaculture Society. Baton Rouge, 114 p.

Blank, M.L., Lee, T.C., Fitzgerald, V. and Snyder, F. 1981. A specific acetylhydrolase for 1-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine (ahypotensive and platelet-activating lipid). *J. Biol. Chem.* 256: 175-178.

Bohn, J.A., & BeMiller, J.N. 1995. (1,3)- β -glucans as biological response modifiers: a review of structure-functional activity relationships. *Carbohydrate polymers* 28: 3-14.

Boas, J.E.V. (1880). Studier over Decapoderns Slaegtskabsforhold. Vidensk. Selsk. Kristianaia, 5 (6): 25-210.

Borkovic, S.S., Pavlovic, S.Z., Kovacevic, T.B., Stajn, A.S., Petrovic, V.M., Saicic, Z.S. 2008. Antioxidant defence enzyme activities in hepatopancreas, gills and muscle of spiny cheek crayfish (*Orconectes limosus*) from the River Danube. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 147: 122–128.

Brouwer, M., Hoexum-Brouwer, T., Grater, W., Brown-Peterson, N. 2003. Replacement of a cytosolic copper/zinc superoxide dismutase by a novel cytosolic manganese superoxide dismutase in crustaceans that use copper (haemocyanin) for oxygen transport *Biochem. J.* 374: 219–228.

Brown, G.C. & Borutaite, V. 1999. Nitric oxide, cytochrome C and mitochondria. *Biochem Soc Symp* 66: 17–25.

Brown, G. D. & Gordon, S. 2003. Fungal β -glucans and mammalian immunity. *Immunity* 19: 311-315.

Burgents, J.E., Burnett, K.G., Burnett, L.E. 2004. Disease resistance of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, following the dietary administration of a yeast culture food supplement. *Aquaculture* 231:1-8

Burukovsky, R. N. 1997. Selection of a type species for Farfantepenaeus Burukovsky (Crustacea: Decapoda: Penaeidae) *Proceedings of the Biological Society of Washington*, 1(110): 154

Campa-Córdoba, A.I., Hernandez-Saaveda, N.Y., De Philippis, R., 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 and Shellfish Immunol* 12: 353–366.

Carrillo-Fuentes, A., 2000. Evaluación del potencial nutricional de *Nannochloropsis oculata* en mezclas de microalgas para larvas de camarón azul, *Litopenaeus stylirostris* Stimpson. Tesis de Maestría. Universidad de Sonora. Hermosillo, Sonora. 101p.

Castex, M., Lemaire, P., Wabete, N., Chim, L. 2010. Effect of probiotic *Pediococcus acidilactici* on antioxidant defences and oxidative stress of *Litopenaeus stylirostris* under *Vibrio nigripulchritudo* challenge. Fish and shellfish immunology 28: 622-631.

Civera, R. & Guillaume, J. 1989. Effect of sodium phytate on growth and tissue mineralization of *Penaeus japonicus* and *Penaeus vannamei* juveniles. Aquaculture 77: 145-156.

Conklin, 1995. Digestive physiology and nutrition. In: Biology of the lobster *Homarus americanus* (ed. By J.R. Factor) 16: 441-463.

Costa, F.H., Valença, A.R., Silva, B.P., Bezerra, G.A, Cavada, B.S., Rádis-Baptista, G. 2011. Cloning and molecular modeling of *Litopenaeus vannamei* (Penaeidae) C-type lectin homologs with mutated mannose binding domain-2. Genet. Mol. Res. 10 (2): 650-664.

Conapesca, 2009. Anuario estadístico de acuicultura y pesca. SAGARPA. http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx/wb/cona/cona_estadistica_pesquera_y_acuicola

Corthésy-Theulaz, I., den Dunnen, J.T., Ferré, P., Geurts, J.M.W., Müller, M., van Belzen, N., van Ommen, B. 2005. Nutrigenomics: the impact of biomics technology on nutrition research. Ann Nutr Metab 49: 355-265.

Christensen, N.J., Habekost, G., Bratholm, P. 2008. A RNA transcript (Heg) in mononuclear cells is negatively correlated with CD14 mRNA and TSH receptor autoantibodies. Clin Exp Immunol. 154(2):209-215.

Christoforidis, S., McBride, H.M., Burgoyne, R.D., Zerial, M. 1999a. The Rab5 effector EEA1 is a core component of endosome docking. Nature 397:621–625.

Chang P.S., Lo C.F., Wang Y.C., Kou G.H. 1996. Identification of whitespot syndrome associated baculovirus (WSBV) target organs in the shrimp *Penaeus monodon* by *in situ* hybridization. *Dis Aquat Org* 27: 131-139

Chang, C.F., Su, M.S., Chen, H.Y., Lo, C.F., Kou, G.H., Liao, I.C. 1999. Effect of dietary beta-1,3-glucan on resistance to white spot syndrome virus (WSSV) in postlarval and juvenile *Penaeus monodon*. *Dis. Aquat. Organ.* 36: 163–168.

Chang, C.F., Chen, H.Y., Su, M.S., Liao, I.C. 2000. Immunomodulation by dietary β -1,3-glucan in the brooders of the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Fish Shellfish Immunol* 10: 505–514.

Chang, C.F., M.S. Su, H.Y. Chen & I.C. Liao. 2003. Dietary β -1,3-glucan effectively improves immunity and survival of *Penaeus monodon* challenged with white spot syndrome virus. *Fish Shell. Immunol.* 15: 297-310.

Chang, J., Zhang, W., Mai, K., Ma, H., Liufu, Z., Wang, X., Ai, Q., Xu, W. 2010. Effects of dietary β -glucan and glycyrrhizin on non-specific immunity and disease resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone) challenged with *Vibrio alginolyticus*. *Aquaculture Research.* 111: 1365-2109.

Chao, J.C., Yuen, M.D., Chen, P.Y., Chien, S.W. 2002. Vitamin C and E supplements improve the impaired antioxidant status and decrease plasma lipid peroxides in hem dialysis patients. *J Nut Biochem* 13: 653-663.

Chatterjee, I.B. 1973. Evolution and biosynthesis of ascorbic acid, *Science* 182: 1271-1272.

Chávez-Calvillo, G., Perez-Rueda, E., Lizama, G., Zúñiga Aguilar, J.J., Gaxiola, G., Cuzon, G., Arena-Ortiz, L. 2010. Differential gene expression in *Litopenaeus vannamei* shrimp in response to diet changes. *Aquaculture* 4: 137-141.

Chelikani, P., Ramana, T., Radhakrishnan, T.M. 2005. A repertoire of unusual feature. *Indian Journal of Clinical Biochemistry.* 20 (2): 131-135.

