



UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y
TECNOLÓGICAS

POSGRADO EN BIOCENCIAS

EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA PRODUCTIVA E
INMUNE DE *Litopenaeus vannamei* INFECTADO CON
WSSV, ALIMENTADO CON UNA DIETA ALTA EN
CAROTENOS PROVENIENTES DE *Dunaliella* sp.

TESIS

Para obtener el grado de:

MAESTRO EN BIOCENCIAS

Presenta:

DIANA MEDINA FÉLIX

Hermosillo, Sonora, México

15 de Noviembre del 2013

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

UNIVERSIDAD DE SONORA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y TECNOLÓGICAS
POSGRADO EN BIOCENCIAS

**EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA PRODUCTIVA E
INMUNE DE *Litopenaeus vannamei* INFECTADO CON WSSV,
ALIMENTADO CON UNA DIETA ALTA EN CAROTENOS
PROVENIENTES DE *Dunaliella* sp.**

TESIS

**Para obtener el grado de:
MAESTRO EN BIOCENCIAS**

Presenta

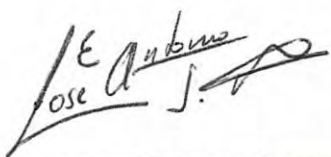
DIANA MEDINA FÉLIX

Hermosillo, Sonora, México.

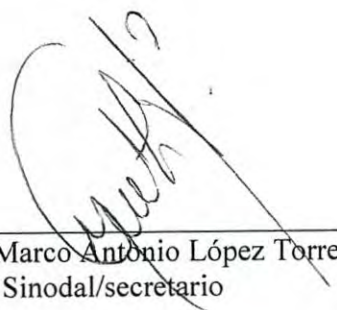
15 de Noviembre del 2013

APROBACIÓN

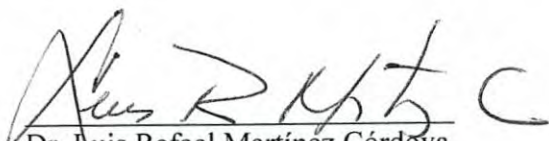
Los miembros del Comité designado para revisar la tesis titulada **EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA PRODUCTIVA E INMUNE DE *Litopenaeus vannamei* INFECTADO CON WSSV, ALIMENTADO CON UNA DIETA ALTA EN CAROTENOS PROVENIENTES DE *Dunaliella* sp.** presentada por **Diana Medina Félix**, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Biociencias.



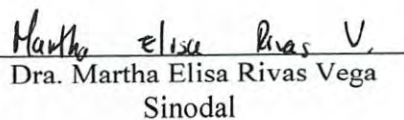
Dr. José Antonio López Elías
Presidente



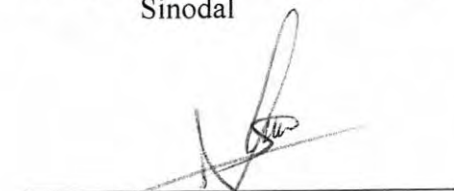
Dr. Marco Antonio López Torres
Sinodal/secretario



Dr. Luis Rafael Martínez Córdova
Sinodal



Dra. Martha Elisa Rivas Vega
Sinodal



Dr. Jorge Hernández López
Sinodal

DEDICATORIA

A mi hijo Diego, porque tú eres todo mi motivo.

AGRADECIMIENTOS

A mi muy querida **Universidad de Sonora** por permitirme ser Bióloga y darme la oportunidad de seguir preparándome como Maestra en Ciencias.

Al Centro de investigaciones biológicas del noroeste (**CIBNOR**) por el recibimiento tan cálido así como facilitarme el material y equipo necesario para realizar este trabajo.

A la Universidad Estatal de Sonora (**UES**) campus Navojoa por permitirme hacer uso de las instalaciones en la elaboración de parte fundamental de este experimental.

Un agradecimiento muy especial a mi director de tesis **Dr. Antonio López Elías**, por todo el apoyo dentro y fuera del laboratorio, por acompañarme desde mi licenciatura, estoy eternamente agradecida.

A los maestros **Álvaro Murguía López** y **Lauro Mercado Castillo**, por su valiosa colaboración en este trabajo de tesis.

A **M. en C. José Fernando Mendoza Cano** y **Biol. Diego Alberto Galván Álvarez** por compartir sus conocimientos y por su paciencia y ayuda en este trabajo.

A mis compañeros del Laboratorio de Acuicultura: **Angélica, Perla, Diana, Ana Lucia, David** y **Enrique**, por los gratos momentos juntos.

A mis amigas biólogas, especialmente a **Ana Gabriela, Karina, Gissel, Soitza, Mily** y **Damaris** por estar siempre, las quiero.

A mi **papá**, por llevarme al camino de la ciencia y darme las herramientas necesarias para no desistir y llegar a mí meta. Así también a mi **mamá** y **hermano** porque sin pedirlo, siempre están, gracias por el gran apoyo que me han dado.

A mi **Chávez**, por ser mi compañero de vida, por tenerme paciencia y apoyarme como siempre en cada nuevo proyecto, porque sé que siempre estarás para mí.

Sin todos ustedes nada de esto sería posible.

ÍNDICE GENERAL

	Página
APROBACIÓN	i
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTO	iii
ÍNDICE GENERAL	v
RESUMEN	vii
ABSTRACT	viii
ÍNDICE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE TABLAS	x
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
II.1 Virus de Mancha Blanca (WSSV)	4
II.2 Metabolismo plasmático en camarones peneidos	5
II.3 Sistema inmune en camarones peneidos	6
II.4 Inmunoestimulación en camarones peneidos	7
II.5 Antioxidantes	8
II.6 Carotenos en acuicultura	9
II.7 <i>Dunaliella</i> sp	10
JUSTIFICACIÓN	12
HIPÓTESIS	12
III. OBJETIVO	13
III.1 Objetivos específicos	13
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	14
IV.1 Cultivo y floculación de <i>Dunaliella</i> sp.	14
IV.2 Secado de las microalgas	14
IV.3 Cuantificación de β -carotenos en <i>Dunaliella</i> sp.	14

IV.4	Formulación y elaboración del alimento	15
IV.5	Selección de organismos libres de WSSV	17
IV.6	Infección de <i>Litopenaeus vannamei</i> con WSSV	18
IV.7	Análisis bioquímicos de metabolitos plasmáticos	19
IV.8	Determinación de actividad del sistema inmune	20
IV.9	Análisis estadístico	21
V.	RESULTADOS Y DISCUSIONES	22
V.1	Producción de <i>Dunaliella</i> sp. y concentración de β -carotenos	22
V.2	Identificación y detección del virus por PCR en tiempo real	23
V.3	Mortalidad de <i>Litopenaeus vannamei</i>	24
V.4	Análisis bioquímicos de metabolitos plasmáticos	25
V.4.1	Glucosa	25
V.4.2	Lactato	26
V.4.3	Proteína	26
V.4.4	Colesterol	27
V.4.5	Triglicéridos	28
V.5	Determinación de actividad del sistema inmune	32
V.5.1	Actividad específica de Lisozimas	32
V.5.2	Aglutinación de hemocitos de camarón	32
V.5.3	Actividad de proteasas tipo tripsina	33
V.5.4	Actividad específica de α -2-Macroglobulinas (A2M)	33
V.5.5	Actividad específica de Fenoloxidasa (FO)	34
V.5.6	Actividad específica de Profenoloxidasa (PFO)	35
VI.	CONCLUSIONES	39
VII.	RECOMENDACIONES	40
VIII	LITERATURA CITADA	41

RESUMEN

El virus del síndrome de la mancha blanca, también conocido como WSSV (por sus siglas en inglés) ha ocasionado un gran impacto en los cultivos de *Litopenaeus vannamei*, en donde provoca mortalidades del 80 al 100%, siendo impráctico el uso de vacunas, debido a que *L. vannamei* posee un sistema inmune innato, sin capacidad de memoria. Se ha observado que en algunos organismos cultivados se usan carotenoides en las dietas, los cuales actúan como antioxidantes, incrementando la resistencia a enfermedades, mejorando su tasa de reproducción y aumentando la ganancia de peso. El β -caroteno, es producido en altas cantidades por la microalga *Dunaliella* sp. bajo una situación de estrés, disminuye la oxidación celular y mantiene en buen funcionamiento el sistema inmune. Es por eso que se evaluó la sobrevivencia, así como la condición fisiológica, a través de la medición de metabolitos plasmáticos y la respuesta del sistema inmune de *L. vannamei* infectado con WSSV y alimentado durante 30 días con dietas adicionadas con harina de *Dunaliella* sp., rica en β -carotenos, en un ambiente con temperatura controlada de 28-29°C y una salinidad de 35ppm. Se obtuvo más del 80% de sobrevivencia en los tratamientos alimentados con el 1 y 2% de biomasa de *Dunaliella* sp. en comparación con 56% obtenida en el control infectado. Se observaron diferencias entre tratamientos y a través del tiempo en la concentración de algunos metabolitos plasmáticos, aunque sin un patrón bien definido, tampoco se observó una clara tendencia en la respuesta del sistema inmune.

ABSTRACT

The white spot syndrome virus (WSSV) has had great impact on *Litopenaeus vannamei* crops, causing mortalities of 80 to 100 %. *L. vannamei* cannot be vaccinated because its innate immune system has no memory capacity. Carotenoids have been observed to be used in some cultured organisms diets, which act as antioxidants increasing resistance to diseases, improving their reproduction rate and increasing their weight gain. β -carotene is produced in high amounts by the microalgae *Dunaliella* sp. in stress conditions, reducing cellular oxidation and keeping the immune system functioning. For these reasons the shrimp's survival and physiological condition were evaluated by measuring plasma metabolites and the immune system response of *L. vannamei* infected with WSSV. Shrimp were fed 30 days with 1 and 2% of *Dunaliella* sp. high in β -carotene, in a controlled environment at 28-29 °C and a salinity of 35ppm. With the diets containing 1 and 2% of *Dunaliella* sp a survival of over 80% was obtained, while the infected control had a survival of 56%. Differences were observed between treatments over time in the concentration of plasmatic metabolites, without a well-defined pattern and no tendency in the immune response.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Representación morfológica del virus de mancha blanca (Sánchez-Paz, 2010).	5
2	Morfología de <i>Dunaliella</i> sp.	11
3	Diseño experimental; cuatro tratamientos por triplicado, acuarios con 20 L. de agua y 20 organismos por acuario.	17
4	Análisis de las curvas de disociación (Melting) de los productos amplificados por PCR en tiempo real A) tiempo cero, B) 72 horas post infección (hpi) y C) 144 hpi, donde la línea gruesa roja es el control positivo con WSSV y la línea gruesa negra es el control negativo.	23
5	Variación temporal de los diferentes metabolitos en los tratamientos 1, 2 y control positivo y negativo. .	31
6	Comportamiento del sistema inmune por día y por tratamiento.	38

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		Página
1	Ingredientes necesarios para preparar el alimento utilizado en los experimentales (gr/kg de alimento).	16
2	Composición proximal de la dieta basal.	16
3	Longitud de onda y coloración de la reacción colorimétrica para evaluar la concentración de cada metabolito.	19
4	Porcentaje sobrevivencia de <i>Litopenaeus vannamei</i> a las 144 horas post infección con WSSV.	24
5	Concentración promedio (mg/mL) y desviación estándar de metabolitos en hemolinfa de <i>Litopenaeus vannamei</i> por tratamiento.	29
6	Concentración promedio (mg/mL) y desviación estándar de metabolitos en hemolinfa de <i>Litopenaeus vannamei</i> por día.	29
7	Actividad específica y desviación estándar de componentes del Sistema inmune en <i>Litopenaeus vannamei</i> por tratamiento (datos normalizados con proteína).	36
8	Actividad específica y desviación estándar de componentes del Sistema inmune en <i>Litopenaeus vannamei</i> por día (datos normalizados con proteína).	36

I. INTRODUCCIÓN

La acuicultura se está desarrollando, expandiendo e intensificando en la mayoría de las regiones del mundo, con un crecimiento anual del 8.8% en los últimos 50 años. La producción acuícola mundial alcanzó un nivel máximo en el 2012 con 50 millones de toneladas (FAO, 2012). La camaronicultura es una actividad altamente rentable, con una producción total de más de 5 millones de toneladas. Sin embargo, en los últimos años se han presentado pérdidas económicas debido a agentes patógenos que infectan los cultivos. Tan solo en Sonora se presentaron pérdidas económicas importantes del 2010 al 2013 con la presencia del Virus de la mancha blanca y el síndrome de la muerte temprana (EMS por sus siglas en inglés). Según la COSAES (2013) se perdió el 50% de la producción total de camarón en Sonora y para el 2013 se calcula una producción de solo 12,000 toneladas, es decir 80% menor a la obtenida en 2009 (Industria Acuícola, 2013).

El virus de la mancha blanca conocido también como WSSV (por sus siglas en inglés), fue reportado por primera vez en México en 1999, infectando a camarones sobre todo en cultivo, los cuales pueden presentar algunos signos como manchas blancas en la cutícula, coloración rojiza en urópodos, telson, pereiópodos y pleópodos, así como actividad reducida, desorientación, nado errático y falta de apetito.

