



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS  
DEL NOROESTE, S.C.

---

Programa de Estudios de Posgrado

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 EL CAMARÓN BLANCO *Litopenaeus vannamei*.

## **T E S I S**

Que para obtener el grado de

### **Maestro en Ciencias**

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

P r e s e n t a

**Leopoldo Flores Leyva**

**La Paz, B.C.S., 14 de Julio de 2006**

**Tesis de Maestría en Ciencias en el Uso, Manejo y Preservación de los Recursos  
Naturales con Orientación en Acuicultura.**

**Leopoldo Flores Leyva**

**COMITÉ TUTORIAL**

Director de Tesis: Dr. Roberto Civera Cerecedo

Co-tutor: Dr. Felipe Ascencio Valle

Co-tutor: Dr. Angel I. Campa Córdova

**COMISIÓN REVISORA**

Dr. Roberto Civera Cerecedo

Dr. Felipe Ascencio Valle

Dr. Angel I. Campa Córdova

**MIEMBROS DEL JURADO DE EXAMEN**

Dr. Roberto Civera Cerecedo

Dr. Felipe Ascencio Valle

Dr. Angel I. Campa Córdova

Suplente: Dra. María Antonia Guzmán Murillo

## **DEDICATORIA**

A mi dios por darme paz espiritual

A la memoria de mi padre Leopoldo Flores López

A mi madre por apoyarme en todo momento

A mis hermanos Carmen Alicia, Diana Beatriz y Fabian Humberto por su apoyo moral

A mi esposa Gisela por darle sentido a mi vida

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para la realización de este proyecto.

Al CIBNOR a través del Programa de Posgrado por apoyarme en la realización de este trabajo.

A mi director de Tesis el Dr. Roberto Civera Cerecedo por su apoyo, amistad y paciencia durante el desarrollo de este trabajo.

A mis asesores Dr. Felipe Ascencio Valle y Dr. Angel Campa Córdova por su apoyo y ayuda en la revisión de este documento.

Al Laboratorio de Nutrición Acuícola, especialmente a Ernesto Goytortúa Bores por su apoyo incondicional durante la fabricación de los alimentos.

Al Laboratorio de Patogénesis Microbiana especialmente a la chula, por su gran apoyo durante las determinaciones enzimáticas.

Al Centro de Ciencias de Sinaloa y a la Dra. Martha Zarain Hezberg por su apoyo brindado durante la estancia, en la realización del reto viral.

Al Laboratorio de Sanidad Acuícola del Centro de Ciencias de Sinaloa, y a los técnicos que nos apoyaron durante la realización del experimento con el virus WSSV, Isabel, Rosario, Rodolfo, Juanito y al compa Nacho.

A la Cooperativa Tres Amigos del Tetúan Navolato, Sinaloa por habernos donado los organismos experimentales.

A Sonia Rocha Meza y Dolores Rondero Astorga por su apoyo en los Análisis Químicos Proximales.

Al Laboratorio de Ecofisiología de Organismos Acuáticos, por apoyarnos en el bioensayo del reto bacteriano.

Al Laboratorio de Histología e Histoquímica y a Eulalia y Carmen Rodríguez por su apoyo en la realización de los cortes histológicos.

Al laboratorio de Nutrición Experimental y a Sandra de la Paz y Carlos Ceceña por su apoyo durante el bioensayo de crecimiento y mantenimiento de los organismos.

Al Laboratorio de Bioquímica Fisiológica y a Roberto Hernández por su apoyo en la cuantificación de pigmentos.

A Camilo Pohlenz...gracias mi compa tu sabes lo que esas tres palabras significan para un sinaloense.

A Wences por su apoyo y amistad.

A mi compañero Alejandro Ramos por su amistad y siempre apoyo incondicional.

A Horacio Cabrera por compartir sus teorías evolutivas y su honesta amistad.

A Martita Reyes por su apoyo moral.

A mis compañeros de laboratorio Carlos Angulo, Mauricio y Claudia.

A todos mis compañeros de generación.

Y a todos los que no mencioné.....muchas gracias.