Chen, J.C., M.N. Lin, Y.Y. Ting, and J.N. Lin. 1995. Survival, haemolymph osmolality and tissue water of *Penaeus chinensis* juveniles acclimated to different salinity and temperature levels. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 110: 253-258.

Cheng, W., Liu, C.H., Kuo, C.M. & Chen, J.C. 2005. Dietary administration of sodium alginate enhances the immune ability of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. *Fish Shellfish Immunol.* 18: 1–12.

Cheng, S.Y., Hsu, S.W., Chen, J.C., 2007. Effect of sulfide on the immune response and susceptibility to *Vibrio alginolyticus* in the kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus*. *Fish & Shellfish Immunology*, 22: 16-26.

Chien, Y.H., Pan, C.H., Hunter, B. 2003. The resistance to physical stresses by *Penaeus monodon* juveniles fed diets supplemented with astaxanthin. *Aquaculture* 216: 177–191.

Chiu, C.H., Guu, Y.K., Liu, C.H., Pan, T.M., Cheng, W., 2007. Immune responses and gene expression in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, induced by *Lactobacillus plantarum*. *Fish & Shellfish Immunology* 23: 364-377.

Dall, W., Hill, B.J., Rothlisberg, P.C., Staples, D.J., 1990. Biology of the Penaeidae. In: Blaxter, J.H.S., Southward, A.J. (Eds.), *Advances in Marine Biology*, vol. 27. Academic Press, London, UK. 489.

Dalmo, R.A. & Bogwald, J. 2008. β -glucans as conductor of immune symphonies. *Fish Shellfish Immunol*, 25: 384-396.

Dandapat, J., Gagan, B., Chainy, N., Janardhana, R. 2000. Dietary vitamin-E modulates antioxidant defence system in giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* 127:101-115.

Dandapat, J., Chainy, G.B., Rao, K.J. 2003. Lipid peroxidation and antioxidant defence status during larval development and metamorphosis of giant prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Comparative Biochemistry and Physiology* C135: 221-233.

de-la-Re-Vega, E, García-Galaz, A, Díaz-Cinco, M.E., Sotelo-Mundo, R.R. 2006. White shrimp (*Litopenaeus vannamei*) recombinant lysozyme has antibacterial activity against Gram negative bacteria: *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio cholerae*. *Fish Shellfish Immunol* 20:405-412.

Destoumieux, D., Bulet, P., Loew, D., Van Dorsselaer, A.V., Rodriguez, J., Bachere, E. 1997. Penaeidins: A new family of antimicrobial peptides in the shrimp *Penaeus vannamei* (Decapoda). *J Biol Chem* 272: 28398–28406.

Destoumieux, D., Bulet, P., Strub, J.M., Dorsselaer, A.V., Bachere, E. 1999. Recombinant expression and range of activity of penaeidins, antimicrobial peptides from penaeid shrimp. *Eur J Biochem* 266: 335–346.

Diatchenko, L., Lau, Y.F., Campbell, A.P., Chenchik, A., Moqadam, F., Huang, B., Lukyanov, S., Lukyanov, K., Gurskaya, N., Sverdlov, E.D. Siebert, P.D. 1996. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 6025–6030.

Díaz-Rosales, P., Chabrilón, M., Arijo, S., Martinez-Manzanares, E., Moriño, M.A., Balebona, M.C. 2006. Superoxide dismutase and catalase activities in *Photobacterium damsela* ssp. *Piscicida*. *Journal of Fish Diseases*. 29(6): 355-364

Downs, C., J. Faiths & C. Woodley. 2001. Assessing the health of grass shrimp (*Palaeomonetes pugio*) exposed to natural and anthropogenic stressors: a molecular biomarker system. *Mar. Biotechnol.* 3: 380–397.

Echeverría, F., Otero, V., Cornejo, F., Rodríguez, J. 2002. WSSV y ciclo de muda en el camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. *El mundo acuícola* 8 (1): 43-46.

Elstad, M.R., Prestcott, S.M., McIntyre, T.M., Zimmerman, G.A. 1989. Synthesis and release of platelet-activating factor by stimulated human mononuclear phagocytes. *J Immunol* 140 (5): 1618-1624.

Escobar, J.A., Rubio, M.A., Lissi, E.A. 1996. SOD and catalase inactivation by singlet oxygen and per oxyl radicals. *Free Rad. Biol. Med.* 20: 285-290.

Escobedo-Bonilla, C.M., Alday-Sanz, V., Wille1, M., Sorgeloos, P., Pensaert, M.B., and Nauwynck, H.J., 2008. A review on the morphology, molecular characterization, morphogenesis and pathogenesis of white spot syndrome virus. *Journal of Fish Diseases*, 31: 1–18.

Fang, F.C. 2004. Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies. *Nat. Rev. Microbiol.* 2:820–832.

FAO, 2009. Anuarios Estadísticos de Pesca. Cuadros resumidos. Producción pesquera Estimación del valor por grupos de especies. <http://www.fao.org/fishery/es>

Fearon, D. T. 1997. Seeking wisdom in innate immunity. *Nature* 388: 323–324.

Fernández-Giménez, A., J. Fenucci & A. Petriella. 2004. The effect of vitamin E on growth, survival and hepatopancreas structure of the Argentine red shrimp *Pleoticus muelleri* Bate (Crustacea, Penaeidea). *Aquac. Res.* 35: 1172-1178.

Fideicomisos Instituidos en Relación con la Agricultura (FIRA) 2009. Situación actual y perspectivas del camarón en México. *Boletín Informativo* 3: 104.

Flegel, T.W. 1997. Special topic review: major viral diseases of the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) in Thailand. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 13: 433–442.

Flores -Leyva, L. 2006. Evaluación de pigmentos carotenoides como aditivos alimentarios para la prevención de infecciones producidas por el virus del Síndrome de la Mancha Blanca (WSSV) y la bacteria *Vibrio harveyi* en camarón blanco

Litopenaeus vannamei. Tesis de Maestría. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. La Paz, BCS, México.

Fridovich I. 1974. Superoxide dismutases. *Adv. Enzymol.* 41: 35-97.

Fridovich I. 1998. Oxygen toxicity: a radical explanation. *J. Exp. Biol.* 201: 1203–1209.

Frigg, M., Prabucki, A.L., y Ruhdel, E.V. 1990. Effect of vitamin E levels on oxidative stability of trout filet. *Aquaculture* 84: 145-158.

García, J. & Castrillo, J.L. 2004. Identification of two novel human genes, DIPLA1 and DIPAS, expressed in placenta tissue. *Gene.* 3: 344:241

García, M.X., Foote, C., Van, S.E., Devreotes, P., Alexander, S., Alexander, H., 2000. Differential development expression and cell type specificity of Dictyostelium catalases and their response to oxidative stress and UV-light. *Biochim. Biophys. Acta* 1492: 295– 310.