La falta de una terapia efectiva o una adecuada profilaxis, ha agravado la situación haciendo necesario el uso de agentes antivirales (Rodríguez *et al.*, 2000; Sudheer *et al.*, 2012), sin embargo, los camarones peneidos poseen un sistema inmunológico innato sin capacidad de memoria, lo que impide la utilización de vacunas y antibióticos, incrementando el interés en la inmunoestimulación como estrategia profiláctica para prevenir infecciones. En la respuesta inmunológica de los camarones peneidos se distinguen los efectores celulares y humorales, que actúan en conjunto para eliminar los agentes indeseables (Berger, 2000). Muchos mecanismos de defensa celulares en los crustáceos dependen de la producción controlada de radicales libres durante la fagocitosis y encapsulación (Campa-Córdova *et al.*, 2010), debido a

esto es necesario buscar otros métodos de estimular el sistema inmunológico de los camarones, para que de esta manera, puedan sobrevivir o sobrellevar el virus. La inmunoestimulación se proyecta como una alternativa de prevención a los agentes virales, ya que existen evidencias que señalan un efecto protector de los β -glucanos y péptidoglicanos contra WSSV (Rendón *et al.*, 2003 y Balcázar, 2003). El uso de antioxidantes como estimulantes a la respuesta del sistema inmune, hace que los organismos sean más resistentes en ambientes desfavorables, además, favorecen el proceso de reproducción, crecimiento y foto-protección (Ponce-Palafox *et al.*, 2006). En la actualidad se han caracterizado alrededor de 600 carotenoides entre ellos el de mayor importancia es el β -caroteno, por su alta actividad antioxidante (Rao *et al.*, 2006). Hoy en día se reconoce a la microalga *Dunaliella* como la mayor fuente natural de β -caroteno entre otras algas, plantas y microorganismos. Uno de los métodos utilizados para inducir la acumulación masiva de carotenoides en microalgas es la reducción del crecimiento por la privación de nutrientes como nitrógeno (Fimbres-Olivarría, 2011) e iluminación (Lerche, 1937). Con estas bases, se busca evaluar la repuesta productiva, fisiológica e inmune de camarones infectados con el virus de la mancha blanca, y alimentados con dietas enriquecidas con biomasa de *Dunaliella* sp. rica en carotenoides

II. ANTECEDENTES

Enfermedades del camarón

Desde que se intensificaron los cultivos de camarón las enfermedades empezaron a aparecer dejando pérdidas económicas importantes (Gullian *et al.*, 2004). La primera epidemia en camarón fue causada por el virus *Monodon baculovirus* (MBV) que afectó los cultivos de Taiwán en 1980, esto fue seguido por el virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa (IHHNV) en América, el Virus de la cabeza amarilla (YHV) en Tailandia y el síndrome de Taura (TSV) en América (Flegel *et al.*, 2008).

El brote de las enfermedades en la camaronicultura es uno de los mayores retos para el desarrollo y la sustentabilidad (MaBadhul *et al.*, 2012), sin embargo se han logrado algunos avances; en el año 2008, se reportaron 20 enfermedades virales como patógenas para especies de camarón silvestre o de cultivo y actualmente son consideradas como enfermedades de declaración obligatoria: el Síndrome de Taura (TS), la enfermedad de la mancha blanca (WSSV), la enfermedad de la cabeza amarilla (YH), la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa (IHHN), la mionecrosis infecciosa (IMN) y la Hepatopancreatitis necrotizante (NHP) (Morales-Covarrubias, 2011).

En México, la presencia de enfermedades en los cultivos de camarón blanco se han registrado desde principios de los 90's, en el noroeste del país, con el virus de Taura (TSV), así como enfermedades bacterianas de tipo *Vibrio* sp. (Anaya-Rosas *et al.*, 2012). La producción se recuperó y fue hasta el año 2000 que se presentaron pérdidas en los cultivos por la presencia del virus de la mancha blanca, que provocó mortalidades del 80 al 100%.

II.1 Virus de Mancha Blanca (WSSV)

El virus de mancha blanca es el virus de mayor virulencia reportado en la industria camaronícola (Jiang, 2011; Liu *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2005). Este virus de alta patogenicidad

apareció por primera vez en Taiwán en 1992, siguiéndole después otras granjas de Asia y posteriormente América del Sur. En el año 1993 en China el WSSV ocasionó el mayor problema presentado en la camaronicultura con la pérdida del 70% de la producción total, desde entonces este virus ha sido de gran preocupación para el mundo. El WSSV es patógeno para al menos 93 especies, en su mayoría crustáceos decápodos (Andrade, 2011; Jiang, 2011; MaBadhul *et al.*, 2012). Una de las razones por las cuales este virus es tan difícil de controlar y tratar es porque tiene diferentes vías de transmisión incluyendo transmisión horizontal y vertical (Liu *et al.*, 2007).

Por el momento WSSV se convirtió en la única especie perteneciente a la familia *Nimaviridae*, género *Whispovirus*, el genoma de WSSV está compuesto por una sola molécula circular de ácido desoxiribonucleico (ADN) de doble hebra, tiene una forma ovoide bacilar con apéndice filamentosos de localización apical en un extremo parecido a un largo flagelo, un tamaño de entre 210-240 nanómetros (nm) de largo y 70-167 nm de diámetro, estructuralmente está conformado por una envoltura de forma bacilar de 275 por 120 nm, dicha envoltura a su vez, está compuesta por dos proteínas mayores (VP28, VP19) y un número indeterminado de polipéptidos menores (Figura 2) (Liu *et al.*, 2009; Sánchez-Paz, 2010; Valencia-Yáñez, 2010). Tiene una replicación rápida ya que de las 24 a las 35 horas el virus se multiplica 140 veces en los tejidos, en donde, a nivel histológico se han detectado lesiones desde las 36 horas postinfección en organismos infectados por ingesta forzada (Maldonado *et al.*, 2004).

El mecanismo de entrada de WSSV, así como su propagación en las células del cuerpo del crustáceo es aún desconocido, sin embargo, se cree que las proteínas de la superficie estructural del virus, juegan un papel muy importante para la infección, especialmente la VP28, como reconocimiento y unión a los receptores de las células superficiales del huésped (Wu *et al.*, 2005; Yi *et al.*, 2004).

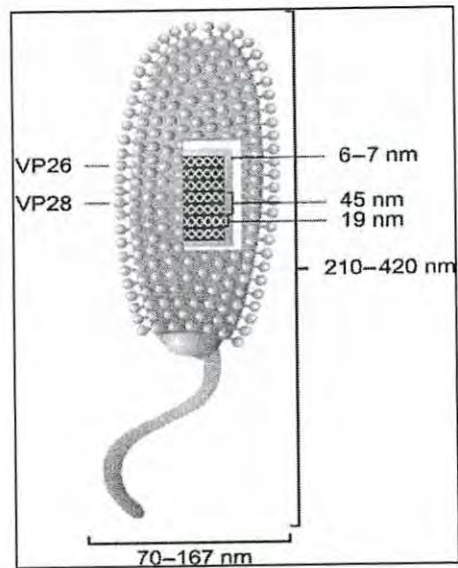


Figura 1.- Representación morfológica del virus de mancha blanca (Sánchez-Paz, 2010).

II.2 Metabolismo plasmático en camarones peneidos

Los metabolitos plasmáticos han sido utilizados como indicadores de las condiciones fisiológicas y nutricionales en camarones (Pascual *et al.*, 2003). En los camarones peneidos el transporte de los metabolitos plasmáticos se da por la hemolinfa, por medio de una circulación abierta que irriga los órganos y tejidos del organismo (Rendón y Balcázar, 2003) y se le llama hemocele a los sitios donde circula. Algunos estudios han demostrado que algunos metabolitos plasmáticos como lo son: glucosa, triglicéridos, colesterol, lactato y proteína, así como la profenoloxidasa son buenos indicadores de salud inmunológica y nutricional de los organismos (Pascual *et al.*, 2004).

Actualmente se sabe que en las primeras etapas de las infecciones virales, en donde el genoma del virus se está replicando, los productos virales modelan la homeostasis metabólica, lo que afecta al sistema de la glucólisis, el ciclo de la pentosa-fosfato y el metabolismo de los ácidos grasos, todo esto para favorecer los requerimientos energéticos del virus (Chen *et al.*, 2011), lo que modifica los metabolitos plasmáticos del camarón.

El estado fisiológico de los crustáceos varía dependiendo del medio de cultivo y otros factores, entre los cuales, el alimento es uno de los principales, ya que aporta a través de las proteínas, lípidos y carbohidratos, las moléculas base que son utilizadas como fuente de energía y de moléculas estructurales (Pascual *et al.*, 2007).

Diversos estudios en el metabolismo de crustáceos han mostrado una gran variabilidad en el contenidos de los diferentes metabolitos, lo que hace difícil establecer un perfil estándar (Sánchez-Paz *et al.*, 2007).

Diversos tipos de estrés en el cultivo pueden afectar las reservas nutricionales en el camarón, provocando una disminución de proteína, triglicéridos y colesterol. Ya que en una situación de estrés el camarón usa a los carbohidratos como fuente de energía, en un estrés continuo, la concentración de lactato aumenta, siendo mayor su producción que su oxidación y se empieza acumular en musculo, esto nos indica que el metabolismo anaeróbico es mayor que el aeróbico y para evitar el daño causado por la acumulación de lactato en el musculo, el lactato se almacena en hemolinfa. Por otro lado los triglicéridos son una reserva importante de lípidos con funciones energéticas y reproductivas, ya que participa en la síntesis de esperma. Una reducción en el nivel de triglicéridos podría significar una reducción en la reserva de lípidos y para compensarlo se sintetizan triglicéridos a partir de musculo, afectando el metabolismo de la proteína (Sánchez *et al.*, 2001).

II.3 Sistema inmune en camarones peneidos

Está ampliamente documentado que los crustáceos no poseen un sistema inmunitario específico ni con capacidad de memoria (Berger, 2000; Vargas-Albores *et al.*, 1998), lo que impide la utilización de vacunas. Sin embargo, de la misma forma que los vertebrados, en el sistema inmune de los crustáceos se distinguen dos tipos de respuesta: celular y humoral, que actúan en conjunto para eliminar a los agentes extraños (Rendón y Balcázar, 2003).

El sistema inmune innato de los camarones peneidos, los protege de microorganismos dañinos (Li y Xiang, 2013), este sistema inmune sin memoria esta mediado por los hemocitos que poseen capacidad citotóxica y comunicación intercelular que al mismo tiempo les facilita las funciones de reconocimiento, coagulación, fagocitosis, melanización, formación de nódulos y encapsulación, así mismo, los camarones cuenta también con la presencia de varios componentes plasmáticos, un sistema profenoloxidasa y la cascada de coagulación que favorece la destrucción de los patógenos (Campa-Córdova *et al.*, 2010; Fagutao *et al.*, 2011; Vargas-Albores *et al.*, 1998; Yeh *et al.*, 2009). Los estudios en el sistema inmune del camarón

y otros crustáceos se han enfocado en aspectos generales del sistema inmunitario y como consecuencia se conoce muy poco a cerca de su respuesta antiviral (MaBadhul *et al.*, 2012).

Se ha logrado obtener buenos resultados de inmunoestimulación en los organismos mejorando su salud y supervivencia bajo condiciones de laboratorio y engorda en cultivos al exterior (Aguayo, 2009). La ventaja de los inmunoestimulantes, radica en que no ocasionan una demanda de energía, por lo que no retardan el crecimiento y pueden usarse en forma continua, facilitando su dosificación en las dietas no generan resistencias ni habituación (Berger, 2000).

Hasta la fecha, se han reportado diferentes tipos de inmunoestimulantes, por ejemplo: MaBadhul, *et al.*, (2012) utilizaron un extracto etanólico de la planta *Pongamia pinnata*, incorporado a la dieta de *Penaeus monodon*, que alimentaron por 4 días antes y 15 días después de la infección con WSSV y obtuvieron una sobrevivencia del 40 al 80% en las dietas con altas concentraciones del extracto. También se han utilizado inmunoestimulantes comerciales como el Aquastim MBL que contiene productos de bacterias, glucanos e hierbas antivirales que aseguran estimular el sistema inmune en camarón aumentando la sobrevivencia hasta un 20% en los cultivos.

II.4 Inmunoestimulación en camarones peneidos

Actualmente el interés en la prevención de enfermedades por inmunoestimulación ha aumentado sobre todo para hacer frente a los problemas virales, estas sustancias inmunoestimulantes alertan al sistema inmune innato de los organismos provocando una respuesta (Rendón y Balcázar, 2003). Diferentes microorganismos y/o sus derivados como lipopolisacáridos, péptidoglicanos y β -glucanos, han sido empleados como activadores del sistema inmune de los camarones incrementando algunas funciones como: fagocitosis, melanización, encapsulación y coagulación (Campa-Córdova *et al.*, 2010; Vargas-Albores y Yepiz-Plascencia, 2000). Los β -glucanos son polisacáridos de monómeros de D-glucosa ligados con enlaces glucosídicos, actualmente los β -glucanos han sido muy estudiados por que inducen la desgranulación y la activación de la profenoloxidasa (Roux *et al.*, 2002; Vargas-Albores y Yepiz-Plascencia, 2000).

Otros estudios que se han realizado para estimular el sistema inmune de los camarones, incluyen trabajos de Cheng-Fang *et al.*, (2000), quienes evaluaron la eficiencia de β -1-3-glucano derivado del hongo *Schizophyllum commune* en la sobrevivencia de *Penaeus monodon*, en diferentes tipos de cultivo y reportan diferencias significativas en los tratamientos donde se administró este inmunoestimulante, elevando la actividad fagocítica, aglutinación de células y la producción del anión superóxido.

También se han estudiado levaduras como la *Debaryomyces hansenii* que se aplicó en diferentes dosis a *L. vannamei*, encontrándose que esta levadura incrementa la respuesta antioxidante y el conteo total de hemocitos (Pacheco *et al.*, 2012). Así mismo se han probado diversos tipos de bacterias, como la cepa *Bacillus* P64, que estimuló el sistema inmune de los camarones, logrando diferencias significativas en el índice inmunitario general con respecto al control (Gullian y Rodriguez, 2001).

II.5 Antioxidantes

Una célula en condiciones normales mantiene un balance fisiológico, sin embargo, cuando es sometida a algún tipo de estrés este balance se rompe, provocando la formación excesiva de radicales libres que oxidan a las células y en concentraciones elevadas son nocivas para los organismos; para evitar esto y continuar con su crecimiento, las células producen altas concentraciones de carotenos que a su vez funcionan como antioxidantes, estabilizando y disminuyendo el exceso de radicales libres (Pisal y Lele, 2005). En crustáceos, los carotenoides actúan como antioxidantes y precursores de la vitamina A, además, incrementan la resistencia a enfermedades, mejoran su tasa de reproducción y aumenta la ganancia de peso. También se ha visto que la inclusión de fuentes adicionales de pigmentos influyen positivamente en el crecimiento y sobrevivencia en diferentes etapas del ciclo de vida de algunas especies de camarones peneidos (Tapia-Salazar *et al.*, 2008).