## Resumen

Las enfermedades virales y bacterianas han afectado en gran escala los cultivos de camarón en todo el mundo, provocando grandes pérdidas económicas. Como prevención de infecciones producidas por el virus del Síndrome de la Mancha Blanca (WSSV) y la bacteria *Vibrio harveyi* en el cultivo de peneidos, se han utilizado inmunoestimulantes de diferente composición química como lipopolisacáridos (LPS), péptidoglucanos, beta-glucanos y pigmentos carotenoides, cuya función principal es activar los sistemas de bio-defensa en peneidos. Sin embargo, no existen tratamientos efectivos para controlar la incidencia de WSSV y *V. harveyi*, por esta razón, se requieren evaluar aditivos alimentarios que funcionen como inmunoestimulantes, y que permitan prevenir las infecciones provocadas por estos patógenos. El objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto de la utilización de 3 pigmentos carotenoides, el  $\beta$ -caroteno, zeaxantina y astaxantina, a dos niveles de inclusión en el alimento (50 y 100 mg/kg), sobre la supervivencia, el crecimiento, la utilización del alimento, y la respuesta inmune de juveniles de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. No se encontraron diferencias significativas de crecimiento ponderal, tasa de crecimiento, supervivencia, factor de conversión alimenticia, y conteo total de hemocitos entre ninguno de los tratamientos alimenticios. Se encontró una disminución significativa en la actividad enzimática de superóxido dismutasa (SOD) y catalasa en músculo y hepatopáncreas a los treinta días de administrar los pigmentos a las concentraciones de 50 y 100 mg/kg. En el reto viral con WSSV, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos alimenticios con pigmentos carotenoides, aunque el alimento con  $\beta$ -caroteno permitió obtener una supervivencia ligeramente mayor a las 72 hrs. post-infección (70%) con respecto al control (50%). El análisis histopatológico en el reto viral muestra un daño severo en los camarones de todos los tratamientos, observándose necrosis y cuerpos de inclusión intranuclear en el órgano linfoide, glándula antenal, epitelio cuticular, intestino posterior y branquias. En el reto realizado con *V. harveyi*, se obtuvo una mayor supervivencia con el tratamiento de  $\beta$ -caroteno (80%) respecto al control (30%). La producción de anión superóxido ( $O_2^-$ ) en hemocitos fue significativamente mayor con los alimentos que contienen  $\beta$ -caroteno, zeaxantina y astaxantina, respecto al control positivo. El análisis histopatológico de los organismos alimentados con  $\beta$ -caroteno durante el reto bacteriano, reveló una disminución en la formación de nódulos y granulomas en los diferentes tejidos y órganos evaluados. En base a los resultados obtenidos bajo las condiciones experimentales empleadas en el presente trabajo, no se considera que el uso de pigmentos carotenoides en el alimento sea una alternativa viable para la prevención de infecciones causadas por el virus de la mancha blanca (WSSV), ya que los camarones de todos los tratamientos presentaron 80% de mortalidad a las 120 hrs. postinfección. El uso de  $\beta$ -caroteno a una concentración de 100 mg/kg en el alimento durante 15 días bajo condiciones de cultivo intensivo en laboratorio, no afectó el crecimiento del camarón, pero sí mejoró el sistema de defensa antioxidante (SOD y Catalasa), provocó un aumento de la producción de anión superóxido, y mejoró la supervivencia de *L. vannamei* durante un proceso infectivo con *V. harveyi*, por lo que puede ser considerado como una alternativa en la prevención de infecciones causadas por esta bacteria.

Palabras clave: Pigmentos carotenoides, síndrome del virus de la mancha blanca (WSSV), *Vibrio harveyi*, *Litopenaeus vannamei*.

## Abstract

Viral and bacterial diseases have affected in great scale the shrimp cultures all over the world, causing great economic losses. In order to prevent infections produced by the White Spot Syndrome Virus (WSSV) and the bacteria *Vibrio harveyi* in penaeid cultures, immunostimulants of different chemical composition, like, lipopolysaccharides (LPS), peptidoglycan,  $\beta$ -glucan and carotenoid pigments have been used. The role of the immunostimulants is to activate the bio-defense systems in penaeids. To our knowledge, no effective treatments to control the incidence of WSSV and *V. harveyi* has been reported, therefore it is needed to find a solution to prevent the infections caused by these pathogens. The objective of the present study was to determine the effect of 3 carotenoid pigments,  $\beta$ -carotene, zeaxanthin and astaxanthin, at two dietary levels (50 and 100 mg/kg), on growth, feed utilization, and immune response of juveniles of white shrimp *Litopenaeus vannamei*. No significant differences in weight, growth rate, survival, feed conversion ratio, and total haemocytes count were found between dietary treatments. A significant decrease in superoxide dismutase (SOD) and Catalase activity in muscle and hepatopancreas, after thirty days of administration of the pigments at the two inclusion levels (50 and 100) mg/kg was found. During the viral challenge with WSSV, shrimp fed the diet containing  $\beta$ -carotene showed slightly higher survival at 72 hrs. post-infection (70%) compared to those fed the control diet (50%), nevertheless, no significant differences were found among treatments. Histopathological analysis revealed a severe damage in shrimp from all treatments, characterized by necrosis and intranuclear inclusion bodies in lymphoid organ, antennal gland, cuticular epithelium, posterior intestine and gills. In the challenge with *V. harveyi*, shrimp fed the  $\beta$ -carotene diet had greater survival rate (80%) than those fed the control diet (30%). Anion superoxide production ( $O_2^-$ ) in haemocytes was significantly higher in shrimp fed diets containing  $\beta$ -carotene, zeaxanthin and astaxanthin, than in those of the positive control. Histopathological analysis of organisms fed the  $\beta$ -carotene diet during the bacterial challenge, revealed a diminution in the formation of nodules and granulomas in the different tissues and organs evaluated. Based on the results obtained here under the experimental conditions, the use of carotenoid pigments in the diet is not considered a reliable alternative to prevent white spot syndrome virus (WSSV) infection, since all treatments caused 80% mortality at 120 hrs. post-infection. The use  $\beta$ -carotene at the inclusion level of 100 mg/kg in the diet during 15 days under intensive culture conditions in the laboratory, did not affect shrimp growth, but improved antioxidant defense system (SOD and Catalase), superoxide anion production, and survival in juvenile *L. vannamei* challenged against *V. harveyi*. It is concluded that  $\beta$ -carotene can be considered as an alternative in the prevention of infections caused by *V. harveyi*.

Key words: Carotenoids pigments, white spot syndrome virus (WSSV), *Vibrio harveyi*, *Litopenaeus vannamei*.