García-Rodríguez, C., Montero, M., Álvarez, J., García-Sancho, J., Sánchez-Crespo, M. 1993. Dissociation of platelet-activating factor production and arachidonate release by the endomembrane Ca-ATPase inhibitor thapsigargin. Evidence for the involvement of a Ca²⁺-dependent route of priming in the production of lipid mediators by human polymorphonuclear leukocytes. *J. Biol. Chem.*, 268: 24751-24757.

Gatesoupe, F.J., 2007. Live yeasts in the gut: Natural occurrence, dietary introduction, and their effects on fish health and development. *Aquaculture* 267: 20–30.

German, J.B., Bauman, D.E., Burrin, D.G., Failla, M.L., Freake, H.C., King, J.C., Gillies, S., Faha, P.D. 2003. Nutrigenomics: The Rubicon of molecular nutrition. *Journal of the American Dietetic Association* 103: 550-555.

Gillies, J. P., Faha, P. D. 2003. Nutrigenomics: The Rubicon of molecular nutrition. *Journal of the American Dietetic Association* 103: 550-555.

Giulianini, P.G., Bierti, M., Lorenzon, S., Battistella S., Ferrero, A. 2007. Ultrastructural and functional characterization of circulating hemocytes from de freshwater crayfish *Astacus leptodactylus*: cell types and their role after in vivo artificial non-self challenge. *Micron*. 38: 49-57.

Gómez, A. A. 2007. Nutrigenómica y Nutrigenética. *Ámbito Farmacéutico, Nutrición* 25:78-86.

Gómez-Anduro, G., Barillas-Mury, C.V., Peregrino-Uriarte, A.B., Gupta, L., Gollas-Galván, T., Hernández-López, J., Yepiz-Plascencia, G. 2006. The cytosolic manganese superoxide dismutase from the shrimp *Litopenaeus vannamei*: Molecular cloning and expression. *Developmental and Comparative Immunology*. 30: 893-900.

Gopalakrishnan, S., Chen, F.Y., Thilagam, H., Qiao, K., Xu, W.F., Wang, K.J. 2011. Modulation and Interaction of Immune-Associated Parameters with Antioxidant in the Immunocytes of Crab *Scylla paramamosain* Challenged with Lipopolysaccharides. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, Artículo ID 824962, 1-8.

Gross, S. D., Anderson, R. A. 1998. Casein kinase I: spatial organization and positioning of a multifunctional protein kinase family [In Process Citation]. *Cell Signal* 10: 699-711.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. 1989. *Free radicals in biology and medicine*. 2nd ed. Oxford: Clarendon Press, 124.

Halliwell, B., J.M.C. Gutteridge. 1996. Oxygen radicals and nervous system. *Trends Neurosci*. 8: 22–26.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. 1999. *Free Radicals in Biology and Medicine*. New York: Oxford Univ. Press. 936.

Harland, J.I. 2005. Nutrition and genetics. Mapping individual health. ILSI Europe Concise Monograph Series, 1-24.

Harman, D. 1999. Free radical theory of aging: increasing the average of life expectancy at birth and the maximum life span. *J Anti-Aging Med* 2: 199–208.

Hasson, K. W., Lightner, D. V., Poulos, B. T., Redman, R. M., White, B. L., Brock, J. A. & Bonami, J.R. 1995. Taura syndrome in *Penaeus vannamei*: demonstration of a viral etiology. *Diseases of Aquatic Organisms* 23, 115-126.

He, H., Lawrence, A.L., Liu, R. 1992. Evaluation of dietary essentiality of fat-soluble vitamins, A, D, E and K for penaeid shrimp (*Penaeus vannamei*). *Aquaculture*. 103: 177-185.

He, H., Lawrence, A.L., 1993a. Vitamin C requirement of the shrimp *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* 114: 305–316.

Hendrickx, M.E. 1995. Camarones. *In*: Fischer, W., Krupp, F., Schneider, W., Sommer, C., Carpenter, K.E. y Niem, V.H. (Eds.). Guía FAO para la identificación de especies para los fines de la pesca. Pacífico centro-oriental. Vol. I. Plantas e Invertebrados. F.A.O. Roma, Italia. 417-537.

Hendrickx, M.E. 1996. Los camarones Penaeoidea bentónicos (Crustacea: Decapoda: Dendrobranchiata) del Pacífico mexicano. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad e Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM, México. 148.

Hoffmann, J.A., Kafatos, F.C., Janeway, J.C.A., Ezekowitz, R.A.B. 1999. Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Microbes, Immunity and Disease*; 284: 1313-1318.

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

Huang, C.H., L.R. Zhang, J.H. Zhang, L.C. Xiao, Q.J. Wu, D.H. Chen & J.K.K. Li. 2001. Purification and characterization of White Spot Syndrome Virus (WSSV) produced in an alternate host: Crayfish, *Cambarus clarkia*. *Virus Res.* 76: 115–125.

Huberman, A. 2000. Shrimp endocrinology. A review. *Aquaculture* 191:191–208.

Huanqui-Guerra, C. 1997. Oxidantes-Antioxidantes en Reumatología. *Rev. Perú Reum.* 3 (1): 35-40.

Hunt C, J. Sim, J.E., Sullivan, S.J., Featherstone, T., Golden, W., Kapp-Herr, C.V., Hock, R. A., Gomez, R.A., Parsian, A.J., Spitz, D.R. 1998. Genomic instability and catalase gene amplification induced by chronic exposure to oxidative stress. *Cancer Res* 58: 3986-3992.

Itami, T., Takahashi, Y., Tsuchihira, E., Igusa, H., Kondo, M. 1994. Enhancement of disease resistance of Kuruma prawn *Penaeus japonicus* and increase in phagocytic activity of prawn hemocytes after oral administration of B 1-3 glucan (Schizophyllan) In: Chou, L.M., Munro, A.D., Lam, T.T., Chen, T.W., Leong, L.K.K., Ding, J.K., Hooi, K.K., Khoo, H.W., Phang, V.P.E., Shim, K.F., Tan, C.H. (eds) *The Third Asian Fisheries Forum, Asian Fish.Soc. Manila*, 375-378.

Itami, T., Asano, M., Tokushige, K., Kubono, K., Nakagawa, A., Takeno, N., Nishimura, H., Maeda, M., Kondo, K., Takahashi, Y. 1998. Enhancement of disease resistance of kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, after oral administration of peptidoglycan derived from *Bifidobacterium thermophilum*. *Aquaculture* 164: 272-288.

Iwanaga S., Kawabata, S., Muta, T. 1998. New types of clotting factors and defense molecules found in horseshoe crab hemolymph: their structures and functions. *J Biochem* 123: 1–15.

Janeway, C.A., Jr. 1989. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb. Symp.Quant. Biol.* 54: 1–13.