Los carotenoides son pigmentos biológicos con propiedades antioxidantes y son cada vez más demandados por diversas industrias. Estos compuestos eliminan radicales libres producto de la oxidación celular y son un grupo muy amplio, con más de 600 estructuras químicas diferentes, algunas de las cuales actúan como precursores de vitaminas y tienen un

amplio rango de funciones y acciones. Dentro del grupo de carotenoides, los β -carotenos son los más importantes, ya que se usan como colorantes, antioxidantes y como precursores de la vitamina A, absorción de la energía a través de la luz y transporte de oxígeno (Del Campo *et al.*, 2007; Shariati y Reza, 2011; Pisal y Lele, 2005).

El β -caroteno es uno de los carotenoides mayormente acumulado por *Dunaliella salina* y *Dunaliella bardawil* este caroteno se encuentra dentro de los cloroplastos y es el pigmento responsable de la coloración en *Dunaliella* sp. (Oren, 2005).

Uno de los métodos utilizados para inducir la acumulación masiva de carotenoides en células microalgales, es la reducción del crecimiento por la privación de nutrientes como nitrógeno (Fimbres-Olivarría, 2011), así como la reducción de la iluminación (Lerche, 1937). Trabajos realizados previamente han mostrado que *Dunaliella* sp. produce altas concentraciones de carotenoides cuando es cultivada con deficiencia de nitrógeno (Fimbres-Olivarría, 2011) se sugiere que esta es una estrategia utilizada por las microalgas, con el fin de protegerse y continuar con su crecimiento (Pisal y Lele, 2005).

Dunaliella concentra en su interior altas cantidades de caroteno, esto lo hace en forma de glóbulos oleosos en los cloroplastos, en donde puede llegar a almacenar más del 10% del peso seco de la alga, que es la mayor concentración contenida en cualquier alga, planta o microorganismo conocidos (Shariati y Reza, 2011; Del Campo *et al.*, 2007).

II.6 Carotenos en acuicultura

La suplementación de pigmentos en alimento para camarón, producen efectos positivos como ganancia de peso, sobrevivencia, resistencia a enfermedades y da un valor agregado al producto (Tapia-Salazar *et al.*, 2008), el uso de estos pigmentos específicamente los carotenoides como aditivos en la acuicultura, están siendo estudiados y aparentemente su principal función es actuar como antioxidante y promotor de la producción de vitamina "A" (Ponce-Palafox *et al.*, 2006), por lo tanto la adición de carotenoides en la dieta, mejora los parámetros de producción y la pigmentación del camarón blanco y del camarón azul, tanto en postlarvas como prejuveniles, juveniles y preadultos (Martínez-Córdova *et al.*, 2002).

Los carotenoides, la vitamina E y la vitamina C juegan un papel importante en la salud animal como antioxidantes mediante la inactivación de radicales libres dañinos producidos a

través de la actividad celular normal y de diversos factores de estrés, ya sean infecciones virales o bacterianas. Se ha sugerido que la función antioxidante de estos micronutrientes podría mejorar la inmunidad mediante la preservación de la integridad funcional y estructural de las células inmunitarias importantes (Chew, 1995; Merchie *et al.*, 1998).

Diferentes estudios sobre la suplementación de pigmento a la dieta de camarón revelan una mejora en el crecimiento, reducción en la tasa de mortalidad y mejor rendimiento de los organismos, sugiriendo que un suministro de carotenoides es esencial para el bienestar del cultivo. Arredondo-Figueroa *et al.*, (2003), cultivaron *L. vannamei* con dietas ricas en carotenoides provenientes del Chile, mejorando la pigmentación de los organismos. Así mismo se estudió el uso de pigmentos provenientes de la flor de cempasúchil *Tagetes erecta*, los cuales producen el mismo efecto que otras fuentes de pigmentos, por lo que se consideran una fuente alternativa de pigmentos para camarón (Tapia-Salazar *et al.*, 2008). Flores *et al.*, (2007) suplementaron axantinas en una cantidad de 80 mg/kg de alimento a la dieta de *L. vannamei* con lo que se mejoró su crecimiento, frecuencia de muda y capacidad osmorregulatoria.

II.7 *Dunaliella* sp.

Dunaliella pertenece a la división de las Chlorophytas, es un alga verde unicelular, biflagelada y desnuda, que miden entre 9 y 11 micras de largo y 6 micras de diámetro (Figura 2) (Fimbres-Olivarría, 2011; Olmos *et al.*, 2000). *Dunaliella* sp. es muy conocida por su crecimiento en ambientes hipersalinos, es un modelo muy utilizado para estudios de osmorregulación y adaptación a salinidades, pero adicionalmente se ha encontrado que estas microalgas presentan considerables concentraciones de β -carotenos (Shariati y Reza, 2011; Oren, 2005).

Dunaliella sp. es una de las 30 000 especies de microalgas que se han cultivado comercialmente en países como Australia, India e Israel, debido a su gran valor en el mercado. Como es bien sabido esta especie acumula cantidades masivas de β -carotenos y presenta otras ventajas, como fácil digestión por carecer de pared celular, su cultivo en el laboratorio es eficiente y es de rápido crecimiento, además de presentar resistencia a condiciones ambientales adversas (Borowitzka y Silva, 2007; Pisal y Lele, 2005), lo que nos permite estresarla a ciertos límites para la obtención de bioproductos. Recientemente, *Dunaliella* sp. ha

sido objeto de estudios mutagénicos y manipulaciones genéticas para incrementar la calidad de carotenoides (Jin y Melis, 2003).

Las microalgas del género *Dunaliella* son las más cultivadas masivamente, ya que son utilizadas como fuente de alimento en acuicultura y para la obtención de diversos subproductos, como vitaminas, proteínas, pigmentos, entre otros. Se sabe que, *Dunaliella salina* es la microalga más rica en β -carotenos y glicerol. (Olmos *et al.*, 2000).

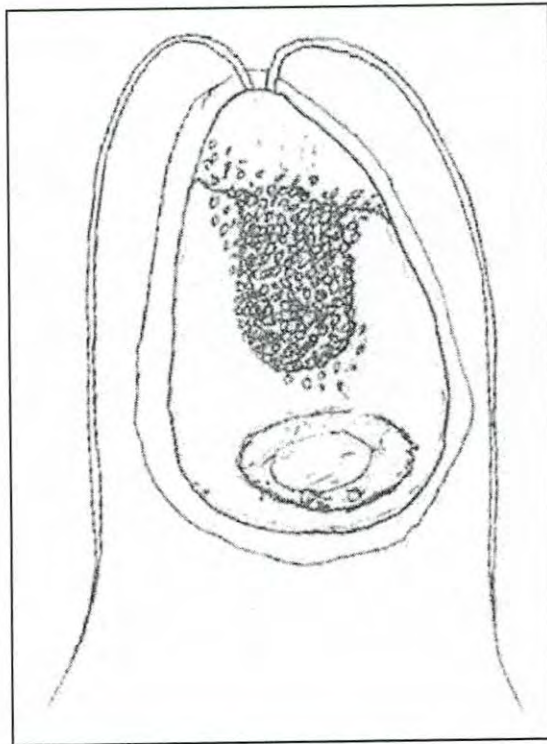


Fig. 2.- Morfología de *Dunaliella* sp.

JUSTIFICACIÓN

Con las altas mortalidades y pérdidas económicas causadas por el virus de mancha blanca, es necesario mejorar las buenas prácticas de cultivo, buscando alternativas con el fin de evitar que los organismos enfermen y mueran por esta infección. Ya que *L. vannamei* no posee un sistema inmune con capacidad de memoria y el uso de vacunas no es viable, es necesario el estudio y evaluación de compuestos naturales bioactivos, para mejorar la sobrevivencia de los organismos en cultivo.

Algunos compuestos bioactivos producidos a partir de microalgas, como lo son proteínas, lípidos, vitaminas y pigmentos, pueden ser empleados como suplementos en dietas balanceadas para el cultivo de camarón. *Dunaliella* sp. ha mostrado ser una valiosa candidata como productora de β -carotenos, ya que al ser cultivada en un medio de cultivo con deficiencia de uno o varios nutrientes, produce altas concentraciones de este antioxidante, que elimina radicales libres presentes en el organismo y manteniéndolo en óptimas condiciones para sobrevivir al virus.

HIPÓTESIS

La adición de antioxidantes, provenientes de *Dunaliella* sp. rica en carotenos, a una dieta balanceada disminuirá el impacto de WSSV en cultivos de *Litopenaeus vannamei*.

III. OBJETIVO

Evaluar la respuesta productiva, fisiológica e inmune de *L. vannamei* infectado con WSSV y alimentado con una dieta enriquecida con biomasa de la microalga *Dunaliella* sp. con alta concentración de β -carotenos.

III.1 Objetivos específicos

- Obtener biomasa rica en carotenoides de cultivos de *Dunaliella* sp. crecidos en medio limitado de nitrógeno.
- Formular dos dietas experimentales para camarón incluyendo en una dieta basal *Dunaliella* sp. deshidratada a concentraciones de 1 y 2%.
- Estimar biomasa y sobrevivencia de *L. vannamei* infectado con Mancha blanca, alimentado con una dieta rica en carotenos provenientes de *Dunaliella* sp.
- Análisis bioquímicos de metabolitos plasmáticos (glucosa, lactato, proteína, colesterol y triglicéridos) en hemolinfa de *L. vannamei* alimentados con dietas enriquecidas de carotenoides.
- Determinación de la actividad inmunológica (α -2-Macroglobulina, proteasas tipo tripsina, lisozimas, aglutinación de hemolinfa y profenoloxidasa) en *L. vannamei* alimentados con dietas enriquecidas con carotenoides.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

IV.1 Cultivo y floculación de *Dunaliella* sp.

Dunaliella sp, se obtuvo del cepario del Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora (DICTUS) en donde se cultivó en el medio f/8, que contiene una cuarta parte de la cantidad de nitrógeno utilizada para el medio f/2 de Guillard y Ryther (1962). Para ello se utilizó un sistema de cultivo estático escalonado, iniciando en tubos de 250 mL para posteriormente pasar a matraces de 1 L y finalmente en garrafones de 20 L. Una vez que alcanzaron su crecimiento máximo se flocularon con sulfato de aluminio a una concentración de 0.15g/L. El exceso de agua se retiró por sifoneo y el concentrado de microalga se colocó en bolsas herméticas para ser guardadas en el ultracongelador (New Brunswick Scientific) a -80°C.

IV.2 Secado de las microalga.

La biomasa de la microalga se trasladó en hielera al laboratorio de investigación de la Universidad Estatal de Sonora (UES) unidad Navojoa. La microalga congelada se transfirió a matraces de 250 mL para ser liofilizada (liofilizadora Telstar, serie LyoQuest). La microalga seca se almacenó hasta su análisis y uso.

IV.3 Cuantificación de β -carotenos en *Dunaliella* sp.

Para la determinación de β -carotenos contenidos en *Dunaliella* sp. se pesaron 0.03 gr. de microalga en polvo por triplicado, se añadieron 10 mL de acetona al 90%, se dejó actuar la acetona durante 24 horas en oscuridad y refrigeración. Posteriormente se centrifugaron las muestras a 5000 gravedades por 10 minutos para su análisis. La cuantificación de β -carotenos se realizó con un espectrofotómetro (CARY 100 BIO UV-Visible Spectrophotometer) leyendo

la absorbancia a una longitud de onda de 453 nm. La curva de calibración se hizo utilizando β -caroteno como estándar (5.3 mg β -caroteno en 25 mL acetona 90%).

IV.4 Formulación y elaboración del alimento

En el laboratorio de Nutrición acuícola de la Universidad Estatal de Sonora (UES) unidad Navojoa se formularon tres alimentos experimentales isorpotéticos e isoenergéticos, utilizando el software NUTRION® 5 PRO, un alimento control (0%) y dos alimentos experimentales elaborados con los ingredientes mostrados en la tabla 1, en donde se adiciono la harina de *Dunaliella* sp. a los tratamientos experimentales, dietas con el 1 y 2% de harina de microalga (tabla 1), en donde también se muestra la composición teórica proximal del alimento (tabla 2).

Los ingredientes se mezclaron y se llevaron al extrusor de alimento, posteriormente el pellet se secó en la estufa a 45°C por 24 hrs. se empacó en bolsas y se almacenaron en refrigeración. Una vez en el laboratorio el alimento se trituroó en pellets de menor tamaño para alimentar a los organismos.

Tabla 1.- Ingredientes necesarios para preparar el alimento utilizado en los experimentales (gr/kg de alimento).

Ingredientes	Basal	1%	2%
Harina integral de trigo	423	423	423
Pasta de soya	199	194	189
Harina de sardina	260	255	250
Harina de microalga	0	10	20
Aceite de pescado	40	40	40
Lecitina de soya	15	15	15
Alginato de sodio	20	20	20
Premezcla de vitaminas	18	18	18
Fosfato bibásico de sodio	12	12	12
Colesterol	5	5	5
Premezcla de minerales	5	5	5
Cloruro de colina 62%	2	2	2
Vitamina C 35%	0.9	0.9	0.9
BHT	0.04	0.04	0.04

Tabla 2.- Composición proximal de la dieta basal.

Proteína cruda	35.59±0.01 %
Humedad	5.1±0.16%
Cenizas	8.54±0.02%
Fibra cruda	0.58±0.00%
Extracto etéreo	7.80±0.26%
Energía	18.68±0.02 KJ/g

IV.5 Selección de organismos libres de WSSV

Los organismos de *L. vannamei* utilizados en este experimental fueron donados por la granja acuícola OJAI ubicada en Bahía de Kino, Sonora. Los camarones con un peso promedio inicial de 6 g., fueron trasladados al Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora, en donde se aclimataron y mantuvieron en condiciones controladas, a una temperatura de 28-29 °C y una salinidad de 35 partes por mil. Las unidades experimentales consistieron en acuarios de fibra de vidrio con una capacidad de 40 L y se utilizaron tres acuarios por tratamiento y dos controles (Fig. 3), colocando en cada uno de ellos 20 organismos, a los cuales se les alimentó con dos raciones al día durante un mes. Después de ese tiempo, se tomó la primera muestra de hemolinfa a 4 individuos al azar de cada acuario.

Para verificar que los organismos estaban libres de WSSV, se realizó una prueba mediante PCR en tiempo real tomando 100 μ L de hemolinfa de la base del quinto par de pereiópodos con una jeringa desechable de 1mL que contenía 300 μ L de anticoagulante (450 mM NaCl, 10 mM KCl, 10mM Na₂-EDTA, 10 mM HEPES, pH 7.3) (Vargas-Albores *et al.*, 1993).