## Índice General

<b>Dedicatoria</b> .....	i
<b>Agradecimientos</b> .....	ii
<b>Resumen</b> .....	iv
<b>Abstract</b> .....	v
<b>Índice General</b> .....	vi
<b>Índice de Figuras</b> .....	ix
<b>Índice de Tablas</b> .....	xi
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>II. ANTECEDENTES</b>	
2.1 Enfermedades infecciosas en peneidos.....	4
2.1.1 Infecciones producidas por el virus del síndrome de la Mancha Blanca (WSSV).....	6
2.1.2 Infecciones producidas por bacterias patógenas.....	7
2.2 Sistema inmune del camarón.....	8
2.2.1 Defensas antioxidantes de crustáceos.....	11
2.3 Inmunoestimulantes.....	11
2.4 Pigmentos carotenoides.....	12
2.4.1 $\beta$ -caroteno.....	13
2.4.2 Zeaxantina.....	14
2.4.3 Astaxantina.....	14
<b>III. JUSTIFICACIÓN</b> .....	16
<b>IV. OBJETIVOS</b> .....	18
4.1 Objetivo general.....	18
4.2 Objetivos particulares.....	18
<b>V. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	
5.1 Pigmentos carotenoides.....	19
5.2 Análisis químicos de pigmentos.....	19
5.3 Formulación y fabricación de alimentos.....	20
5.4 Análisis químicos proximales de alimentos.....	21
5.5 Extracción y cuantificación de carotenoides totales.....	21
5.6 Hidroestabilidad de alimentos.....	22
5.7 Experimento 1. Efecto de $\beta$ -caroteno, zeaxantina, y astaxantina, a dos niveles de inclusión en el alimento, sobre el crecimiento, la utilización del alimento y la respuesta inmune de juveniles de <i>L. vannamei</i> .	
5.7.1 Organismos experimentales.....	23
5.7.2 Sistema de cultivo, diseño experimental y condiciones de cultivo.....	23
5.7.3 Criterios de evaluación de crecimiento y utilización del alimento.....	27
5.7.4 Detección de actividad enzimática y de respuesta inmune.....	29
5.7.5 Determinación de proteína soluble en músculo y hepatopáncreas.....	29
5.7.6 Actividad Catalasa (CAT) (E.C. 1.11.1.7).....	30
5.7.7 Actividad Súper Óxido Dismutasa (SOD) (E.C. 1.15.1.1).....	31
5.7.8 Conteo total de hemocitos (CTH).....	32

5.8 Experimento 2. Evaluación de la capacidad de los carotenoides para prevenir la infección del virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV) en camarón blanco.	
5.8.1 Análisis por PCR para la detección de WSSV.....	33
5.8.2 Obtención de camarones libres de WSSV.....	33
5.8.3 Elaboración del inóculo con WSSV.....	34
5.8.4 Organismos experimentales.....	34
5.8.5 Sistema de cultivo.....	35
5.8.6 Diseño experimental y condiciones de cultivo.....	35
5.8.7 Determinación de la dosis letal media DL <sub>50</sub> .....	36
5.8.8 Bioensayo de inmunestimulación.....	37
5.8.9 Reto viral.....	37
5.8.10 Análisis histopatológico.....	38
5.9 Experimento 3. Evaluación de la capacidad de los carotenoides para prevenir la infección producida por <i>V. harveyi</i> .	
5.9.1 Organismos experimentales.....	39
5.9.2 Elaboración del inóculo con <i>Vibrio harveyi</i> .....	40
5.9.3 Sistema de cultivo, diseño experimental y condiciones de cultivo.....	40
5.9.4 Determinación de la dosis letal media DL <sub>50</sub> .....	42
5.9.5 Reto bacteriano.....	42
5.9.6 Anión super óxido.....	43
5.9.8 Análisis estadísticos.....	44
<b>VI. RESULTADOS</b>	
6.1 Experimento 1. Efecto de β-caroteno, zeaxantina, y astaxantina, a dos niveles de inclusión en el alimento, sobre el crecimiento, la utilización del alimento y la respuesta inmune de juveniles de <i>L. vannamei</i> .	
6.1.1 Composición química de los alimentos.....	45
6.1.2 Parámetros zootécnicos.....	48
6.1.3 Proteína soluble.....	49
6.1.4 Actividad Catalasa en músculo y hepatopáncreas.....	50
6.1.5 Actividad SOD en músculo y hepatopáncreas.....	53
6.1.6 Conteo total de hemocitos (CTH).....	55
6.2 Experimento 2. Evaluación de la capacidad de los carotenoides para prevenir la infección del virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV) en camarón blanco.	
6.2.1 Dosis letal media (DL <sub>50</sub> ).....	56
6.2.2 Reto viral con WSSV.....	57
6.2.3 Conteo total de hemocitos (CTH).....	58
6.2.4 Proteína plasmática.....	59
6.2.5 Análisis histopatológico.....	61
6.3 Experimento 3. Evaluación de la capacidad de los carotenoides para prevenir la infección producida por <i>V. harveyi</i> .	
6.3.1 Determinación de la dosis letal media (DL <sub>50</sub> ).....	64
6.3.2 Reto con <i>Vibrio harveyi</i> .....	65
6.3.3 Proteína plasmática.....	66

6.3.4 Actividad SOD en hemocitos.....	66
6.3.5 Anión súper óxido (O <sub>2</sub> <sup>-</sup> ).....	68
6.3.6 Conteo total de hemocitos (CTH) y tiempo de coagulación.....	68
6.3.7 Análisis histopatológico.....	69
<b>VII. DISCUSIÓN</b>	
7.1 Efecto de β-caroteno, zeaxantina y astaxantina, a dos niveles de inclusión en el alimento, sobre el crecimiento, la utilización del alimento y la respuesta inmune de juveniles de <i>L. vannamei</i> .....	73
7.2 Evaluación de la capacidad de los carotenoides para prevenir la infección del virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV) en camarón blanco.....	77
7.3 Evaluación de la capacidad de los carotenoides para prevenir la infección producida por <i>V. harveyi</i> .....	79
<b>VIII. CONCLUSIONES</b> .....	86
<b>IX. RECOMENDACIONES</b> .....	87
<b>X. LITERATURA CITADA</b> .....	88