Janeway J.C.A., & Medzhitov, R. 1998. Introduction: the role of innate immunity in the adaptive innate response. *Semin Immunol*; 10: 349-350.

Ji, P.F., Yao, C.L., Wang, Z.Y. 2009. Immune response en gene expression in shrimp (*Litopenaeus vannamei*) hemocytes and hepatopáncreas against some pathogen-associated molecular patterns. *Fish Shell Immuno*, 27: 563-570.

Johansson, M. W. & Söderhäll, K. 1988. Isolation and purification of a cell adhesion factor from crayfish blood cells. *J. Cell Biol.* 106: 1795–1803.

Johnson, P.T. 1980. *Histology of the blue crab, Callinectes sapidus. A model for the Decapoda.* Praeger, New York, 440.

Kanagu, L., Senthilkumar, p., Stella, C., Jaikumar, M. 2010. Effect of vitamin C and E and β -1.3-glucan as immunomodulators in *P. monodon* disease management. *Middle-East Journal of Scientific Researc* 6(5): 537-543.

Kaput, J. & Rodríguez, R.L. 2004: Nutritional genomics: the next frontier in the postgenomic era. *Physiol Genomics.* 16: 166-177.

Kaput, J., Ordovas, J.M., Ferguson, L. 2005. The case for strategic international alliances to harness nutritional genomics for public and personal health. *Br J Nutr* 94: 623-632.

Kawasaki, N., Kawasaki, T., Yamashina, I., 1989. A serum lectin (mannan-binding protein) has complement-dependent bactericidal activity. *J. Biochem.* 106: 483–489.

Kim, Y.A. 2006. Hematopoiesis, Kazal inhibitors and crustins in a crustacean. Thesis UppsalaUniversitet. Digital <http://urn.kb.se/resolve?urn=urn:nbn:se:uu:diva-7123>.

Knippschild, U., Gocht, A., Wolff, S., Huber, N., Lohler, J., Stoter, M. 2005. The casein kinase 1 family: participation in multiple cellular processes in eukaryotes. *Cell Signal* 17: 675–689.

Krinsky, N.I. 1989. Antioxidant functions of carotenoids. *Free Radic. Biol. Med.* 7: 617–35

Ko, M.S. 1990. An “equalized cDNA library” by the reassociation of short double-stranded cDNAs. *Nucleic Acids Res* 18: 5705–5711.

Kontara, E.K.M., Merchie, G., Lavens, P., Nelis, H., Leenheer, A., Sorgeloos, P., 1995. Improved larviculture outputs of postlarval shrimp *Penaeus vannamei* through supplementation of L-ascorbyl-2-polyphosphate in the diet. *Eur. Aquac. Soc. Spec. Publ.* 24: 230–233.

Korc, I., Bidegain, M., Martell, M. 1995. Radicales libres Bioquímica y sistemas antioxidantes Implicancia en la patología neonatal. *Rev Med Uruguay* 11: 121-135

Kussmann, M., Affolter, M., Fay, L.B. 2005. Proteomics in nutrition and health. *Comb. Chem. High T. Scr.* 8: 679-696.

Lambeth, J.D. 2004. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nature Reviews Immunology.* 3: 181–189.

Lavens, P., Merchie, G., Ramos, X., Leon-Hing, A., Van Hauwaert, A., Pedrazzoli, A., Nelis, H., Leenheer, A., 1999. Supplementation of ascorbic acid 2-monophosphate during the early postlarval stage of the shrimp *Penaeus vannamei*. *Aquac. Nutr.* 5: 205–209.

Lavens, P., y Sorgeloos, P. 2000. Experiences on importance of diet for shrimp larval quality. *Aquaculture* 191: 169-176.

Lau, F.C., Bagchi, M., Sen, C., Roy, S., Bagchi, D. 2008. Nutrigenomic Analysis of Diet-Gene Interactions on Functional Supplements for Weight Management. *Current Genomics* 9: 239-251.

Lee, M.H. & Shiau, S.Y. 2003. Increase of dietary vitamin C improves haemocyte respiratory burst response and growth of juvenile grass shrimp, *Penaeus monodon*, fed with high dietary copper. *Fish Shellfish Immunol.* 14: 305–315.

Lee, M.H. & Shiau, S.Y (2004) Vitamin E requirements of juvenile grass shrimp, *Penaeus monodon*, and effects on non-specific immune responses. *Fish Shellfish Immunol.*, 16: 475–485.

Lee, S.Y. y Söderhäll, K., 2001. Characterization of a pattern recognition protein, a masquerade-like protein, in the freshwater crayfish *Pacifastacus leniuculus*. *J. Immunol.* 166: 7319-7326.

Lee, S.Y. y K. Söderhäll. 2002. Early events in crustacean innate immunity. *Fish & Shellfish Immunology* 12: 421-437.

Le Moullac, G. & Haffner, P. 2000. Environmental factors affecting immune responses in crustacea. *Aquaculture* 191: 123-132.

Lightner, D.V. 1993. Diseases of cultured penaeid shrimp. In: J.P. McVey (ed.) *CRC Handbook of Mariculture, Second edition, Volume 1, Crustacean Aquaculture*. CRC Press Inc., Boca Raton, FL. 393-486.

Lightner D., Redman R., Poulus B., Nunan L., Mari J., Hasson K., 1997. Risk of spread of penaeid shrimp viruses in the Americas by the international movement of live shrimp for aquaculture and frozen shrimp for commodity markets. *Revue Scientifique et technique Office International des Épizooties* 16: 146-160.

Lighthner, D.M., Redman R.M. 1998. Strategies for the control of viral diseases of shrimp in the Americas, *Fish Pathol.* 33: 165-80

Lighthner, D.M., 1999. The penaeid shrimp viruses TSV, IHHNV, WSSV, and YHV: Current status in the Americas, available diagnostic methods, and management strategies. *J Appl Aquacult* 9: 27–52, 1999.

Lin, Y.C., Lee, F.F., Wu, C.L., Chen, J.C. 2010. Molecular cloning and characterization of a cytosolic manganese superoxide dismutase (cytMnSOD) and mitochondrial manganese superoxide dismutase (mtMnSOD) from the kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus*. *Fish & Shellfish Immunology*. 28:143-150.

Liñán-Cabello, M.A., Paniagua-Michel, J., Hopkins, P.M. 2002. Bioactive roles of carotenoids and retinoids in crustaceans. *Aquaculture Nutrition* 8: 299-309.

Liochev, S.I., Fridovich, I. 1994. The role of O₂ in the production of HO: In vitro and *in vivo*. *Free Radic Biol Med* 16: 29-33.

Liu, Y., Wang, W.N., Wang, A. L., Wang, J. M., Sun, R. Y., 2007. Effects of dietary vitamin E supplementation on antioxidant enzyme activities in *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) exposed to acute salinity changes. *Aquaculture* 265: 351-358.