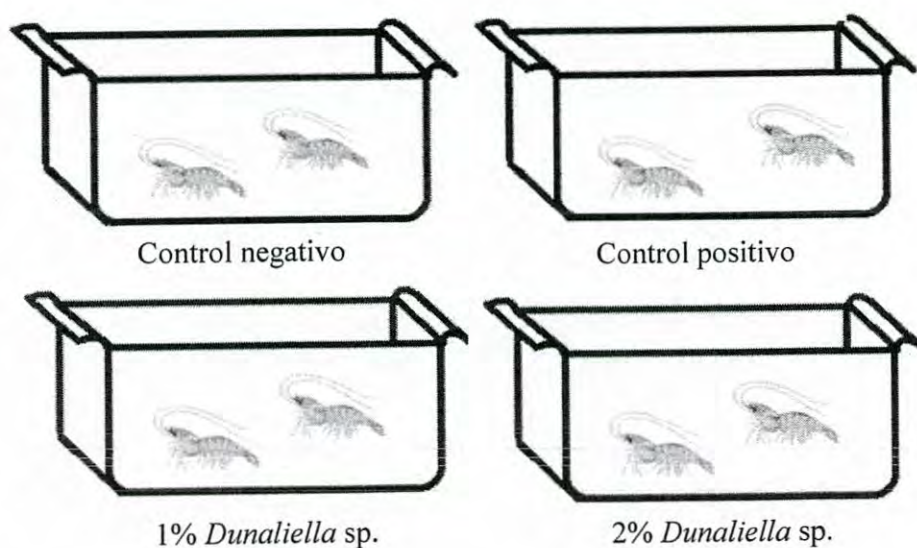


Figura 3.- Diseño experimental; cuatro tratamientos por triplicado, acuarios con 20 L. de agua y 20 organismos por acuario.

Para la detección del virus en los hemocitos, se realizó la detección del ADN correspondiente a la sonda VP28 del virus WSSV, usando la metodología de Moser *et al.*, (2012), mediante el kit iQ™ SYBER® GREEN Supermix y el par de primers VP28F 5'-CTGCTGTGATTGCTGTATTT y VP28R 5'-CAGTGCCAGAGTAGGTGAC. Con las siguientes condiciones de amplificación: 5 min a 95°C, 35 ciclos de PCR y detección (30 s a 95°C, 30 s a 60°C y 72°C por 10 s).

Después de la amplificación, se realizó un análisis de disociación de los fragmentos amplificados por PCR, el cual se basa en la temperatura de separación de las cadenas de ADN o temperatura Melting (T_m), temperatura en la que el 50% del ADN de la molécula es desnaturalizado. Cada fragmento amplificado tiene una T_m característica, que depende principalmente de la longitud del fragmento y de su composición en nucleótidos. Esta prueba permite diferenciar la fluorescencia correspondiente a la amplificación de un producto de PCR (T_m superior a 80°C) de la fluorescencia debida a la formación de dímeros de los oligonucleótidos, cuya T_m es entre 70 y 80°C. La presencia del transcrito para VP28 se basó en aquellas muestras cuyo valor de T_m fue similar o igual al control positivo.

La síntesis de cDNA a partir del ARNm que codifica la proteína VP28 del virus WSSV, se realizó mediante el kit iScript™ One-Step RT-PCR con SYBR® Green y los primers VP28F y VP28R siguiendo el protocolo del fabricante.

IV.6 Infección de *Litopenaeus vannamei* con WSSV

El inóculo para la infección obtuvo de organismos de *L. vannamei* infectados con WSSV, se tomaron porciones de músculo y se maceraron en solución salina a una relación 1:6 (8.7gr. de camarón y 52.2 ml. de solución salina), el macerado se pasó a tubos de 2 mL y se centrifugó a 9000 gravedades por 5 minutos, el sobrenadante se pasó por un filtro de membrana de 0.2 micras y el inóculo se almacenó a -80°C.

La infección se realizó por alimentación forzada, utilizando una jeringa tipo insulina 27 G x 13 mm con aguja desmontable, con sonda (para venoclisis) de 22 G x 32 mm. Se administraron 100µL del inóculo en la región oral de cada uno de los organismos en los

tratamientos control positivo, negativo y los tratamientos 1 y 2 % de biomasa de *Dunaliella* sp. respectivamente. El control negativo no se infectó con WSSV.

IV.7 Análisis bioquímico de metabolitos plasmáticos

Para el análisis de los metabolitos plasmáticos, las muestras de hemolinfa se centrifugaron a 9000 gravedades por 5 min. y se separó el plasma. Se utilizaron los Kits comerciales para diagnóstico clínico RANDOX®, siguiendo las especificaciones del fabricante. Se colocaron 10 µL de las muestras en microplacas de 96 pozos de 300 µL (Nunc™), añadiendo 250 µL del reactivo correspondiente y se incubaron por el tiempo indicado para cada una de ellas, se analizaron espectrofotométricamente a la longitud de onda indicada (Tabla 3), con el lector de microplacas Synergy (Bio-Tek Instruments) de acuerdo a la metodología propuesta por Sánchez-Paz *et al.*, (2007).

Tabla 3.- Longitud de onda y coloración de la reacción colorimétrica para evaluar la concentración de cada metabolito.

Metabolito	Longitud de onda (nm)	Coloración
Glucosa	500	Rojo-Violeta
Lactato	505	Violeta
Triglicéridos	500	Violeta
Colesterol	500	Rosa
Proteínas Totales	550	Violeta

IV.8 Determinación de actividad del sistema inmune

a. Aglutinación de hemocitos de camarón

Se colocaron 25 μ L de suspensión de eritrocitos humanos al 2% (extraídos en el momento de la preparación en 8 pozos de una microplaca, se adicionaron 25 μ L de plasma de camarón en el pozo número 1, se mezcló y se tomaron 25 μ L de la mezcla para pasarse al pozo 2, en donde se mezcló y repitió para el pozo 3 hasta llegar al pozo 7. Adicionando en el pozo 8 los 25 μ L de solución salina estéril (0.85%) como blanco, se incubó por 1 hora y se leyó aglutinación según dilución. La aglutinación de hemocitos de camarón se midió en concentración de aglutinina/ mg/ml de proteína.

b. Actividad de α -2-Macroglobulina (A2M)

Se colocaron 10 μ L de muestra en una microplaca y se agregaron 10 μ L de solución de tripsina (1mg/ml) incubando por 10 minutos a 37°C, posteriormente se agregaron 120 μ L de inhibidor de tripsina (2mg/mL) y se incubó por 10 min. a 37°C, después se adicionaron 100 μ L del sustrato BAPNA (N_{α} -Benzoyl-L-arginine 4-nitroanilide hydrochloride) (1mg/mL) para volver a incubar por 1 hora y luego leer absorbancia a 415 nm. La actividad específica de A2M fue calculada multiplicando el valor de la absorbancia por el factor de dilución y se dividió entre el tiempo de incubación. Aplicando la siguiente formula:

- $A\text{-}2\text{-}M = \text{Absorbancia} \times \text{Factor de dilución} / \text{tiempo de incubación}$
- $\text{Factor de dilución} = (\text{Abs. muestra} / \text{Abs. Estándar}) \times \text{Conc. estándar}$

Los valores de A2M se normalizan con los valores de proteína y se reporta como actividad de A2M por mg/mL de proteína.

c. Actividad de proteasas tipo tripsina

Se colocaron 50 μ L de plasma de camarón en una microplaca adicionando 200 μ L de sustrato de BAPNA (1mg/mL), se incubó por 60 minutos a 37°C y se leyó la absorbancia a 405 nm. Los valores de absorbancia obtenidos se normalizan con los valores de proteína y se reporta como actividad de proteasas por mg/mL de proteína.

d. Actividad específica de Fenoloxidasa (FO)

Se colocaron 10 μ L de plasma de camarón en una microplaca y se adicionaron 250 μ L de L-DOPA (3mg/mL), posteriormente se incubó por 20 minutos para leer a 490 nm. Los valores de absorbancia obtenidos se normalizan con los valores de proteína y se reporta como actividad de fenoloxidasa por mg/mL de proteína.

e. Actividad específica de Profenoloxidasa (PFO)

Se colocaron 10 μ L de plasma de camarón en una microplaca más 10 μ L de tripsina y 250 μ L de L-DOPA (3 mg/mL), se dejó incubar por 20 min. y se leyó a 490 nm. Los valores de absorbancia obtenidos se normalizan con los valores de proteína y se reporta como actividad de profenoloxida por mg/mL de proteína.

IV.9 Análisis estadístico

Se realizó un análisis de ANOVA de dos vías y pruebas a posteriori para las variantes respuestas.

Se aplicó la prueba de los mínimos cuadrados para el análisis de los metabolitos: glucosa, lactato, proteína, colesterol y triglicéridos y pruebas de Tukey para la actividad del sistema inmune.

V. RESULTADOS Y DISCUSIONES

V.1 Producción de *Dunaliella* sp. y concentración de β -carotenos

De 66 garrafrones con medio f/8 y se obtuvo un total de 40 gr. de biomasa seca de *Dunaliella* sp. con una concentración de 0.42 mg/mL de β -carotenos. Cifuentes *et al.*, (1996) cultivaron *D. salina* utilizando un medio de cultivo natural enriquecido con una baja concentración de nitratos reportando valores de 0.0294 a 0.0358 mg/mL, las cuales son concentraciones significativas menores a las que se obtuvieron en el presente estudio.

V.2 Identificación y detección del virus por PCR en tiempo real

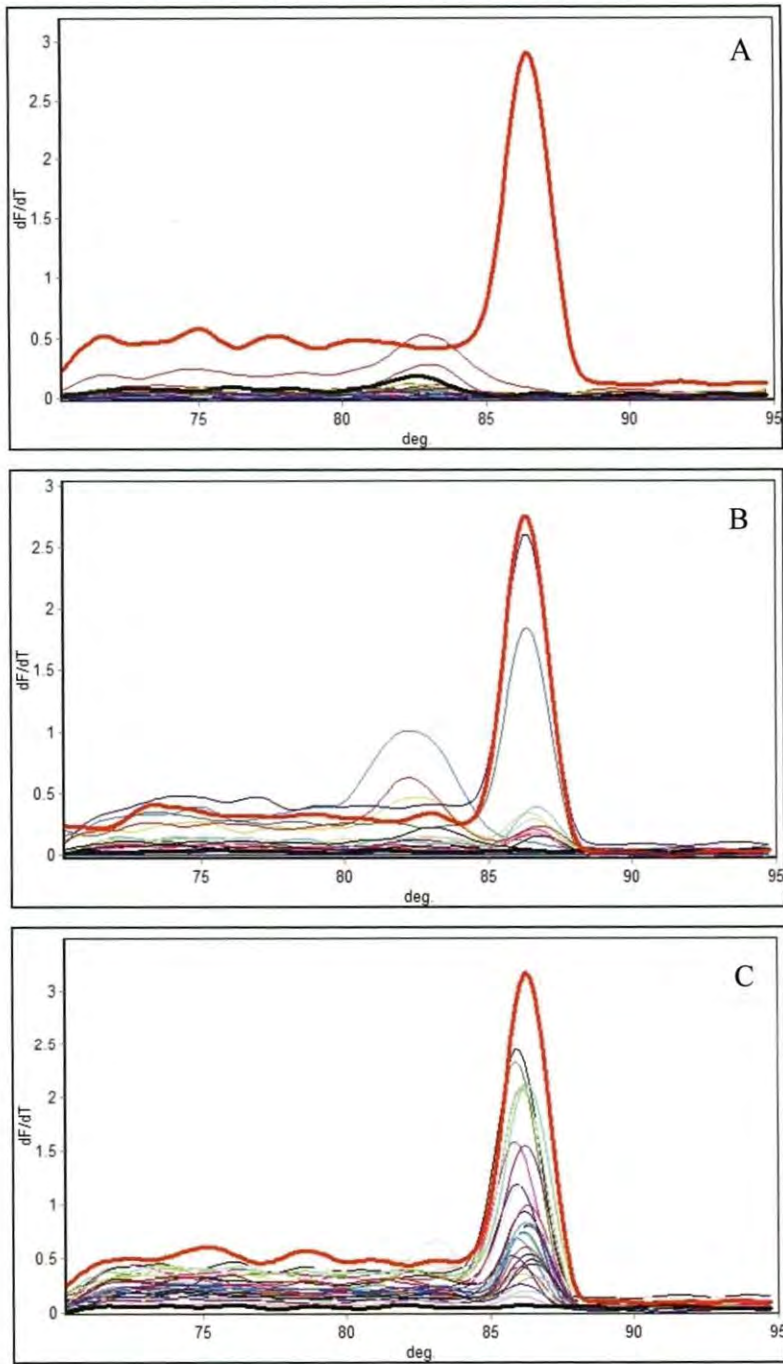


Fig. 4.- Análisis de las curvas de disociación (Melting) de los productos amplificados por PCR en tiempo real A) tiempo cero, B) 72 horas post infección (hpi) y C) 144 hpi, donde la línea gruesa roja es el control positivo con WSSV y la línea gruesa negra es el control negativo.

V.3 Mortalidad de *Litopenaeus vannamei*

La infección experimental con WSSV produjo mortalidades de *L. vannamei* a partir de las 48 horas post infección (hpi), llegando al 44% de mortalidad, mientras que el control negativo (sin infección de WSSV) no presento mortalidades.

En los tratamientos 1 y 2 se obtuvo una mortalidad del 16% y 18%. Las mortalidades más altas se observaron en los días cuatro y cinco post infección (Tabla 4).

Los resultados obtenidos en este trabajo referentes a los tiempos de infección concuerdan con lo reportado Maldonado *et al.*, (2004) quienes detectaron lesiones histológicas desde las 36 horas post-infección por ingestión, además de haber observado grados severos de lesiones por WSSV en muestras tomadas entre los días tres y siete después de iniciarse la infección. Por otro lado, Wu *et al.*, (2005) infectaron experimentalmente *P. monodon* por vacunación, registraron del 80 al 100% de mortalidad después de ocho días de infección, mientras que Liu *et al.*, (2009), encontraron mortalidades del 100% después de tres días de infección con WSSV. Asimismo, Andrade (2011), encontró mortalidades de camarones peneidos por el WSSV del 100% en los días tres y siete post infección.