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Proteína soluble en músculo y hepatopáncreas de camarón <i>L. vannamei</i> a los 15 (M15 y HP15) y 30 (M30 y HP30) días de ser alimentados con alimentos que contenían 50 y 100 (mg/kg) de $\beta$ -caroteno, zeaxantina y astaxantina.....	49
Figura 2. Proteína soluble en músculo de camarón <i>L. vannamei</i> a los 15 y 30 días (M15 y M30) y en hepatopáncreas a los 15 y 30 días (HP15 y HP30) de ser alimentados con alimentos que contenían 50 y 100 (mg/kg) de $\beta$ -caroteno, zeaxantina y astaxantina.....	50
Figura 3. Actividad catalasa en músculo (A) de camarón <i>L. vannamei</i> a los 15 y 30 días (M15 y M30) y hepatopáncreas (B) a los 15 y 30 días (HP15 y HP30) de ser alimentados con alimentos que contenían 50 y 100 (mg/kg) de $\beta$ -caroteno, zeaxantina y astaxantina.....	51
Figura 4. Efecto en el tiempo de alimentación con pigmentos sobre la actividad catalasa en músculo de camarón <i>L. vannamei</i> entre los 15 y 30 días (A) y hepatopáncreas entre 15 y 30 días (B) de ser alimentados con alimentos que contenían 50 y 100 (mg/kg) de $\beta$ -caroteno, zeaxantina y astaxantina.....	52
Figura 5. Actividad Superóxido Dismutasa en músculo (A) de camarón <i>L. vannamei</i> a los 15 y 30 días (M15 y M30) y hepatopáncreas (B) a los 15 y 30 días (HP15 y HP30) de ser alimentados con alimentos que contenían 50 y 100 (mg/kg) de $\beta$ -caroteno, zeaxantina y astaxantina.....	53
Figura 6. Actividad Super Oxido Dismutasa en músculo de camarón <i>L. vannamei</i> a los 15 y 30 días (A) y hepatopáncreas a los 15 y 30 días (B) de ser alimentados con alimentos que contenían 50 y 100 (mg/kg) de $\beta$ -caroteno, zeaxantina y astaxantina.....	54
Figura 7. Efecto del nivel de concentración de $\beta$ -caroteno, zeaxantina y astaxantina en el conteo total de hemocitos a los treinta días del experimento.....	55
Figura 8. Curvas de supervivencia de <i>L. vannamei</i> infectados con cuatro diluciones (1:5, 1:50, 1:500, 1:5000) del virus de la mancha blanca (WSSV).....	56
Figura 9. Curvas de supervivencia de <i>L. vannamei</i> infectados con una dilución 1:100 del virus de la mancha blanca (WSSV), previamente alimentados durante 15 días con alimentos conteniendo $\beta$ -caroteno, zeaxantina y astaxantina.....	57
Figura 10. Conteo Total de Hemocitos obtenidos en organismos de <i>L. vannamei</i> , a partir del 50 % de supervivencia, infectados con una dilución 1:500 con el virus de la mancha blanca (WSSV), previamente alimentados durante 15 días con alimento conteniendo $\beta$ -caroteno, zeaxantina y astaxantina.....	59

Figura 11. Concentración de proteína plasmática a las 72 horas post-infección con el virus de la mancha blanca (WSSV).....	60
Figura 12. Cortes histológicos longitudinales de <i>L. vannamei</i> infectados con WSSV.....	63
Figura 13. Curvas de supervivencia de <i>L. vannamei</i> infectados con cinco dosis conteniendo <i>Vibrio harveyi</i> .....	64
Figura 14. Curvas de supervivencia de <i>L. vannamei</i> infectados con una dosis de $9.2 \times 10^5$ ufc/camarón de <i>V. harveyi</i> , previamente alimentados durante 15 días con alimento conteniendo $\beta$ -caroteno, zeaxantina y astaxantina.....	65
Figura 15. Concentración de proteína plasmática a las 48 y 144 horas post-infección con una dosis de $8 \times 10^6$ ufc/mL de <i>V. harveyi</i> .....	67
Figura 16. Actividad SOD en hemocitos a las 48 y 144 horas post-infección con una dosis de $8 \times 10^6$ ufc/mL de <i>V. harveyi</i> .....	67
Figura 17. Producción de anión súper oxido ( $O_2^-$ ) en hemocitos a las 48 y 144 horas post-infección con una dosis de $8 \times 10^6$ ufc/mL de <i>V. harveyi</i> .....	68
Figura 18. Conteo total de hemocitos (CTH) a las 48 y 144 horas post-infección con una dosis de $8 \times 10^6$ ufc/mL de <i>V. harveyi</i> .....	69
Figura 19. Cortes longitudinales de cefalotórax de <i>L. vannamei</i> infectados con <i>V. harveyi</i> .....	72