Liu, H.P., Chen, F.Y., Gopalakrishnan, S., Qiao, K., Bo, J., Wang, K.J. 2010. Antioxidant enzymes from the crab *Scylla paramamosain*: Gene cloning and gene/protein expression profiles against LPS challenge. *Fish & Shellfish Immunol* 28: 862-871.

Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402–408.

Livingstone, D.R. 2001. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Mar. Pollut. Bull.* 42: 656–666.

Lo, C.F., Ho, C.H., Peng, S. E., Chen, C. H., Hsu, H. C., Chiu, Y. L., Chang, C. F., Liu, K. F., Su, M. S., Wang, C. H. & Kou, G. H., 1996b. White spot syndrome baculovirus (WSBV) detected in cultured and captured shrimp, crabs and other arthropods. *Diseases of Aquatic Organisms* 27: 215–225.

López, E., Cuzon, G., Gaxiola, G., Taboada, G., Valenzuela, G., Pascual, C., Sánchez, A., Rosas, C. 2003. Physiological, nutritional, and immunological role of dietary h 1-3 glucan and ascorbic acid 2-monophosphate in *Litopenaeus vannamei* juveniles. *Aquaculture* 224: 223–243.

Loschen, G., Azzi, A., Richter, C., Flohebp, L. 1974. Superoxide radicals as precursors of mitochondrial hydrogen peroxide. *FEBS Lett* 42: 68-72.

Lotz, J.M. 1997a. Special topic review: viruses, biosecurity and specific pathogen-free stocks in shrimp aquaculture. *World journal of microbiology & Biotechnology* 13(4): 405-413.

Lledías F., Rangel, P., Hansberg, W. 1998. Oxidation of catalase by singlet oxygen. *J Biol Chem* 273: 10630-10637.

Mclean, E. & Craig, S.R. 2007. Nutrigenomics in aquaculture research: a key in the 'Aquanomic' revolution. Aquaculture technical article. <http://en.engormix.com/MA-aquaculture/articles/p90.htm>

Marla SS, Lee J, Groves JT. 1997. Peroxynitrite rapidly permeates phospholipid membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:14243-48.

Martin, G. G., Hose, J. E., Omori, S., Clong, C., Hoodbhoy, T. and Mcbrell, N. 1991. Localization and roles of coagulation and transglutaminase in hemolymph coagulation in decapod crustaceans. *Comparative Biochemistry and Physiology B* 100: 517-522.

Mathew, S., Kumar, K.A., Anandan, R., Nair, P.G.V., Devadasan, K. 2007. Changes in tissue defence system in white spot syndrome virus (WSSV) infected *Penaeus monodon*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*. 145: 315-320.

Mayes, P.A. 1997. Estructura y función de vitaminas hidrosolubles. En: *Bioquímica de Harper*. Murray RK, Mayes PA, Granner DK eds. México DF: El Manual Moderno, S. A. 719-739.

Medzhitov, R. & Janeway, C. Jr. 2000. Innate immunity. *N. Engl. J. Med.* 343: 338-344.

Merchie, G., Kontara, E., Lavens, P., Robles, R., Kurmaly, K. y Sorgeloos, P. 1998. Effect of vitamin C and astaxanthin on stress and disease resistance of postlarval tiger shrimp, *Penaeus monodon* (Fabricius). *Aquac. Res.*, 29: 579-585.

Meyers, S.F., Latscha, L. 1997. Carotenoids In: D'Ábramo, L.R., Conklin, D.E. and Akiyama, D.M. (Eds.). Crustacean Nutrition Advances in World Aquaculture, 164-193. The World Aquaculture Society. Baton Rouge, L.A. USA.

Miki, W., Otaki, N., Shimidzu, N., Yokoyama, A. 1994. Carotenoids as free radical scavengers in marine animals. J. Mar. Biotechnol.2: 35–37.

Mohankumar, K. & Ramasamy, P., 2006. White spot syndrome virus infection decreases the activity of antioxidant enzymes in *Fenneropenaeus indicus*. Virus Research 115: 69-75.

Moncada, S., Palmer, R.M., Higgs, E.A. 1991. Nitric oxide: Physiology, Pathophysiology, and pharmacology. Pharmacol Rev 43:109-142.

Montoya, N., Molina, C., 1995. Optimum supplemental level of L-ascorbyl-2-phosphate-Mg to diet for white shrimp *Penaeus vannamei*. Fish. Sci. 61: 1045– 1046

Morales-Bojórquez, E., López-Martínez, J., Hernández-Vázquez, S., 2001. Dynamic catch-effort model for brown shrimp *Farfantepeneaus californiensis* (Holmes) from the Gulf of California, México. Ciencias Marinas 27: 105-124.

Morán-Morales, L., 2006. Hipoxia e inmunidad en *Farfatepenaeaus californiensis*. Tesis de Maestría. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. A.C. La Paz, Baja California Sur, México.

Mourente, G., 1996. In vitro metabolism of C-14-polyunsaturated fatty acids in midgut gland and ovary cells from *Penaeus kerathurus* Forskal at the beginning of sexual maturation. Comp. Biochem. Physiol. B 115: 255–266.

Mourente, G., Díaz-Salvago, E., 1999. Characterization of antioxidant systems, oxidation status and lipids in brain of wild-caught size-class distributed *Aristeus antennatus* (Risso, 1816) Crustacea, Decapoda. Comp.Biochem. Physiol. B 124: 405– 416.

Muñoz, M., Cedeno, R., Rodríguez, J., Van der Knaap, W., Mialhe, E., Bachere, E., 2000. Measurement of reactive oxygen intermediate production in hemocytes of penaeid shrimp, *Penaeus vannamei*, *Aquaculture* 191: 89-107.

Mutch, D.M, Wahli, W., Williamson, G. 2005. Nutrigenomics and nutrigenetics: the emerging faces of nutrition. *FASEB J* 19: 1602-1616.

Newman, S.G. & Bullis, R.A. 2001. Immune Mechanisms of shrimp: form, function and practical application. In: *The New Wave*, Browdy, C.L. and D.E. Jory (Eds.). The World Aquaculture Society, Baton Rouge, L.A., USA. 226-237.

Nielsen, E., Christoforidis, S., Uttenweiler-Joseph, S., Miaczynska, M., Dewitte, F., Wilm M., Hoflack, B., Zerial, M. 2000. Rebenosyn-5, a novel Rab5 effector, is complexed with hVPS45 and recruited to endosomes through a FYVE finger domain. *J Cell Biol* 151: 601–612.

Ocampo, L., Rosas, C., Villarreal, H. 2003. Effect of temperature on post-prandial metabolism of brown shrimp *Farfantepenaeus californiensis*. *Journal of Shellfish Research*. 22(1): 1-4.