Tabla 4.- Porcentaje sobrevivencia de *Litopenaeus vannamei* a las 144 horas post infección con WSSV.

Tratamiento	Sobrevivencia a las 144 hpi. (%)
Blanco (sin infección)	100
Control (infectado)	56
Dieta con 1% de <i>Dunaliella</i> sp.	83
Dieta con 2% de <i>Dunaliella</i> sp	81

V.4 Análisis bioquímico de metabolitos plasmáticos

El análisis de los metabolitos nos permite conocer el estado nutricional e inmunológico de los camarones (Sánchez *et al.*, 2001). Los niveles de metabolitos en *L. vannamei*, cultivado en diferentes condiciones ambientales como cultivos al interior, exterior y en condiciones experimentales de laboratorio, ponen en evidencia que no todos los metabolitos sanguíneos y moléculas estudiadas en los organismos tienen una distribución similar y varían según las condiciones de cultivo y alimentación. Así mismo, existe una falta de valores de referencia que permitan establecer con certeza la variación de dichos parámetros fisiológicos e inmunológicos en los camarones. (Pascual *et al.*, 2003; Rosas *et al.*, 2002).

En este estudio no se encontraron diferencias significativas de los metabolitos entre tratamientos. Aunque se observó un aumento en todas las concentraciones en el T1, con valores inferiores en el control negativo. Por otro lado se observó un gran aumento en las concentraciones de proteína, triglicéridos y colesterol en el día 3 de infección, mientras que el lactato y la glucosa mantuvieron valores similares a lo largo del experimental estudio.

V.4.1 Glucosa

En la tabla 5 se puede observar que no se encontraron diferencias estadísticas entre tratamientos (T1 y T2), sin embargo en los tratamientos control y en T1 se obtuvieron superiores de hasta 0.3369 mg/mL. La glucosa aumentó a partir del día 1, con un máximo al día 3 y disminuyó posteriormente hasta llegar a 0.1317 mg/mL en el día 6 (Tabla 6). Lo anterior coincide con lo encontrado por Mathew *et al.*, (2007) al infectar *P. monodon* con WSSV los niveles de glucosa disminuyeron en un 33%. Rosas *et al.*, (2002) encontraron valores de 0.28 mg/mL en *L. vannamei* cultivado experimentalmente en laboratorio y valores de 0.38 mg/mL en organismos cultivados en estanques al exterior, así mismo, Pascual *et al.*, (2003), al trabajar con *L. setiferus* encontraron valores de 0.14 mg/mL en organismos silvestres y 0.13mg/mL en camarones cultivados, mientras que Sánchez *et al.*, (2001) reportaron valores de 0.38 mg/mL en cultivos al exterior. La glucosa sanguínea es un indicador del metabolismo de carbohidratos por lo que los niveles de glucosa en hemolinfa suelen elevarse rápidamente cuando los camarones son sometidos a estrés (Rosas *et al.*, 2002).

Tal como ocurrió en este experimental. Chen *et al.*, (2011), infectaron hemocitos de camarón con WSSV y encontraron que a las 12 hpi, hay un incremento en el consumo de glucosa y la concentración del lactato.

V.4.2 Lactato

En las concentraciones de lactato no se encontraron diferencias estadísticas entre los tratamientos, el T2 presentó la concentración más baja de 0.2616 mg/mL mientras que el control positivo y el T1 mostraron concentraciones similares de 0.35 mg/mL. Durante el experimento se encontraron diferencias estadísticas entre los días 1 al 3 con valores más altos de lactato; para el día 5 la concentración disminuyó hasta 0.0792 mg/mL (Tabla 6). Rosas *et al.*, (2002) determinaron un valor de referencia para este metabolito de 0.11 mg/mL y no encontraron una distribución normal en los valores, Pascual *et al.*, (2003) reportaron valores de 0.11 mg/mL en *L. vannamei* cultivados al exterior; mientras que para organismos silvestres de *L. setiferus* encontraron valores de 0.07 mg/mL. Valores de 0.03 mg/mL en camarones cultivados fueron reportados por Sánchez *et al.*, (2001). Los valores del presente estudio son superiores a los reportados en otros estudios, debido probablemente al estrés causado por WSSV, en donde las demandas energéticas aumentan y el proceso de gluconeogénesis se incrementa, reflejándose en elevadas concentraciones de lactato. El lactato es utilizado como una medida de estrés, ya que es el producto final del metabolismo anaeróbico. Bajo situaciones de estrés, la concentración de lactato tiende a ser más alta que la oxidación del mismo, lo que provoca una acumulación en el músculo, lo que nos indica que el metabolismo anaeróbico es mayor que el metabolismo aeróbico (Sánchez *et al.*, 2001).

V.4.3 Proteína

Las concentraciones de proteína no presentaron diferencias estadísticas entre tratamientos, sin embargo, el control negativo presentó la concentración más alta con 152.36 mg/mL. Los niveles de proteína presentaron un patrón irregular y alcanzó su mayor concentración en el día 3 con un valor de 229.6 mg/mL (Tabla 6) lo cual coincidió con los valores encontrados por Rosas *et al.*, (2002) en cultivos de *L. vannamei* cultivado en

laboratorio de 224 mg/mL, mientras que cultivos al exterior presentaron valores de 93 mg/mL. Asimismo Sánchez *et al.*, (2001) reportaron que en situaciones de estrés los niveles de proteína y colesterol en el camarón disminuyeron hasta 224.2 mg/mL en cultivos al exterior., se encontraron valores de 345.8 en organismos cultivados de *L. setiferus* (Pascual *et al.*, 2003). La proteína puede ser utilizada como fuente de energía durante una situación de estrés (Rosas *et al.*, 2001), lo que implicaría que sus niveles bajarán ante una infección viral, lo cual se observó parcialmente en este estudio, al menos los dos primeros días, aunque después la tendencia no fue constante.

V.4.4 Colesterol

Las concentraciones de colesterol registraron diferencias significativas entre los tratamientos. Los valores más bajos se observaron en el control negativo (0.8272 mg/mL) y el T1 el más alto (1.12 mg/mL) (Tabla 5). Al comparar en el tiempo (Tabla 6), se encontraron diferencias estadísticas, con los valores más altos en los días 1,2 y 3, llegando hasta 1.902 mg/mL en el día 3 disminuyendo consistentemente hasta un valor de 0.5707 mg/mL en el día 6. Rosas *et al.*, (2002) sostienen que no se pudo establecer un valor normal para este parámetro ya que este compuesto varía dependiendo de la dieta, estrés y tipo de cultivo. Ellos reportaron valores de 1.06 mg/mL en organismos cultivados experimentalmente en laboratorio y 0.44 mg/mL en cultivos al exterior, lo cual coincide con lo encontrado en este estudio. Para *L. setiferus* silvestres Sánchez *et al.*, (2001) reportaron valores de 1.06 y 0.74 mg/mL en organismos en cautiverio. Se ha detectado que el lactato acumulado durante los primeros días de infección viral es utilizado como sustrato para la síntesis de colesterol y ácidos grasos (Galván-Álvarez, 2012). Becerra-Dórame (2012) reporta concentraciones de 0.20 y 0.33 mg/mL para *L. vannamei* cultivado tradicionalmente y en un sistema microbiano respectivamente.

V.4.5 Triglicéridos

Los lípidos juegan un papel importante en la interacción patógeno-hospedero, ya que las múltiples funciones celulares en las que intervienen los convierten en protagonistas principales durante una infección viral (Ynske *et al.*, 2010).

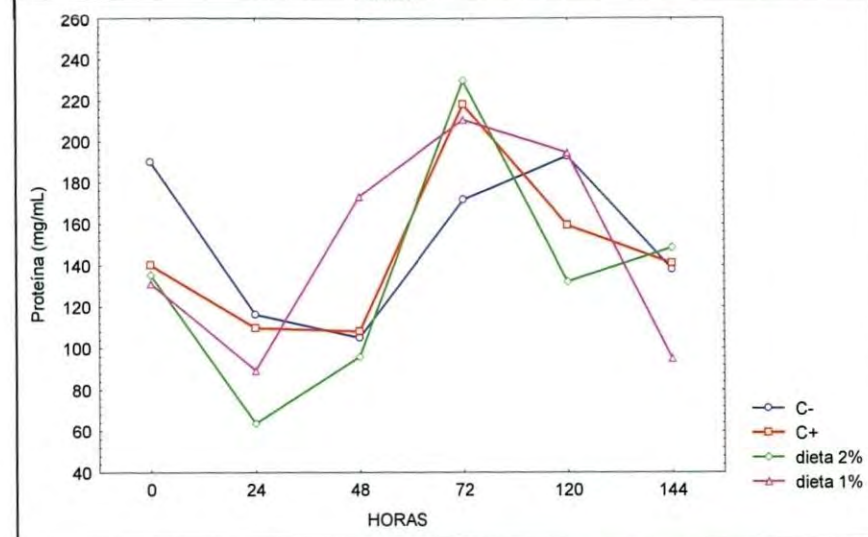
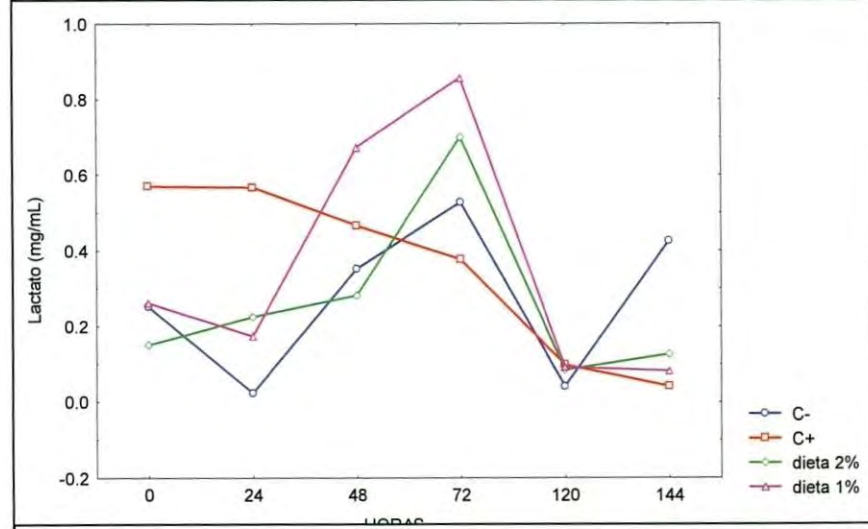
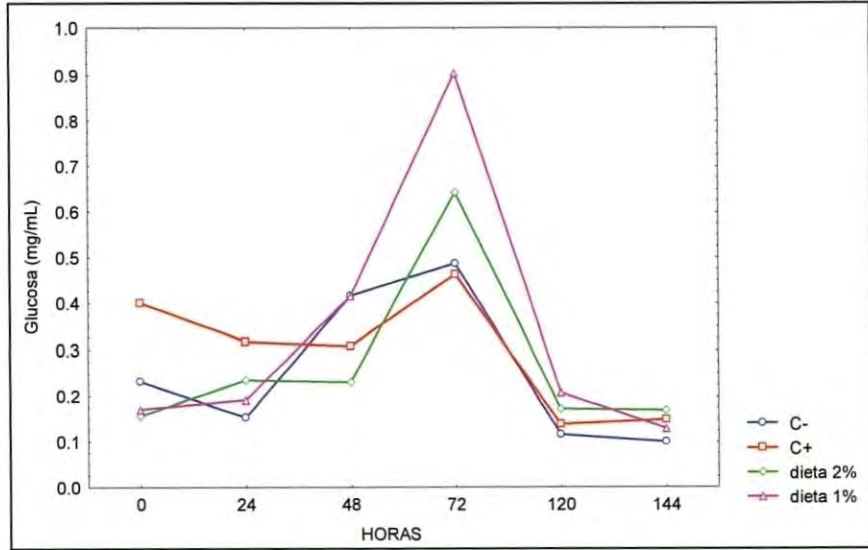
Alteraciones en la cantidad de glucosa, triglicéridos y lípidos hepatopancreáticos, reflejan una degradación ó daño en este tejido y la importancia de los triglicéridos radica en su función como principal fuente de energía (Galván-Álvarez, 2012). En la presente investigación no se encontraron diferencias estadísticas para los triglicéridos entre tratamientos (Tabla 5), pero si se observaron variaciones respecto al tiempo. El nivel más alto fue registrado entre los días 2 y 3 (Tabla 6). Chen *et al.*, (2011), infectaron hemocitos de camarón con WSSV y reportan una disminución significativa en la concentración de triglicéridos a través del tiempo después de la infección.

Tabla 5.- Concentración promedio (mg/mL) y desviación estándar de metabolitos en hemolinfa de *Litopenaeus vannamei* por tratamiento.

Tratamiento	Glucosa	Lactato	Proteína	Colesterol	Triglicéridos
Blanco	0.2511 ^A	0.2705 ^A	152.36 ^A	0.8272 ^A	1.0875 ^A
	0.0955	0.1621	53.05	0.2743	0.3268
Control	0.2965 ^A	0.3539 ^A	146.10 ^A	0.8967 ^A	1.1176 ^A
	0.1558	0.2396	61.30	0.3878	0.4309
1%	0.3369 ^A	0.3568 ^A	149.86 ^A	1.1273 ^B	1.4202 ^A
	0.2323	0.2724	51.39	0.5642	0.6454
2%	0.2680 ^A	0.2616 ^A	134.31 ^A	0.9052 ^A	1.1315 ^A
	0.1405	0.1451	48.35	0.4259	0.3642

Tabla 6.- Concentración promedio (mg/mL) y desviación estándar de metabolitos en hemolinfa de *Litopenaeus vannamei* por día.