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición de los alimentos (g/100 g alimento) para medir crecimiento, utilización del alimento y la respuesta inmune con $\beta$ -caroteno, zeaxantina, y astaxantina, a dos niveles de inclusión 50 y 100 mg/kg.....	25
Tabla 2. Composición de la premezcla de vitaminas.....	26
Tabla 3. Composición de la premezcla de minerales.....	26
Tabla 4.- Composición química de los pigmentos comerciales.....	45
Tabla 5. Composición química proximal del alimento control.....	46
Tabla 6. Estabilidad en el agua de los alimentos utilizados para evaluar crecimiento, utilización del alimento y respuesta inmune.....	46
Tabla 7. Concentración de carotenoides totales en los alimentos utilizados para evaluar crecimiento, utilización del alimento y respuesta inmune.....	47
Tabla 8. Resultados zootécnicos de juveniles de camarón <i>L. vannamei</i> alimentados durante 30 días con diferentes tipos de pigmentos a dos concentraciones (50 y 100 mg/kg).....	48
Tabla 9. Efecto de carotenoides en la supervivencia de <i>L. vannamei</i> frente a un reto viral con viral (WSSV).....	58
Tabla 10. Características observadas en hemolinfa y hemocitos en organismos en fase terminal infectados con el virus de la mancha blanca (WSSV).....	60
Tabla 11. Nivel de infección generado por el WSSV en órganos y tejidos de <i>L. vannamei</i> .....	62
Tabla 12. Supervivencia obtenida en <i>L. vannamei</i> retados con <i>V. harveyi</i> .....	66
Tabla 13. Tiempo de coagulación de hemolinfa de <i>L. vannamei</i> a las 0, 48 y 144 horas post-infección con <i>Vibrio harveyi</i> .....	70
Tabla 14. Nivel de infección generado por el <i>V. harveyi</i> en órganos y tejidos de <i>L. vannamei</i> .....	71

## 1. INTRODUCCIÓN

El cultivo de camarón es una actividad en crecimiento (FAO, 2004) y está reemplazando rápidamente a las pesquerías tradicionales como proveedores de camarón a los mercados, y se ha estimado que las granjas podrían contribuir hasta el 50% de la demanda global para la próxima década (Jory, 1998; Rosenberry ,1999). La producción mundial de camarón por acuicultura para el año 2002 fue de 1, 292,476 toneladas métricas (FAO, 2004). Para México se reporta una producción de camarón por acuicultura de 62, 361 toneladas métricas (SAGARPA, 2003), siendo el Noroeste del país la región donde se encuentran el 97% de las granjas de camarón, considerándose como una de las zonas productoras de camarón mas importantes de Latinoamérica (Páez-Osuna *et al.*, 2003).

Uno de los problemas más graves que afecta el cultivo de camarón en las unidades de producción son las altas mortalidades causadas por enfermedades (Lightner, 1996; Otta *et al.*, 2001), las cuales están asociadas a problemas con la degradación del ambiente y enfermedades infecciosas provocadas por virus, bacterias, hongos y parásitos (Guzmán y Ascencio, 2000), aumentando el riesgo por la intensificación de cultivos (Bacherè, 2000) y el uso regular de antibióticos, que ha conducido a poblaciones de patógenos a adquirir resistencia (Espinosa *et al.*, 2002) afectando la sustentabilidad y la economía de la industria acuícola (Muñoz *et al.*, 2000).

Los problemas virales para los cuales no existe la alternativa de los antibióticos y bacterianos, donde los antibióticos además de contaminar el medio ambiente son

asimilados en poco tiempo (resistencia) por las bacterias, han incrementado el interés en implementar estrategias de prevención mediante inmunoestimulación (Tian *et al.*, 2003). Actualmente no existen tratamientos efectivos para controlar la incidencia viral, por esta razón lo que se pretende es encontrar la manera de prevenir la infección de agentes virales (Guohua *et al.*, 2003).

Los crustáceos tienen un sistema inmune no-específico. Esta característica biológica les confiere una desventaja bajo condiciones de cultivo, especialmente en la camaronicultura, ya que son susceptibles a los ataques de patógenos, ocasionando altas mortalidades y grandes pérdidas económicas, esto ha originado gran interés por diversos investigadores y el sector productivo. Considerando que no se pueden generar vacunas contra patógenos específicos de las diversas especies de camarón, por carecer estos de memoria inmunológica, se están buscando alternativas para controlar las epizootias registradas en los cultivos por agentes virales, bacterias, hongos y parásitos. Una alternativa viable que se está explorando es el uso de inmunoestimulantes (Tian *et al.*, 2003).

Se han utilizado una gran cantidad de compuestos químicos como inmunoestimulantes, siendo considerados los más importantes los lipopolisacáridos, los beta-glucanos, los peptidoglucanos y recientemente los pigmentos carotenoides, los cuales además de su función como antioxidantes, han mostrado poder mejorar el sistema de defensa no-específico celular y humoral de peces y crustáceos, confiriéndoles resistencia, contra un espectro amplio de patógenos. Además, los pigmentos carotenoides incluidos en dietas balanceadas como aditivos, pueden presentar una gran ventaja sobre otros utilizados

para el mismo fin, como los antibióticos ya que no contaminan el medio y no producen residuos tóxicos.

En el presente trabajo se evaluó el efecto de los pigmentos  $\beta$ -caroteno, zeaxantina y astaxantina, a dos niveles de inclusión (50 y 100 mg/kg) en el alimento, sobre el crecimiento, utilización del alimento y la respuesta inmune del camarón *Litopenaeus vannamei*, así como la supervivencia de éste al ser retado contra infecciones producidas por el virus de la mancha blanca (WSSV) y la bacteria *Vibrio harveyi*.

## II. ANTECEDENTES

### 2.1 Enfermedades infecciosas en peneidos

El estudio de las enfermedades de los crustáceos es reciente, por lo que en muchas de ellas se desconoce el agente causal. Por otro lado, se ha demostrado ampliamente que la incidencia de enfermedades depende del tipo de sistema de cultivo empleado, ya que mientras más alta es la densidad de siembra, mayor es el riesgo y por ende, aumentarán los problemas para el desarrollo de la industria acuícola (Lightner, 1996).