Olalla, M.L., Matés, J. M., 1999. Radicales libres de oxígeno y enzimas antioxidantes. Encuentros en la Biología, 1999 - dialnet.unirioja.es

Organización Internacional de Epizootias (OIE) 2000. Report of the Meeting of the OIE Fish Diseases Commission, Paris 11-13 September 2000.

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

Osna, N.A., White, R.L., Krutik, V.M., Wang, T., Weinman, S.A., Donohue, T.M. Jr. 2008. Proteasome activation by hepatitis C core protein is reversed by ethanol-induced oxidative stress. *Gastroenterology*. 7: 2144-2152.

Otta S.K., Shubha G., Joseph B., Chakraborty A., Karunasagar I., Karunasagar I. 1999. Polymerase chain reaction (PCR) detection of white spot syndrome virus (WSSV) in cultured and wild crustaceans in India. *Dis Aquat Org* 38: 67-70

Páez-Osuna, F. 2005. Retos y perspectivas de la camaronicultura en la zona costera. *Revista Latinoamericana de Recursos Naturales* 1: 21-31.

Packer, L. 1991. Interactions among antioxidants in health and disease: vitamin E and its redox cycle. *Proc. Soc. Exp. Biol Med.* 200: 271-276.

Palou, A., Bonet, M.L., Serra, F. 2002. Study on Obesity and Functional Foods in Europe. Luxembourg: European Commission, Directorate General for Research 411.

Palou, A., Bonet, M., Picó, C., Rodríguez, A.M. 2004. Nutrigenómica y obesidad. *Rev Med Univ Navarra* 48: 36-48.

Pan, D., He, N., Yang, Z., Liu, H., Xu, X. 2005. Differential gene expression profile in hep atopancreas of WSSV-resistant shrimp (*Penaeus japonicus*) by suppression subtractive hybridization. *Dev. Comp. Immunol.* 29: 103-112, 2005.

Paoloni-Giacobino, A., Grimble, R., Richard, C. 2003. Genetics and Nutrition. *Clinical Nutrition* 5: 429-435.

Pastor, N., Weinstein, H., Jamison, E., Brenowitz, M. 2000. A detailed interpretation of OH radical footprints in a TBPDNA complex reveals the role of dynamics in the mechanism of sequence specific binding. *J Mol Biol.* 304: 55-68.

Peulen, O., Deloyer, P., Grandfils, C., Loret, S., Dandrifosse, G., 2000. Intestinal maturation induced by spermine in young animals. *Livestock Prod. Sci.* 66: 109-120.

Pérez-Farfante, I. y Kensley, B. 1997. Penaeoid and sergestoid shrimps and prawns of the world. Keys and diagnoses for the families and genera. *Mémoires du Museum national d'Histoire naturelle, Paris.* 175: 1-234.

Prager, E.M., Jollés, P. 1996. Animal lysozymes c and g: an overview. In: Jollés P, editor. Lysozymes: model enzymes in biochemistry and biology. Basel, Switzerland: Birkhäuser Verlag; 9-31.

Raa, J. 1996. The use of immunostimulatory substances in fish and shellfish farming. *Reviews in Fisheries Science*, 4(3): 229-288.

Ramírez-Douriet, C., De Silva-Dávila, R., Méndez-Lozano, J., Escobedo-Urias, D., Leyva-Arana, I. & López-Meyer, M. 2005. White spot syndrome virus detection in zooplankton of coastal lagoons and shrimp commercial ponds in Sinaloa, Mexico. In: 135th Annual Meeting of the American Fisheries Society (ed. by The American Fisheries Society), poster. Anchorage, Alaska.

Ranby, B., Rabek, J.E. 1978. In: Ranby, B., Rabek, J.E. (Eds.), Singlet Oxygen. Wiley, Chichester, England. 331.

Ren, Q., R.R. Zhang, X.F. Zhao, J.X. Wang. 2009. A thioredoxin response to the WSSV challenge on the Chinese white shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. *Comp Biochem Physiol. C*. Article in Press.

Reyes-Becerril, M., Salinas, I., Cuesta, A., Meseguer, J., Tovar-Ramírez D., Ascencio-Valle, F., Esteban, M.A., 2008a. 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* L.). *Fish and Shellfish Immunology* 25, 731-739.

Ried, C., Wahl, C., Miethke, T., Wellnhofer, G., Landgraf, C., Schneider-Mergener, J., Hoess, A. 1996. High affinity endotoxin-binding and neutralizing peptides based on the crystal structure of recombinant *Limulus* anti-lipopolysaccharide factor. *J Biol Chem* 271: 28120–28127.

Robalino, J., Almeida, J.S., McKillen, D., Colglazier, J., Trent III, H.F., Chen, Y.A., Peck, M. E., Browdy, C.L., Chapman, R.W., Warr, G.W., Gross, P.S. 2007. Insights into

the immune transcriptome of the shrimp *Litopenaeus vannamei*: tissue-specific expression profiles and transcriptomic responses to immune challenge. *Physiol. Genomics* 29:44-56.

Rodríguez, J., LeMoullac, G., 2000. State of the art of immunological tools and health control of penaeid shrimp. *Aquaculture* 191: 109-119.

Rowley, A.F. & Powell, A. 2007. Invertebrate Immune Systems—Specific, Quasi-Specific or Nonspecific?. *The Journal of immunology*, 179: 7209-7214

Roos, D., van Bruggen, R., Meischl, C. 2003. Oxidative killing of microbes by neutrophils. *Microbes & Infection* 5: 1307-1315.

Roux, M. M., Pain, A., Klimpel, K. R., Dhar, A. K. 2002. The lipopolysaccharide and beta-1,3-glucan binding protein gene is upregulated in white spot virus-infected shrimp (*Penaeus stylirostris*). *J Virol* 76: 7140–7149.

Sahul-Hameed, A.S., Balasubramanian, G., Syed Musthaq, S. y Yoganandhan, K. 2003. Experimental infection of twenty species of Indian marine crabs with white spot syndrome virus (WSSV). *Diseases of Aquatic Organisms* 57: 157–161.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.

Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Nati. Acad. Sci. USA*. 74 (12): 5463-5467.

Sakai, M., 1999. Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture* 172: 63–92.

Sarathi, M., Ahmed, V.P. I., Venkatesan, C., Balasubramanian G.,Prabavathy, J., Hameed, A.S.S. Comparative study on immune response of *Fenneropenaeus indicus* to *Vibrio alginolyticus* and white spot syndrome virus. *Aquaculture* 2007: 27: 8-20.

Scandalios, J.G. 2005. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 38: 995-1014.