	Glucosa	Lactato	Proteína	Colesterol	Triglicéridos
0	0.2406 ^A	0.3092 ^B	149.29 ^{CD}	0.4084 ^A	0.6271 ^A
	0.1516	0.2580	74.54	0.1453	0.2450
1	0.2243 ^A	0.2476 ^B	94.84 ^A	0.7762 ^A	1.0532 ^B
	0.1065	0.1662	40.81	0.2833	0.3450
2	0.3430 ^B	0.4435 ^C	120.59 ^B	1.3409 ^B	1.5658 ^C
	0.1719	0.2707	51.69	0.6343	0.6590
3	0.6241 ^C	0.6155 ^B	207.40 ^E	1.9028 ^C	2.2070 ^D
	0.3153	0.2830	58.85	0.6684	0.7298
5	0.1594 ^A	0.0792 ^A	171.00 ^D	0.6360 ^{AB}	0.8443 ^{AB}
	0.1297	0.1233	48.19	0.5221	0.4164
6	0.1377 ^A	0.1692 ^{AB}	130.81 ^{BC}	0.5707 ^{AB}	0.8377 ^{AB}
	0.0613	0.1276	47.03	0.2252	0.2557



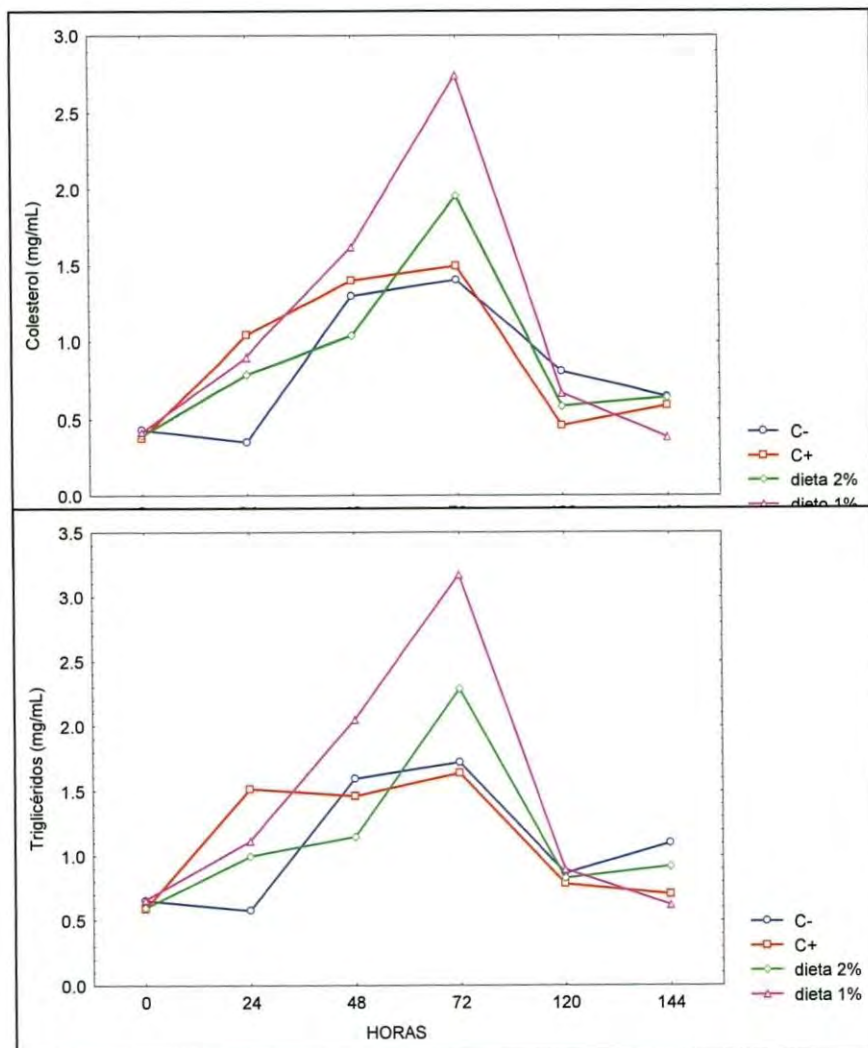


Fig. 5.- Variación temporal de los diferentes metabolitos en los tratamientos 1, 2 y control positivo y negativo.

V.5 Determinación de actividad del sistema inmune

V.5.1 Actividad específica de Lisozimas

Las lisozimas en los crustáceos son fundamentales para el sistema inmune innato, ya que actúan en la respuesta antibacterial de los camarones (De la Re Vega *et al.*, 2004). Al inyectar lisozimas intramuscularmente en el camarón azul (*Litopenaeus stylirostris*) infectado con WSSV aumenta la sobrevivencia al virus, lo que indica que las lisozimas están involucradas en el sistema inmune innato del camarón (Mai y Wang, 2010).

En este estudio no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos (Tabla 7). En el control positivo se observó una mayor actividad de lisozima. Vemos algunas variaciones a través del tiempo post infección (Tabla 8), observándose que los niveles se mantuvieron fluctuantes y al llegar al día 6 de la infección con el virus no se encontró actividad de Lisozimas.

V.5.2 Aglutinación de hemocitos de camarón

La aglutinina es una proteína conocida como LPS (lipopolisacáridos), que es capaz de aglutinar bacterias, sin embargo puede unirse a los hemocitos y estimular la fagocitosis, así mismo, llega a lisar a los hemocitos activando el sistema profenoloxidasa y de coagulación (Rendón y Balcázar, 2003; Vargas *et al.*, 1996).

No se encontraron diferencias estadísticas entre tratamientos en relación a la aglutinación de hemocitos, observándose aglutinaciones ligeramente mayores en el tratamiento con 1% de *Dunaliella* sp. (Tabla 7). Se encontraron diferencias significativas entre los días post infección, con el valor más bajo al día cinco (Tabla 8) y un aumento muy evidente en el día 6, observándose aglutinaciones ligeramente mayores en el T1 (Tabla 7). Al analizarse en el tiempo se encontraron diferencias significativas, con el valor más bajo al día cinco (Tabla 8) y un aumento muy evidentemente en el día 6. Sritunyalucksana *et al.*, (1999), quienes infectaron hemocitos de *P. monodon* con YHV (virus de cabeza amarilla) detectaron una disminución de la actividad de aglutinación en los hemocitos durante de la infección, esta disminución concuerda con lo encontrado en este trabajo.

V.5.3 Actividad de proteasas tipo tripsina

Al analizar las proteasas por tratamiento (Tabla7) no se encontraron diferencias significativas, sin embargo, se encontró una menor actividad en el Control negativo y aumentó en el resto de los tratamiento. Al comparar en el tiempo se observaron diferencias significativas, con los valores más bajos al día 0 y al día 1 (Tabla 8) de inicio de la infección por WSSV. Posteriormente la actividad de las proteasas aumentó drásticamente con el valor más alto, para al final disminuir los valores. Las proteasas hidrolizan a la proteína profenoloxidasa activándola a fenoloxidasa (Gollas-Galvan *et al.*, 1997).

V.5.4 Actividad específica de α -2-Macroglobulina (A2M)

No se observaron diferencias significativas entre tratamientos pero sí con respecto al tiempo post infección. Se observó para todos los tratamientos y controles que en el día 1 del experimental el valor de A2M se eleva siete veces más del valor inicial (antes de la infección), lo que indica una reacción ante el virus. En los tres días siguientes, los valores se mantuvieron elevados y disminuyeron al día 6 de la infección (Tabla8). Para el camarón blanco infectado con BNHP Figueroa-Pizano (2013) encontró que la actividad de A2M disminuye conforme avanzó la infección, cual fue similar a lo encontrado en esta investigación.

No se encontraron diferencias significativas entre tratamientos. En el control negativo no se observó un incremento en la actividad hasta el día 2 (Tabla 7), lo que indica que el aumento acelerado se debió a la entrada del virus al sistema.

La A2M funciona como inhibidor de proteasas, al actuar como opsonina para marcar y unirse a las proteasas, formando un complejo llamado α -2-macroglobulina-proteasa, de tal manera que permite su endocitosis y degradación proteolítica (Armstrong, 2010; Figueroa-Pizano, 2013). Estas proteasas, participan en el sistema profenoloxidasa, que ayuda a regular la producción de especies reactivas de oxígeno que se generan por la oxidación de los fenoles, por lo tanto, cuando la A2M disminuye, produce un desbalance en el sistema profenoloxidasa, ya que habría una producción excesiva de radicales libres.

Estas características permite a la A2M jugar un papel importante en la defensa inmune de los camarones, ya que es una proteína capaz de unirse y neutralizar diversa gama de proteasas que funcionan como factores de virulencia (Armstrong, 2010). Además, juega un papel muy importante en el sistema profenoloxidasa, ya que esta al ser activada a su forma fenoloxidasa por la serina proteasa, la A2M y los inhibidores de tripsina que se encuentran fuera de los hemocitos en el plasma, eliminan a la serina activando el sistema profenoloxidasa (Hung-Hung, *et al.*, 1998).

V.5.5 Actividad específica de Fenoloxidasa (FO)

La FO se encuentra inactiva en el interior de los gránulos de los hemocitos en forma de profenoloxidasa (PFO) y es liberada en presencia de un antígeno para ser activada (Figuroa-Pizano, 2013), siendo esta la enzima terminal del sistema profenoloxidasa (Hung-Hung *et al.*, 1998; Sarathi *et al.*, 2007). Esta es la enzima más importante y reconocida del proceso de melanización que se da en los camarones como un sistema de defensa. En este estudio se encontró que la FO presentó su punto mínimo al día 5 y se libera en el día 6 (Tabla 8), cuando la infección viral empezó a provocar mortalidades masivas; la mayor actividad se presentó en la dieta T2 (Tabla 7), seguido de T1, el control negativo y por último el control positivo. Figuroa-Pizano (2003) encontró que organismos infectados con BNHP tienen menor actividad que el control negativo, sin embargo, con los días post infección empieza a disminuir.

FO produce hidroxilación de fenoles y oxidación de o-fenoles a quinonas, necesarios para la melanización (Andrade, 2011). Sarathi *et al.*, (2007), encontró estimulación del sistema inmune generado por *Vibrio alginolyticus* en la PFO, lo que provocó un aumento en la FO. Niveles elevados de FO surgen como un ineficiente mecanismo de compensación por mantener la resistencia a la infección, esta podría ser la razón por la cual aumenta la concentración de FO en el presente trabajo.

V.5.6 Actividad específica de Profenoloxidasa (PFO)

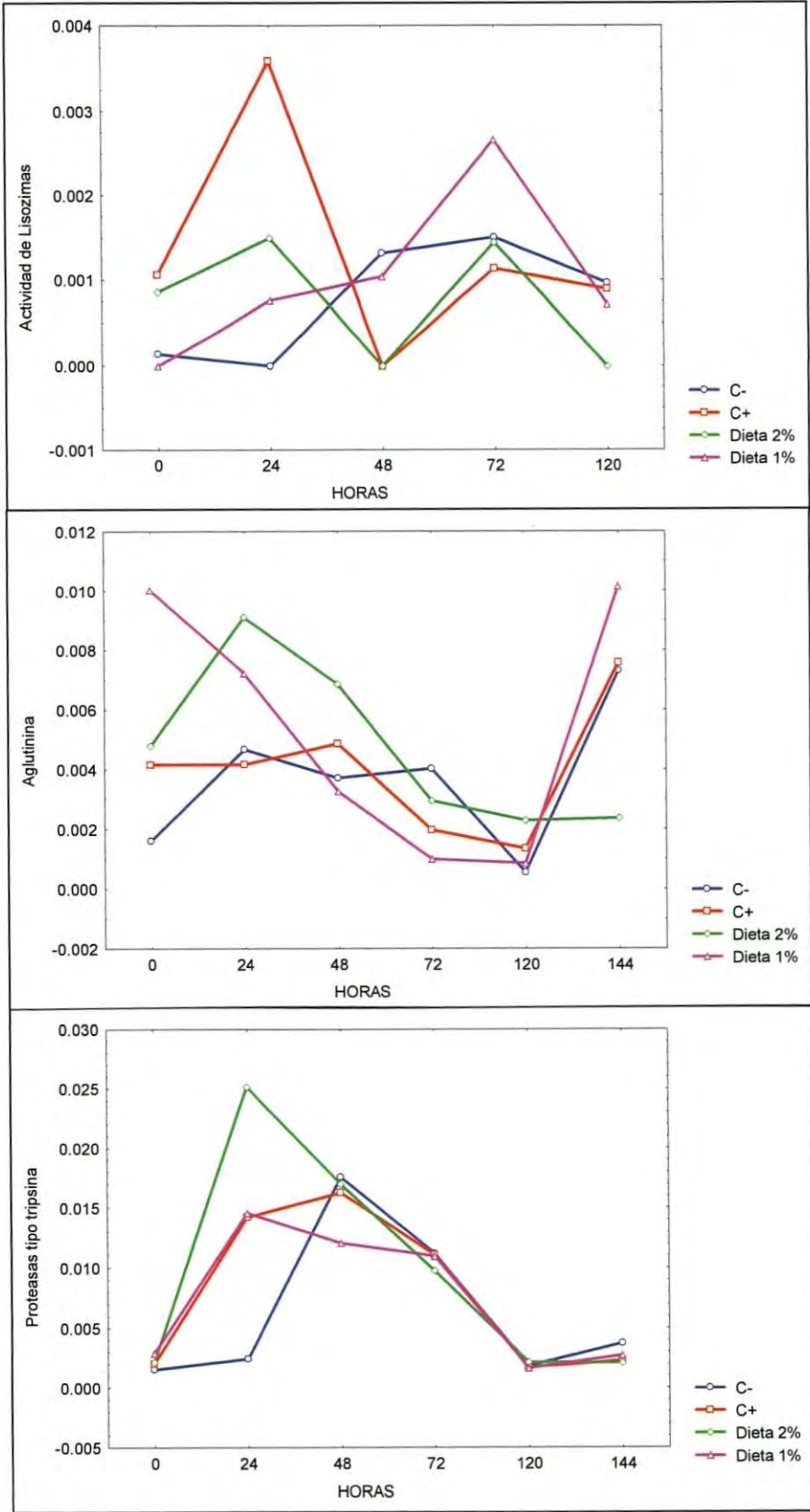
La PFO se encuentra inactiva dentro de los gránulos de los hemocitos en el camarón, y es activada a FO con la ayuda de calcio, sin embargo el mecanismo de activación del sistema PFO se desconoce (Sarathi *et al.*, 2007). Aunque entre tratamientos no se encontraron diferencias significativas (Tabla 7), la PFO disminuyó en el día tres, para tener su pico más alto al día cinco y disminuyó abruptamente en el día seis (Tabla 8), que coincide con los resultados de FO, que aumentó su actividad en el día seis de la infección. Subashini *et al.*, (2012), evaluaron la eficiencia de una bacteria tipo *Vibrio* como inmunoestimulante en *Marsupenaeus japonicus* en contra de WSSV y encontraron mayor actividad en los tratamientos con bacteria que en los tratamientos control, lo que indicó la acción de la PFO en presencia del virus. Sarathi *et al.*, (2007) observaron en las primeras 48 horas post infección (hpi) un aumento en la actividad de PFO en *F. indicus* infectados con WSSV comparados con el grupo control a las 72 hpi. En este trabajo el aumento en la PFO podría atribuirse a la estimulación de los carotenos provistos por las dietas.