Aparentemente los virus y las bacterias son los patógenos más importantes en los cultivos marinos, en cuanto a su dificultad de erradicación. Actualmente se conocen aproximadamente una docena de enfermedades virales de los camarones peneidos, tanto en cultivo como en la naturaleza. De éstas, a algunas se les reconoce por tener un impacto significativo en los laboratorios de producción y granjas de camarón en América, como lo son el *Baculovirus penaei* (BP), Virus de la Infección Hipodermal y Necrosis Hematopoyética (IHHNV), el Parvovirus Hepatopáncreático (HPV), el Virus del Síndrome del Taura (TSV) y el Virus del Síndrome de la Mancha Blanca (WSSV por sus siglas en inglés: White Spot Syndrome Virus; Lightner, 1996<sup>a</sup> y 1996<sup>b</sup>). No obstante, existen otros virus en proceso de evaluación en las Américas: Virus Cabeza Amarilla (YHV), Reo-like virus (REO-III) y Enfermedad Viral de la Vacualización del Órgano Linfoide (LOVV) (Lightner, 1996b), que afectan a los camarones peneidos americanos *L. vannamei* y *L. stylirostris*. Otro virus, un iridovirus, se encuentra presente en *Protrachypene prepicua*,

camarón peneido de poca importancia económica. Sin embargo no es claro si este virus representa o no una amenaza de enfermedad para *L. vannamei* y *L. stylirostris*.

Además de las etiologías virales, durante la última década los cultivos de camarones peneidos ha enfrentado problemas ligados a enfermedades infecciosas como la vibriosis generada por *Vibrio harveyi*, *V. dansela*, *V. alginolyticus*, *V. parahemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. fluvialis*, *V. tubiashi*, *V. nereis*, *V. anguillarum* y *V. penaeicida* (Song *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 1996; Lightner, 1996; Liu *et al.*, 1996; Guzmán y Ascencio, 2000). La vibriosis es el mayor problema que enfrentan los peces marinos y una gran diversidad de invertebrados marinos (Egidius, 1987; Lightner, 1988). También se han reportado patologías conocidas como la enfermedad bacteriana filamentosa, causadas por *Leucothrix mucor*, *Thiothrix sp.*, *Flexibacter sp.*, *Cytophaga sp.*, y *Flavobacterium sp.* La Hepatopáncreatitis Necrotizante, causada por especies de una *alfa-Proteobacteria*, la enfermedad bacteriana quitinolítica, causada por *Benekea spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Aeromonas spp.*, y *Spirillum spp.*, la mycobacteriosis, causada por *Mycobacterium peregrinum*, *M. marinum* y *M. sp.*, las infecciones rickettsiales, causadas por organismos tipo *Rickettsia*, la micosis larval, fusariosis, protozoarios (epi y endocomensales), ciliados, gregarinas, haplosporidiosis y microsporidiosis (Guzmán y Ascencio, 2000).

### 2.1.1 Infecciones producidas por el virus de la mancha blanca

La enfermedad causada por el WSSV ha afectado enormemente los cultivos de camarón (Jory, 1999). En Asia y Sudamérica, se han registrado mortalidades que oscilan entre el 80 y 100% en periodos de 2-10 días después de haberse iniciado la infección, lo cual ha originado la atención de investigar el sistema inmune del camarón, pero hasta el momento no se han reportado factores de resistencia al virus (Tian *et al.*, 2003). Este síndrome viral conocido como white spot syndrome virus (WSSV) es causado por un virus fusiforme, cuyos viriones miden aproximadamente 70-150 nm por 275-380 nm de longitud (Lightner, 1996). El genoma es una cadena doble de ADN (dsADN), la cual presenta una longitud estimada de 150 kpb. Wang *et al.*, (1995) en base en las características morfológicas y su estructura genómica define al WSSV como miembro del género NOB (Non-Occluded Baculovirus) de la subfamilia Nudibaculovirinae de Baculoviridae. Actualmente esta ubicado en la familia Nimaviridae del género Whispovirus (ICTV, 2005).

El WSSV es un virus altamente patogénico con mortalidades que oscilan entre el 80 y 100 % de 1-2 días de infección (Nakano *et al.*, 1994). Los signos de la enfermedad causada por este virus se caracterizan por la disminución en el consumo del alimento, por una coloración rojiza de urópodos y pleópodos, expansión de cromatóforos, natación errática y letargia (Lightner 1996). Las infecciones naturales por WSSV han sido reportadas en diversas especies de peneidos comerciales como *P. monodon*, *P. chinensis*, *P. japonicus*, *P. indicus*, *P. merguensis* y *P. setiferus* (Lo *et al.*, 1999). Se describió primeramente en el noroeste de Asia en 1992-93 y rápidamente se observó su dispersión a otros países, principalmente en Indonesia, Taiwán, Vietnam, Malasia, India y Estados

Unidos, siendo en este el primer reporte en el hemisferio occidental en Noviembre de 1995 en granjas de cultivo de *Penaeus setiferus* en el sur de Texas (Lightner, 1996). En enero de 1999, se detecta en cultivos de granjas en Nicaragua, Guatemala y Honduras (Jory, 1999). Unzueta-Bustamante (2001), reporta la presencia del virus en México en julio de 1999. La ineficacia en el control de enfermedades virales ha generado la necesidad de buscar alternativas para que en el futuro, poder erradicar el establecimiento de virus en los sistemas de cultivo (Tian *et al.*, 2003).