Scheel, J., von Brevern, M.C., Horlein, A., Fischer, A., Schneider, A., Bach, A. 2002. Yellow pages to the transcriptome. *Pharmacogenomics* 3:791-807.

Schmid, B.V., Keşmir, C., de Boer, R.J., 2008. The specificity and polymorphism of the MHC Class I prevents the global adaptation of HIV-1 to the monomorphic proteasome and TAP. *PLoS ONE* 3 (10), e3525 URL <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0003525>.

Sies, H., Sharov, V.S., Klotz, L.O. Briviba, K. 1997. Glutathione peroxidase protects against peroxynitrite-mediated oxidations. A new function for selenoproteins as peroxynitrite reductase. *J Biol Chem* 272: 27812-27817.

Sigfrid, L.A., Cunningham, J.M., Beeharry, N., Lortz, S., Tiedge, M., Lenzen, S., Carlsson, C., Green, I.C. 2003. Cytokines and nitric oxide inhibit the enzyme activity of catalase but not its protein or mRNA expression in insulin-producing cells. *Journal of Molecular Endocrinology*. 31: 509–518.

Sekine, H., Kenjo, A., Azumi, K., Ohi, G., Takahashi, M., Kasukawa, R., Ichikawa, N., Nakata, M., Mizuochi, T., Matsushita, M., Endo, Y., Fujita, T. 2001. An ancient lectin-dependent complement system in an ascidian: novel lectin isolated from the plasma of the solitary ascidian, *Halocynthia roretzi*. *J Immunol* 167: 4504–4510.

Simonsen, A., Lippe, R., Christoforidis, S., Gaullier, J. M., Brech, A., Callaghan, J., Toh, B. H., Murphy, C., Zerial, M. and Stenmark, H. 1998. EEA1 links PI (3) K function to Rab5 regulation of endosome fusion. *Nature* 394: 494-498.

Skulachev, P.C. 1999. Mitochondrial physiology and pathology; concepts of programmed death or organelles, cells and organisms. *Mol Asp Med* 20:139-184.

Smith, V.J., Söderhäll, K. 1983. β -1,3-Glucan activation of crustacean hemocytes in vitro and in vivo. *Biol. Bull.* 164: 299–314.

Söderhäll, K., Cerenius, L., 1992. Crustacean immunity. Annual Rev. of Fish Diseases, 3-23.

Soderhäll, I., Bangyeekhun, E., Mayo, S. and Soderhäll, K. 2003. Hemocyte production and saturation in an invertebrate animal; proliferation and gene expression in hematopoietic stem cells of *Pacifastacus leniusculus*. Dev. Comp. Immunol. 27: 661-672.

Soltanian, S., Dhont, J., Sorgeloos, P., Bossier, P. 2007. Influence of different yeast cell-wall mutants on performance and protection against pathogenic bacteria (*Vibrio campbellii*) in gnotobiotically-grown *Artemia*. Fish & Shellfish Immunology 23: 141-153.

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

Song, Y.L., & Huang, C.C. 2000. Application of immunostimulants to prevent shrimp disease. In: F. Fingerman and R. Nagabhushanam, Editors, *Recent advances in marine biotechnology*, Science Publication Inc, New Hampshire. 173–187.

Song, X.L., Huang J., Wang X.H., Yang B. 2007. Infection of white spot syndrome virus and defense reaction of penaeid shrimp. Journal of Fishery Sciences of China. 14(1):11033-1139.

Soonthornchai, W., Rungrassamee, W., Karoonuthaisiri, N., Jarayabhand, P., Klinbunga, S., Soderhall, K., Jiravanichpaisal, P., 2010. Expression of immune-related genes in the digestive organ of shrimp, *Penaeus monodon*, after an oral infection by *Vibrio harveyi* Dev. Comp. Immunol., 34: 19-28.

Sotelo-Mundo, R.R., Islas-Osuna, M.A., de-la-Re-Vega, E., Hernández-López, J., Vargas-Albores, F., Yepiz-Plascencia, G., 2003. cDNA cloning of the lysozyme of the white shrimp *Penaeus vannamei*. Fish Shellfish Immunol.15: 325–331.

Stafforini, D., Prescott, M.S., McIntyre, T. M. 1987. Human plasma platelet activating factor acetylhydrolase. Purification and properties. *Journal of Biological Chemistry*, 262: 4223–4230.

Stafforini, D.M., Carter, E.M., Zimmerman, G.A., McIntyre, T.M., Prescott, S.M. 1989. Lipoproteins alter the catalytic behavior of the platelet-activating factor acetylhydrolase in human plasma *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 86: 2393-2397.

Subasinghe, R.P., M.G. Bondad-Reantaso, and S.E. McGladdery. 2001. Aquaculture development, health and wealth. *In*: R.P. Subasinghe, P. Bueno, M.G. Phillips, C. Hough, S.E. McGladdery, and J.R. Arthur (Eds.) *Technical Proceeding of the Conference on Aquaculture in the Third Millennium*, Bangkok, Thailand, 20-25 February 2000. 167-191.

Sukumaran, V., Lowman, D.W., Sajeevan, T.P., Philip, R. 2010. Marine yeast glucans confer tu better protection than that of baker's yeast in *Penaeus monodon* against white spot syndrome virus infection. *Aquaculture Research*. 41: 1799-1805.

Sung, H.H., Yans, Y.L., Song, Y.L.J. 1996. Enhancement of microbicidal activity in the tiger shrimp *Penaeus monodon* via immunostimulations. *J Crustacean Biol* 16: 278 - 284.

Sritunyalucksana, K., Lee, S.Y., Söderhäll, K., 2002. A β -1,3-glucan binding protein from the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Dev. Comp. Immunol.* 26: 237–245.

Supamattaya K., Kiriratnikom, S., Boonyaratpalin, M., Borowitzka, L., 2005. Effecto of a *Dunaliella sp* extract on growth performance, health condition, immune response and disease resistance in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Aquaculture* 248: 207-216.

Supungul, P., Klinbunga, S., Pichyangkura, R., Hirono, I., Aoki, T., Tassanakajon, A. 2004. Antimicrobial peptides discovered in the black tiger shrimp *Penaeus monodon* using the EST approach. *Dis Aquat Org.* 61: 123–135.

Takahashi, Y., Knodo, K., Itami, T., Honda, T., Inagawa, H., Nishizawa, T. 2000. Enhancement of disease resistance against penaeid acute viraemia and induction of virus-inactivating activity in haemolymph of kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, by oral administration of *Pantoea agglomerans* lipopolysaccharide (LPS), Fish Shellfish Immunol 10: 555–558.

Tavares-Sánchez, O.L., Gómez-Anduro, G.A., Felipe-Ortega, X., Islas-Osuna, M.A., Sotelo-Mundo, R.R., Barillas-Muryc, C., Yepiz-Plascencia, G. 2004. Catalase from the white shrimp *Penaeus Litopenaeus vannamei*: molecular cloning and protein detection Comparative Biochemistry and Physiology, Part B: Biochemistry and Molecular Biology 138: 332-337.