Tabla 7.- Actividad específica y desviación estándar de componentes del Sistema inmune en *Litopenaeus vannamei* por tratamiento (datos normalizados con proteína).

Tratamiento	Aglutinina	Fenoloxidasa	Profenoloxidasa	Tripsina	α -2-Macroglobulina	Lisozima
Blanco	0,00365 ^A (0,00132)	0,00074 ^A (0,00019)	0.09687 ^A (0.01765)	0,00638 ^A (0,00138)	0,00444 ^A (0,00102)	0.00079 ^A (0.00027)
Control	0,00391 ^A (0,00097)	0,00071 ^A (0,00014)	0.06592 ^A (0.01458)	0,00792 ^A (0,00101)	0,00554 ^A (0,00074)	0.00140 ^A (0.00021)
1%	0,00534 ^A (0,00081)	0,00086 ^A (0,00011)	0.07209 ^A (0.01338)	0,00744 ^A (0,00084)	0,00527 ^A (0,00061)	0.00125 ^A (0.00022)
2%	0,00487 ^A (0,00077)	0,00096 ^A (0,00011)	0.08350 ^A (0.01359)	0,00974 ^A (0,00080)	0,00723 ^A (0,00059)	0.00077 ^A (0.00023)

Tabla 8.- Actividad específica y desviación estándar de componentes del Sistema inmune en *Litopenaeus vannamei* por día (datos normalizados con proteína).

Día	Aglutinina	Fenoloxidasa	Profenoloxidasa	Tripsina	α -2-Macroglobulina	Lisozima
0	0,00585 ^{AB} (0,00111)	0,00053 ^{CD} (0,00016)	0.05264 ^A (0.01484)	0,00200 ^C (0,00114)	0,00111 ^B (0,00085)	0.00061 ^B (0.00026)
1	0,00666 ^A (0,00109)	0,00121 ^{AB} (0,00016)	0.03856 ^A (0.01805)	0,01634 ^A (0,00114)	0,00748 ^A (0,00085)	0.00159 ^{AB} (0.00029)
2	0,00470 ^{ABC} (0,00111)	0,00127 ^A (0,00016)	0.08189 ^A (0.02009)	0,01498 ^A (0,00116)	0,00816 ^A (0,00085)	0.00068 ^B (0.00025)
3	0,00195 ^{BC} (0,00111)	0,00102 ^{ABC} (0,00016)	0.01648 ^A (0.02479)	0,01029 ^B (0,00114)	0,00657 ^A (0,00085)	0.00176 ^A (0.00022)
5	0,00127 ^C (0,00115)	0,00029 ^D (0,00016)	0.22633 ^B (0.01491)	0,00146 ^C (0,00121)	0,00917 ^A (0,00089)	0.00063 ^B (0.00028)
6	0,00623 ^{AB} (0,00123)	0,00059 ^{BCD} (0,00017)	0.06167 ^A (0.01751)	0,00216 ^C (0,00125)	0,00121 ^B (0,00092)	0 0



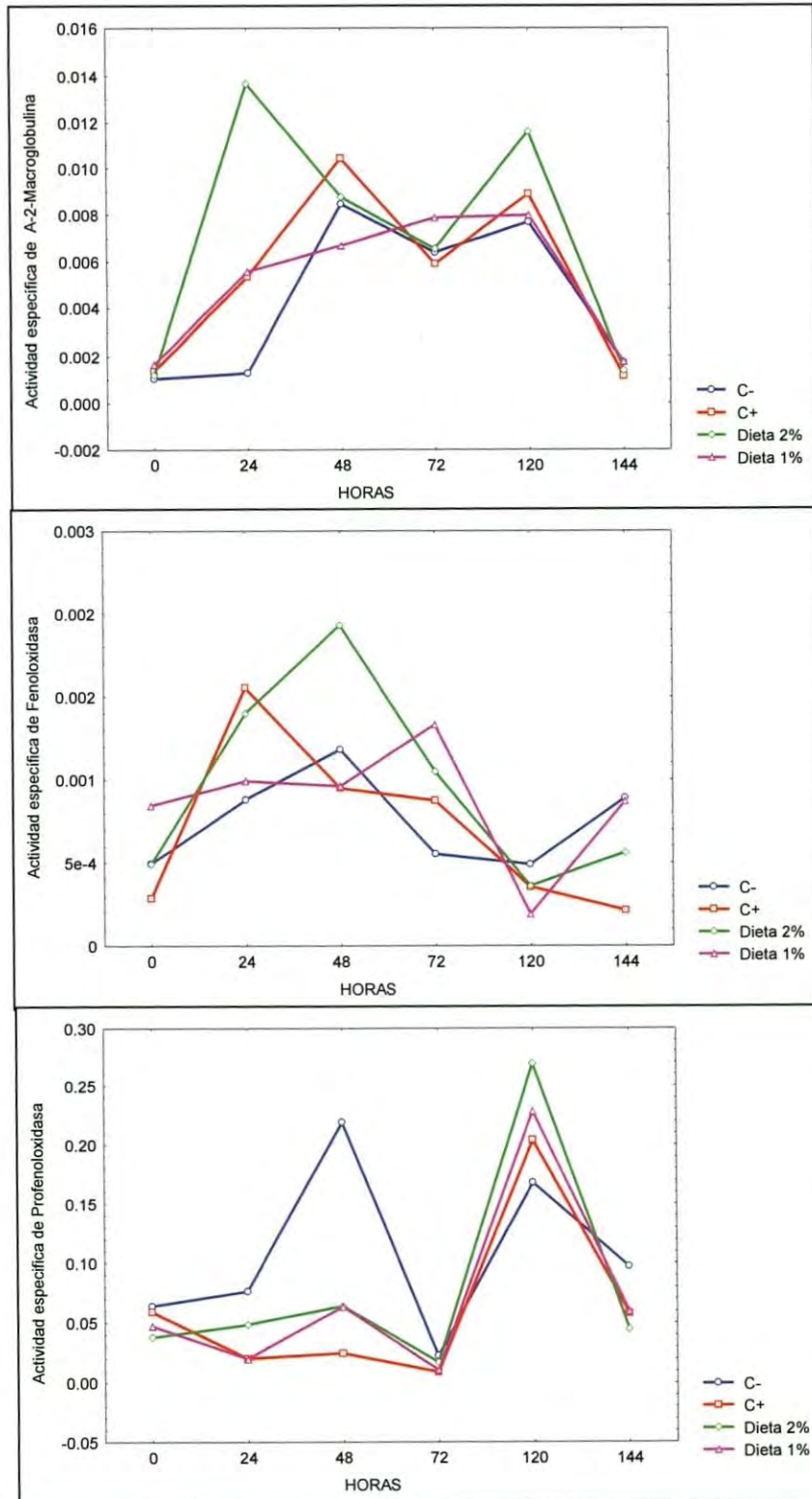


Fig. 6.- Comportamiento del sistema inmune por día y por tratamiento.

VI. CONCLUSIONES

- La inclusión de biomasa de *Dunaliella* sp tuvo un efecto positivo en la sobrevivencia de *L. vannamei* ya que a las 144 horas post infección los tratamientos con el 1 y 2% de inclusión presentaron una sobrevivencia del 80%, en comparación con el 56% obtenido en el control positivo.
- Las concentraciones de los diferentes metabolitos plasmáticos encontrados fueron iguales entre tratamientos (control negativo, control positivo, Tratamientos 1 y 2); aunque en el tiempo se aprecia un aumento en glucosa, lactato y triglicéridos a partir de los primeros días posteriores a la infección, con tendencia a disminuir hasta el final del experimental (día 6), esto, debido a que los metabolitos relacionados con los azúcares son una forma de reserva energética en situaciones de estrés.
- Con relación a proteínas y colesterol se encontró que los valores aumentan después del tercer día de infección, debido a la situación de estrés presentada por la infección viral.
- La actividad del sistema inmune de *L. vannamei* fue positiva en el caso de las lisozimas entre los cuatro tratamientos, sin tendencia definida en el tiempo, mientras que la aglutinación de hemocitos y la actividad de la tripsina proteasa fue igual entre tratamientos, pero diferente en el tiempo ya que aumentó con éste.
- La actividad específica de la fenoloxidasa aumentó drásticamente, mientras que la actividad específica de la profenoloxidasa disminuyen abruptamente al final de la infección, lo cual es una respuesta en presencia del agente viral.

VII. RECOMENDACIONES

- Purificar los β -carotenos de *Dunaliella* sp. para ser añadidos a la dieta, así como probar mayores concentraciones de esta microalga.
- Probar las dietas con *Dunaliella* sp. en cultivos a nivel granja al exterior y más intensivos.
- Probar la efectividad de la dieta enriquecida con biomasa de *Dunaliella* sp. con diferentes organismos patógenos que afectan a *Litopenaeus vannamei*, como bacterias del tipo *Vibrio*.

VIII. LITERATURA CITADA

- Aguayo, D. 2009. Uso de probióticos y β -1,3/1,6-glucanos en la alimentación del camarón *Litopenaeus vannamei* como estrategia para incrementar la producción. Artículos de Tesis de Grado - FIMCBOR.
- Anaya-Rosas, R. E. y Bückle-Ramírez, L. F. 2012. Cultivo de *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) en un sistema con agua de mar recirculada, como alternativa a los cultivos semi-intensivos tradicionales. *BIOtecnia*. XIV. 3: 16-24.
- Andrade, A. J. 2011. Shrimp immunological reactions against WSSV: role of haemocytes on WSSV fate. Tesis de maestría. Universidad de Gante. 60 p.
- Armstrong, P. B. 2010. Role of α -2-macroglobulin in the immune responses of invertebrates. *Invertebrate Survival Journal*. 7: 165-180.
- Arredondo-Figueroa, J., L., Pedroza-Islas, R., Ponce-Palafox, J. T. and Vernon-Carter, E., J. 2003. Pigmentación del camarón blanco del pacífico (*Litopenaeus vannamei*, Boone 1931) con carotenoides de Chile (*Capsicum annuum*), esterificados y saponificados, en comparación con la astaxantina. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 2: 101-108.
- Berger, C. 2000. Aportes de la Bio-Tecnología a la Alimentación y a la Inmuno-Estimulación de Camarones peneidos. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Olvera-Novoa, M.A. y Civera-Cerecedo, R., (eds.). *Avances en Nutrición Acuícola. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. 19-22 Noviembre, 2000. Mérida, Yucatán.
- Becerra-Dórame, M. J., Martínez-Córdova, L. R, Martínez-Porchas, M., Hernández-López, J., López-Eliás, JA., Mendoza-Cano, F. 2012. Effect of using autotrophic and heterotrophic microbial-based-systems for the pre-grown of *Litopenaeus vannamei*, on the production performance and selected haemolymph parameters. *Aquaculture Research*. Article first published online: DOI: 10.1111/are.12033.
- Borowitzka, M. A. y Silva, C. J. 2007. The taxonomy of the genus *Dunaliella* (Chlorophyta, Dunaliellales) with emphasis on the marine and halophilic species. *Appl Phycol* 19: 567-590.
- Campa-Córdova, A., Hernández-Salmerón, A., Ascencio-Valle, F., Aguirre-Guzmán, A. 2010. Respuesta inmune y antioxidante en camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, expuesto

- a inmunoestimulantes y probióticos. En: Cruz-Suarez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J. (eds), Avances en Nutrición Acuícola-Memorias del Décimo Simposio Internacional de Nutrición Acuícola, 8-10 de Noviembre, San Nicolás de los Garza, N. L., México, 567-587 p.
- Chen, I. T., Aoki, T., Huang, Y. T., Hirono, I., Chen, T. C., Huang, J. Y., Chang, G. D., Lo, C. F., y Wang, H. C. 2011. White spot syndrome virus induces metabolic changes resembling the warburg effect in shrimp hemocytes in the early stage of infection. *Journal of Virology*. 24:12919-28.
- Cheng-Fang, C., Houg-Yung, C., Mao-Sen, S. y I-Chiu, L. 2000. Immunomodulation by dietary β -1, 3-glucan in the brooders of the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Fish & Shellfish Immunology*. 10: 505-514.
- Chew B.P. 1995. Antioxidant vitamins affect food animal immunity and health. *Journal of Nutrition*. 125:1804S-1808S.
- Cinfuentes, A.S., Gonzales, M., Parra, O. y Zuñiga, M. 1996. Cultivo de cepas de *Dunaliella salina* (Teodoresco 1905) en diferentes medios bajo condiciones de laboratorio. Facultad de ciencias naturales y oceanográficas, Universidad de Concepción. 69:105-112.
- Del Campo, J. A., García-González, M. y Guerrero, M. 2007. Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol*. 74:1163–1174.
- De-la-Re-Vega, E., García-Orozco, K., Calderón-Arredondo, S., Romo-Figueroa, M. y Yepiz-Plascencia, M. 2004. *Electronic Journal of Biotechnology*. 7: 295-301.
- Fagutao, F., Kondo, H., Aoki, T. y Hirono, I. 2011. Prophenoloxidase has a role in innate immunity in penaeid shrimp, pp. 171-176. *In* Bondad-Reantaso, M.G., Jones, J.B., Corsin, F. and Aoki, T. (eds.). *Diseases in Asian Aquaculture VII*. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Selangor, Malaysia. 385 p.
- FAO Fisheries and Aquaculture Department. *The State of World Fisheries and Aquaculture 2012*, FAO, Rome (2013).
- Figueroa-Pizano, M. D. 2013. Efecto de la bacteria de la necrosis hepatopancreática sobre la expresión de genes y respuesta inmune del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. Tesis de maestría Universidad de Sonora. 69 p.
- Fimbres-Olivarría, D. 2011. Crecimiento, biomasa y producción de carotenoides de *Dunaliella* sp. en concentraciones diferentes de nitrógeno. Tesis de maestría. Universidad de Sonora. 57 p.