### **2.1.2 Infecciones producidas por bacterias patógenas**

Las especies patogénicas de vibrio, producen enterotoxinas, hemolisinas, citotoxinas, proteasas, lipasas, fosfolipasas, sideroforos, factores de adhesión y hemaglutininas los cuales actúan como factores de virulencia. Son bacterias Gram (-), con forma de bastones curvos o rectos, móviles por uno o más flagelos, oxidasa positivos, crecen en agar TCBS y son anaerobios facultativos (Zhang y Austin, 2005). *Vibrio harveyi* es un habitante natural de los ambientes marinos y esta asociado a tejidos específicos (superficies, órganos blanco o intestinos) de animales marinos (Baumann *et al.*, 1971), infectando a distintas especies de invertebrados marinos (Egidius, 1987; Lightner, 1988) dentro de los cuales destacan los crustáceos (Song, *et al.*, 1993; Lee, *et al.*, 1996; Lightner, 1996; Liu, *et al.*, 1996; Guzmán y Ascencio, 2000). En Venezuela se reporta que *V. harveyi* ha generado altas mortalidades en cultivos de peces y peneidos desde 1993 (Alvarez *et al.*, 1998). Para disminuir los niveles de incidencia y prevalecencia generados por etiologías virales e infecciones bacterianas, una posible alternativa podría ser la prevención, mediante la aplicación de compuestos que mejoren la respuesta inmune y el estatus nutricional, como

los  $\beta$ -glucanos, lipopolisacáridos (Song y Huang 2000), polisacáridos sulfatados (Campa-Córdova *et al.*, 2002), y pigmentos carotenoides como el  $\beta$ -caroteno, zeaxantina y astaxantina (Merchie *et al.*, 1998; Liñan-Cabello *et al.*, 2003; Hertrampf y Piedad-Pascual, 2000). Los pigmentos carotenoides aumentan la actividad lisosima, la fagocitosis y la citotoxicidad inespecífica en la trucha arcoiris *Oncorhynchus mykiss* (Amar *et al.*, 2001) y mejoran la respuesta inmune celular en el ave zebra *Taeniopygia guttata* (Kevin *et al.*, 2004).

## **2.2 Sistema inmune del camarón**

El sistema innato de defensa presente en todos los animales multicelulares está conformado por elementos celulares y humorales (Beck y Habicht 1996). El sistema inmune de los invertebrados se diferencia del sistema inmune de los vertebrados principalmente por la ausencia de moléculas del tipo inmunoglobulina y células linfoides. El sistema de defensa de los invertebrados como los crustáceos, está basado en efectores celulares y humorales, los cuales se conjugan para eliminar microorganismos potencialmente infecciosos (Smith y Chisholm, 1992; Lavine y Strand, 2002). Los hemocitos son cruciales en estas reacciones inmunitarias siendo capaces de realizar fagocitosis, encapsulación, formación de nódulos y de citotoxicidad (Lavine and Strand, 2002; Söderhäll y Cerenius, 1992; Johanson *et al.*, 2000; LeMoullac y Haffner, 2000) constituyendo la fracción celular de la hemolinfa. En los crustáceos la circulación es abierta y la hemolinfa es un análogo de la sangre y la linfa de los vertebrados. Esta baña los tejidos, denominándose hemocele a los sitios donde ella circula. La hemolinfa presenta un

color azul verdoso a causa de la hemocianina, proteína respiratoria abundante en la hemolinfa de todos los crustáceos (Rendón y Balcázar 2003).

Los procesos de defensa celular más eficientes contra patógenos son la fagocitosis, encapsulación, células mediadas citotóxicas y la coagulación (Söderhäll y Cerenius, 1992; Johanson *et al.*, 2000; LeMoullac y Haffner, 2000). Los factores de defensa humoral como las proteínas de coagulación, aglutininas (lectinas), enzimas hidrolíticas y péptidos antimicrobianos son producidos por los hemocitos y actúan en conjunto con las células de defensa para eliminar patógenos del hospedero (Smith y Chisholm, 1992; Montaña-Pérez *et al.*, 1999; Bacherè *et al.*, 2000; Deustoumieux *et al.*, 2000; Sritunyalucksana y Söderhäll, 2000; Papagianni, 2003). La cutícula es una estructura rígida que sirve como barrera física, además de que puede contener factores antimicrobianos que pueden ser considerados como sistema de defensa externo. La primera y esencial línea de defensa interna en el reconocimiento de agentes patógenos está mediada por los hemocitos y proteínas plasmáticas (Vargas-Albores y Yepiz-Plascencia, 2000). El sistema inmune de invertebrados reconoce una gran cantidad de grupos de patógenos, representados por patrones moleculares de fijación más que por estructuras finas y específicas para un microbio en particular. Se han descrito varios tipos de proteínas a las cuales se les ha denominado proteínas de reconocimiento (PRPs). Estas proteínas reconocen carbohidratos de las paredes celulares de microorganismos, como lipopolisácaridos (LPS) péptidos-glucanos de las bacterias o  $\beta$ -glucanos de hongos (Vargas-Albores, 1996). Algunas lectinas pueden actuar directamente como aglutininas u opsoninas. Después de la unión de las proteínas de reconocimiento (PRPs) con el componente microbicida un segundo sitio

celular es activado y éste es el que desencadena la activación de los hemocitos hacia la degranulación de proteínas de defensa (Vargas-Albores y Yepiz-Plascencia, 2000). Después de la detección del material extraño, los hemocitos migran al sitio de invasión por un proceso de quimiotaxis, los cuales al tener un sistema circulatorio abierto demandan una rápida y eficiente defensa donde las cascadas proteolíticas juegan un papel relevante. Los hemocitos están involucrados en la síntesis, almacenamiento, activación y descarga de proenzimas y substratos para la coagulación y cascadas de la profenoloxidasa (proPO) (Sritunyalucksana y Söderhäll, 2000).