Teshima, S.I., 1998. Nutrition of *Penaeus japonicus*. Rev. Fish. Sci. 6: 97– 111.

Timofeyev, M.A. 2006. Antioxidant enzyme activity in endemic Baikalean versus Palaeartic amphipods: Tagma- and size-related changes. Comparative Biochemistry and Physiology, Part B 143: 302–308.

Törrönen, R., Kolehmainen, M., Poutanen, K. 2005. Nutrigenomics – new approaches for nutrition, food and health research. Technical report of Food and Health Research Centre ETTK. 6-15.

Trujillo, E., Davis, C., Milner, J. 2006. Nutrigenomics, proteomics, metabolomics, and the practice of dietetics. J Am Diet Assoc 106: 403-413.

Vallejo, C.G., Seguido, A.M., Fernández-Renart, M. 1997. Protein Kinases in Mitochondria of the Invertebrate *Artemia franciscana*. Archives of Biochemistry and Biophysics. 1: 9-16.

van de Braak, C.B.T., Botterblom, M.H.A., Huisman, E.A., Rombout, J.H.W.M., van der Knaap, W.P.W. 2002. Preliminary study on haemocyte response to white spot syndrome virus infection in black tiger shrimp *Penaeus monodon*. Dis Aquat Org 51:149–155.

van Ommen, B., Stierum, R. 2002. Nutrigenomics: exploiting systems biology in the nutrition and health arena. *Curr Opin Biotechnol.* 13: 517-521.

van Hulten, M.C.W., Witteveldt, J., Peters, S., Kloosterboer, N., Tarchini, R., Fiers, M., Sandbrink, H., Klein Lankhorst, R., Vlak, J. M. 2001a. The white spot syndrome virus DNA genome sequence. *Virology* 285: 263-264.

Vázquez, L., Sierra, C., Juárez, S., Agundis, C., Zavala, A., Centeno, E. 1998. Mecanismos de inmunidad en crustáceos. *Interciencia*, 23 (6): 344-348.

Vázquez-Juárez, R., F. Vargas-Albores F. & J.L. Ochoa. 1993. A computer program to calculate superoxide dismutase activity in crude extracts. *J. Microbiol. Meth.* 17: 239–244.

Velázquez-Paniagua, M., Prieto-Gómez, B., Contreras-Pérez, R. 2004. El envejecimiento y los radicals libres. *Ciencias* 75: 38-39.

Verlhac, V., Kiron, V. 2004. Nutrition and immunomodulation in aquatic animals. *Aqua Feeds: Formulation & Beyond* 4: 5-9

Vlak, J. M., Bonami, J. R., Flegel, T. W., Kou, G. H., Lightner, D. V., Lo, C. F., Loh, P. C. & Walker, P. W. 2005. Family Nimaviridae. In *Virus Taxonomy: Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. 187–192.

Wang C., White, B.L., Redman, R.M., Lightner, D.V. 1999. Per os challenge of *Litopenaeus vannamei* postlarvae and *Farfantepenaeus duorarum* juveniles with six geographic isolates of white spot syndrome virus. *Aquaculture* 170: 179-194.

Wang R, Liang Z, Hal M, Soderhall K. 2001. A transglutaminase involved in the coagulation system of the freshwater crayfish, *Pacifastacus leniusculus*. Tissue localization and cDNA cloning. *Fish Shellfish Immunol*, 11:623–37.

Wang, F.I., Chen, J.C., 2006. Effect of salinity on the immune response of tiger shrimp *Penaeus monodon* and its susceptibility to *Photobacterium damsela* subsp. *Damsela*. *Fish & Shellfish Immunology*, 20: 671–681.

Wang, Y.C., Chang, P. S., Chen, H. Y. 2008. Differential time-series expression of immune-related genes of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* in response to dietary inclusion of beta-1,3-glucan. *Fish Shellfish Immunol.* 24(1): 113-21.

Wang S., Zhao, X.F., Wang, J.X. 2009b. Molecular cloning and characterization of the translationally controlled tumor protein from *Fenneropenaeus chinensis*. *Mol. Biol. Rep.* 36: 1683-1693.

Wu, H., Rossi, G., Brennwald, P. 2008. The ghost in the machine: small GTPases as spatial regulators of exocytosis. *Trends in Cell Biology* 18: 397-404.

Yang, F., J. He, X. Lin, Q. Li, D. Pan, X. Zhang, and X. Xu. 2001. Complete genome sequence of the shrimp white spot bacilliform virus. *J. Virol.* 75:11811-11820.

Yang, S.P., Wu, Z.H., Jian, J.C., Zhang, X.Z. 2010. Effect of marine red yeast *Rhodospiridium paludigenum* on growth and antioxidant competence of *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 309: 62-65

Yeaman, M.R., Yount, N.Y. 2003. Mechanisms of antimicrobial. peptide action and resistance. *Pharmacol Rev* 55: 27–55.

Yeh, M.S: Huang, C.J., Leu, J.H., Lee, Y.C. Inn-Ho Tsai, I.T. 1999. Molecular cloning and characterization of a hemolymph clottable protein from tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Eur. J. Biochem.* 266: 624-633.

Zhang, Z.F., Shao, M.Y. Kang, K.H. 2005. Changes of enzyme activity and hematopoiesis in Chinese prawn *Fenneropenaeus chinensis* (Osbeck) induced by white spot syndrome virus and zymosan A. *Aquaculture Research.* 36: 674-682.

Zhang, Q., Li, F., Zhang, J., Wang, B., Gao, H., Huang, B., Jiang, H., Xiang, J. 2007. Molecular cloning, expression of a peroxiredoxin gene in Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* and the antioxidant activity of its recombinant protein. *Molecular immunology.* 44: 3501-3509

Zhang, Q., Li, F., Zhang, X., Dong, B., Zhang, J., Xie, Y., Xiang, J. 2008. cDNA cloning characterization and expression analysis of the antioxidant enzyme gene catalase of chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. *Fish shellfish immunol* 24: 584-591.

Zhao, Z. Y., Yin, Z. X., Xu, X. P., Weng, S. P., Rao, X. Y., Dai, Z. X., Luo, Y. W., Yang, G., Li, Z. S. & other authors 2009. A novel C-type lectin from the shrimp *Litopenaeus vannamei* possesses anti-white spot syndrome virus activity. *J Virol* 83: 347–356.

Zekovic, D.B., & Kwiatkowski, S. 2005. Natural and modified (1→3)-beta-D-glucans in health promotion and disease alleviation. *Critical reviews in biotechnology* 25: 205-230.