- Flegel, T.W., Lightner, D.V., Lo, C.F. y Owens, L. 2008. Shrimp disease control: past, present and future, pp. 355-378. *In* Bondad-Reantaso, M.G., Mohan, C.V., Crumlish, M. and Subasinghe, R.P. (eds.). Diseases in Asian Aquaculture VI. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, Philippines. 505 p.
- Flores, M., Díaz, F., Medina, R., Re. A. R., y Licea, A. 2007. Physiological, metabolic and haematological responses in white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) juveniles fed diets supplemented with astaxanthin acclimated to low-salinity water. *Aquaculture research*. 38: 740-747.
- Galván-Álvarez, D. A. 2012. Efecto de la infección del virus de la necrosis infecciosa hipodérmica y hematopoyética (IHHNV) sobre diversos parámetros bioquímicos plasmáticos y hepatopancreáticos del camarón blanco (*Penaeus vannamei*). Tesis de Licenciatura. Universidad de Sonora. 54 p.
- Gollas-Galván, T., Hernández-López, J. y Vargas-Albores, F. 1997. Effect of Calcium on the Prophenoloxidase System Activation of the Brown Shrimp (*Penaeus californiensis*, Holmes). *Comp. Biochem. Physiol.* 117A: 419–425.
- Guillard, R.L. y J.H. Ryther. 1962. Studies on marine planktonic diatoms I. *Cyclotella nana* Husted and *Detonula confervacea* (Cleve). *Canadian Journal of Microbiology*, 8: 229-239.
- Gullian, M y Rodríguez, J. 2001. Estudio de las cualidades inmunoestimulantes de nuevas bacterias probióticas asociadas al cultivo de *Litopenaeus vannamei*. <http://www.dspace.espol.edu.ec/handle/123456789/8682>
- Gullian, M., Thompson, F. y Rodríguez, J. 2004. Selection of probiotic bacteria and study of their immunostimulatory effect in *Penaeus vannamei* *Aquaculture* 233:1-14.
- Hung-Hung, S., Hung-Jun, C., Cheng-Hao, H., Jen-Chang, C., y Yen-Ling, S. 1998. Phenoloxidase activity of hemocytes derived from *Penaeus monodon* and *Macrobrachium rosenbergii*. *Journal of invertebrate pathology*. 71: 26-33.
- Jiang, G. 2011. Can white spot syndrome virus be transmitted through the phytoplankton, rotifer, artemia, shrimp pathway?. *African Journal of Biotechnology*. 11: 1277-1282.
- Jin, E. y Melis, A. 2003. Microalgal Biotechnology: Carotenoid production by the green algae *Dunaliella salina*. Environmental Science Laboratory, Korea Ocean research and development institute. Ansan 8: 425-170.
- Lerche, W. 1937. Untersuchungen über Entwicklung und Fortpflanzung in der Gattung *Dunaliella*. *Arch f Protistenkd*, 88: 236-268.
- Li, F. y Xiang, J. 2013. Recent advances in researches on the innate immunity of shrimp in China. *Developmental and Comparative Immunology*. 39: 11–26

- Liu, B., Yu, Z., Song, X. y Guan. 2007. Studies on the transmission of WSSV (white spot syndrome virus) in juvenile *Marsupenaeus japonicus* via marine microalgae. *Journal of Invertebrate Pathology* 95: 87–92.
- Liu, H., Söderha, K. y Jiravanichpaisal, P. 2009. Antiviral immunity in crustaceans. *Fish & Shellfish Immunology* 27: 79–88
- MaBadhul, H., Kalai, P., Rajaram, R., Vignesh, R. y Srinivasan, M. 2012. Real time PCR quantification of WSSV infection in specific pathogen free (SPF) *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) exposed to antiviral nucleotide. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 1120-1129.
- Mai, W. J., y Wang, W. N. 2010. Protection of blue shrimp (*Litopenaeus stylirostris*) against the White Spot Syndrome Virus (WSSV) when injected with shrimp lysozyme. *FishShell fish Immunol.* 28: 727–733.
- Maldonado, M., Rodríguez, J. y De Blas, I. 2004. El camarón de cultivo frente al WSSV, su principal patógeno. *Revista AquaTIC*, 21: 78-91.
- Martínez-Córdova, L. R., Ezquerro-Brauer, M., Bringas-Alvarado, L., Aguirre-Hinojosa, E., Garza-Aguirre, MdelC., 2002. Optimización de alimentos y prácticas de alimentación en el cultivo de camarón en el Noroeste de México. In: Cruz-Suárez, L. E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Gaxiola-Cortés, M. G., Simoes, N. (Eds.). *Avances en Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 3 al 6 de Septiembre del 2002. Cancún, Quintana Roo, México.*
- Mathew, S., Kumar, K. A., Anandan, R., Nair, P. G., y Devadasan, K. 2007. Changes in tissue defense system in white spot syndrome virus (WSSV) infected *Penaeus monodon*. *Comp. Biochem. Physiol.* 145: 315-320.
- 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). *Aquaculture Research*, 29: 579–585.
- Morales-Covarrubias, M. S., Ruiz-Luna, A., Moura-Lemus, A. y Solís-Montiel, A. 2011. Prevalencia de enfermedades de camarón blanco (*litopenaeus vannamei*) cultivado en ocho regiones de Latinoamérica. *Revista Científica, FCV-LUZ / Vol. XXI, N° 5: 434 - 446,*
- Moser, J. R., Galván, D. A., Mendoza, F., Encinas, T., Coronado, D., Portillo, G., Risoleta, M., Magallón, F. J. y Hernández, L. 2012. Water temperature influences viral load and detection of White Spot Syndrome Virus (WSSV) in *Litopenaeus vannamei* and wild crustaceans. *Aquaculture*, (326-329) 9–14.
- Olmos, J., Paniagua, J. y Contreras, R. 2000. Molecular identification of *Dunaliella* sp. utilizing the 18S rDNA gene. *Letters in Applied Microbiology.* 30:80-84p.

- Oren, A. 2005. A hundred years of *Dunaliella* research: 1905–2005. The Hebrew University of Jerusalem, Jerusalem, Israel.
- Pacheco, M., Campa, A., Aguirre, G., Luna, A., Guzmán, M. y Ascencio, F. 2012. Efecto de *Debaryomyces hansenii* en la respuesta antioxidante de juveniles de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. Revista MVZ Córdoba. 17: 2820-2826.
- Pascual, C, Sánchez, A., C. Rosas. 2007. Manual de métodos para la evaluación de componentes sanguíneos de camarones peneidos. Edición y elaboración de 50 compact disc por parte de COLCIENCIAS de Colombia y la Corporación Centro de Investigación de la Acuicultura de Colombia.
- Pascual, C., Arena, L., Cuzon, G., Gaxiola, G., Taboada, G., Valenzuela, D. y Rosas, C. 2004. Effect of a size-based selection program on blood metabolites and immune response of *Litopenaeus vannamei* juveniles fed different dietary carbohydrate levels Aquaculture 230: 405-416.
- Pascual, C., Gaxiola, G. y Rosas, C. 2003. Blood metabolites and hemocyanin of the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*: the effect of culture conditions and a comparison with other crustacean species. Marine Biology. 142: 735–745.
- Pisal D.S. y S.S. Lele. 2005. Carotenoid production from microalga, *Dunaliella salina*. Indian Journal of Biotechnology, 4:476-483.
- Ponce-Palafox, J.T., J.L. Arredondo Figueroa y E.J. Vernon Carter. 2006. Carotenoids from plants used in diets for the culture of the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Revista Mexicana de Ingeniería Química, 5: 157-165.
- Rao, R.A., R. Sarada, Baskaran, V. y Ravishankar. G. A. 2006. Antioxidant Activity of *Botryococcus braunii* Extract Elucidated in Vitro Models. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54:4593-4599.
- Rendón, L. y Balcázar, J. L. 2003. Inmunología de camarones: Conceptos básicos y recientes Avances. Revista AquaTIC, n° 19, pp. 27-33. (Disponible el 27/02/2013 en URL: <http://www.revistaaquatic.com/aquatic/art.asp?t=p&c=158>).
- Rodríguez, J., Cedeño, R., Molina, C., Otero, V., Valenzuela, E. y Sotomayor, M.A., 2000. Efecto de la calidad de la dieta sobre la respuesta inmune del camarón *Penaeus vannamei*. In: Cruz -Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Olvera-Novoa, M.A. y Civera-Cerecedo, R. , (Eds.). Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 19-22 Noviembre, 2000. Mérida, Yucatán, Mexico.
- Rosas, C., Cuzon, G., Gaxiola, G., Le-Priol, Y., Pascual, C., Rossignol, J., Contreras, F., Sanchez, A., y Van-Wormhoud, A. 2001. Metabolism and growth of juveniles of

- Litopenaeus vannamei*: effect of salinity and dietary carbohydrate levels. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 25: 1–22.
- Rosas, C., Pascual, C., López, N., Sánchez, A., 2002. Metabolitos sanguíneos como herramientas para evaluar el estado nutricional de camarones peneidos. En: Cruz-Suárez, L. E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Gaxiola-Cortés, M. G., Simoes, N. (Eds.). *Avances en Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. 3 al 6 de Septiembre del 2002. Cancún, Quintana Roo, México.
- Roux, M., Pain, A., Klimpel, K. y Dhar, A. 2002. The Lipopolysaccharide and β -1,3-Glucan Binding Protein Gene Is Upregulated in White Spot Virus-Infected Shrimp (*Penaeus stylirostris*). *Journal of Virol.* 76:7140-7149.
- Sánchez, A., Pascual, C., Sánchez, A., Vargas-Albores, F., Le Moullac, G. y Rosas, C. 2001. Hemolymph metabolic variables and immune response in *Litopenaeus setiferus* adult males: the effect of acclimation. *Aquaculture* 198:13-28.
- Sánchez-Paz, A. 2010. White spot syndrome virus: an overview on an emergent concern. *Veterinary Research* 41: 41-43.
- Sánchez-Paz, A., García-Carreño, F., Hernández-López, J., Muhlia-Almazán, A., y Yepiz-Plascencia, G. 2007. Effect of short-term starvation on hepatopancreas and plasma energy reserves of the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 340:184-193.
- Sarathi, M., Ishaq Ahmed, V. P., Venkatesan, C., Balasubramanian, G., Prabavathy, J. y Sahul Hameed, A. S. 2007. Comparative study on immune response of *Fenneropenaeus indicus* to *Vibrio alginolyticus* and white spot syndrome virus. *Aquaculture* 271: 8-20
- Shariati, M. y Reza M. 2011. Microalgal biotechnology and bioenergy in *Dunaliella*. sp. 483-501. En: Carpi, A. (eds), *Progress in molecular and environmental bioengineering from analysis and modeling to technology applications*. In tech, Iran.
- Sritunyalucksana, K., Sithisarn, P., Withayachumnarnkul, B, y Flegel, T. 1999. Activation of prophenoloxidase, agglutinin and antibacterial activity in haemolymph of the black tiger prawn, *Penaeus monodon*, by immunostimulants. *Fish & Shellfish Immunology*, 9: 21–30.
- Subashini, A., Sethi, S., y Revathi, K. 2012. Effect of immunostimulant on enhancement of the immune response of Kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus* and its resistance against white spot syndrome virus (WSSV). *e-planet* 9: 23-30.

- Sudheer N. S., Philip, R. y Singh, B. 2012. Anti-white spot syndrome virus activity of Ceriops tagal aqueous extract in giant tiger shrimp *Penaeus monodon*. Arch Virol. 157:1665-1675.
- Tapia-Salazar, M., Ricque-Marie, D., Nieto-López, M., y L. E. Cruz.Suárez. 2008. Uso de pigmentos de la flor de cempasúchil (*Tagetes erecta*) como aditivo en alimentos para camarón *L. vannamei*. 492-513 pp. Ed: L. Elizabeth Cruz Suárez, Denis Ricque Marie, Mireya Tapia Salazar, Martha G. G. Nieto López, Davila A. Villarreal Cavazos, Juan Pablo Lazo y Ma. Teresa Viana. Avances en Nutrición Acuícola IX. IX Simposio Internacional de Nutrición Acuícola. 24-27 Noviembre. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México.
- Valencia-Yáñez, R. 2010. El papel de la proteína de estrés térmico (hsp70) en la infección del camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) con el virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV). Tesis de Maestría, Universidad Autónoma de Baja California. 75 p.
- Vargas, F., Higuera, I., Jiménez, F., Hernández, J., Gollas, T. y Yepiz, G. 1996. Posibilidades de inmunoestimulación del camarón a través del alimento. Avances en Nutrición Acuícola III. Memorias del Tercer Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 433-439.
- Vargas-Albores, F. y Yepiz-Plascencia, G. 2000. Beta glucan binding protein and its role in shrimp immune response. Aquaculture 191:13-21.
- Vargas-Albores, F., Guzmán A., y Ochoa, J. L. 1993. An anticoagulant solution for haemolymph collection and prophenoloxidase studies of penaeid shrimp (*Penaeus californiensis*). Comp. Biochem. Phys, 106:299-303
- Vargas-Albores, F., Hernández-López, J., Gollas-Galván, T., Montaña-Pérez, K., Jiménez-Vega, F. y Yepiz-Plascencia, G. 1998. Activation of shrimp cellular defense functions by microbial products. In Flegel TW (ed) Advances in shrimp biotechnology. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok.
- Wu, W., Wang, L. y Zhang, X. 2005. Identification of white spot syndrome virus (WSSV) envelope proteins involved in shrimp infection. Virology. 332: 578-583.
- Yeh, S. P., Chen, Y. N., Hsieh, S. L., Cheng, W. and Liu, C. H. 2009. Immune response of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, after a concurrent infection with white spot syndrome virus and infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus. Fish & Shellfish Immunology. 26: 582-588.
- Yi, G., Wang, Z., Qi, Y., Yao, L., Qian, J. and Hu, L. 2004. Vp28 of Shrimp White Spot Syndrome Virus Is Involved in the Attachment and Penetration into Shrimp Cells. Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 37:726-734.

Ynske, P. M., Meer-Janssen, V. D., Galen, J. V., Batenburg, J. J., y Helms, J. B. 2010. Lipids in host-pathogen interactions: Pathogens exploit the complexity of the host cell lipidome. Progress in lipid research. 49:1-26.