Para identificar y clasificar los hemocitos se han utilizado diferentes criterios morfológicos, antigénicos y funcionales. Básicamente, se han descrito tres tipos hemocitarios, los hemocitos hialinos (H), que no poseen gránulos y tienen capacidad fagocítica e intervienen en la coagulación; los hemocitos semigranulosos (SG), con abundantes gránulos, intervienen en la fagocitosis, encapsulación y en la liberación del sistema proPO (melanización). Además, ellas sintetizan y liberan peneidinas, péptidos antimicrobianos y los hemocitos granulosos (G) cargados de gránulos, que almacenan las enzimas que constituyen el sistema proPO en los crustáceos a un nivel más alto que los semigranulosos. Estas enzimas son liberadas por exocitosis cuando estos hemocitos son estimulados por la peroxinectina y la proteína fijadora de  $\beta$ -glucanos. Al igual que los hemocitos SG, ellos sintetizan y almacenan peneidinas, e intervienen además en el mecanismo de encapsulación (Vargas-albores, 1998; Song y Huang, 2000; Rendón y Balcázar 2003).

### **2.2.1 Defensas antioxidantes de crustáceos**

Los hemocitos responden a diferentes estímulos, liberando radicales libres (Homblad y Söderhall, 1999), los cuales son definidos como moléculas que presentan electrones no apareados en su órbita externa, son generalmente inestables y altamente reactivos (Fang *et al.*, 2002). Dentro de estos radicales libres se encuentran tanto las especies reactivas de oxígeno (EROs), como los óxidos de nitrógeno (Arumugan *et al.*, 2000; Gourdon *et al.*, 2001; Nappi *et al.*, 2000; Toreilles y Guérin, 1999; Weiske y Weisner, 1999). Dentro de los EROs se agrupan los iones radicales superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y radicales hidroxilo (OH), estas especies reactivas son formadas durante el metabolismo oxidativo celular (Fukuhara *et al.*, 2002). Tanto los EROs como las especies reactivas de nitrógeno son utilizadas en la destrucción de material extraño (Homblad y Söderhall, 1999; Muñoz *et al.*, 2000; Campa-Córdova *et al.*, 2002).

### **2.3 Inmunoestimulantes**

Los inmunoestimulantes son compuestos químicos que pueden activar las células linfoides en peces, aves y mamíferos y hemocitos en crustáceos, los cuales aumentan la resistencia del hospedero a infecciones causadas por virus, bacterias, hongos y parásitos (Raa, 2000). Las sustancias inmunoestimulantes tienen la cualidad de alertar al sistema inmune no específico de manera directa ó indirecta y son por regla general extraídas de las paredes de microorganismos, como bacterias Gram negativas (lipopolisacáridos) bacterias Gram positivas (péptidoglicanos), de hongos, levaduras y algas ( $\beta$ -glucanos) (Song y Huang, 2000), de bacterias, levaduras, algas y plantas superiores, pigmentos carotenoides (Menasveta, 1993). En años recientes, los inmunoestimulantes han sido usados para

aumentar la resistencia de camarones contra bacterias e infecciones virales (Sung, 1994). Los pigmentos carotenoides como el  $\beta$ -caroteno, zeaxantina y astaxantina, además de su importancia en la pigmentación de diversas especies, se ha demostrado que pueden mejorar la respuesta inmune de crustáceos (Merchie *et al.*, 1998). Existe una gran variedad de pigmentos carotenoides pero solo unos pocos son utilizados en acuicultura (astaxantina y cataxantina) (Hertrampf y Piedad-Pascual 2000). Los organismos acuáticos no pueden sintetizar carotenoides *de novo* (Tanaka *et al.*, 1976), por lo que dependen totalmente de lo que pueda contener en su alimento natural o artificial (Meyers y Latscha 1997), lo cual sugiere que es necesario incluir los pigmentos carotenoides en el alimento balanceado para los organismos en cultivos semi-intensivos e intensivos.

#### **2.4 Pigmentos carotenoides**

Los carotenoides se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza en plantas y animales y, son producidos por todas las plantas y microorganismos fotosintéticamente activos (Lee, 1975). Actualmente se han identificado aproximadamente 600 carotenoides naturales siendo los mas comunes: fucoxantina, luteína, violaxantina, neoxantina,  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno, zeaxantina, licopeno, capsantina, bixina, criptoxantina y astaxantina (Tafoya y García-Hernández 1993) de los cuales el 10 % son precursores de la vitamina A. Químicamente son descritos como lipocromos solubles en grasas, con tonalidades amarillos-rojos de origen vegetal y son clasificados en carotenos sin oxígeno ( $\alpha$ -carotenos,  $\beta$ -caroteno,  $\gamma$ -caroteno y licopeno) y con oxígeno (astaxantina, cataxantina, criptoxantina y zeaxantina). Estos pigmentos son los responsables de la coloración de diversos tejidos como yema de huevos, músculo rosado de salmones, exoesqueleto de camarones y plumaje

rosa de los flamings, entre otros. Para ciertos animales cultivados en granjas (pollo, salmón y truchas) el alimento ha sido fortificado con carotenoides específicos para obtener un color natural específico en el animal. Existe una gran variedad de pigmentos carotenoides pero solo unos pocos son utilizados en acuicultura (astaxantina y cataxantina) (Hertrampf y Piedad-Pascual 2000). Mediante el metabolismo, los carotenoides pueden ser convertidos en otros pigmentos, esterificarse, saponificarse, unirse a proteínas o glicéridos. Los carotenoides predominantes en salmónidos son la astaxantina y la cataxantina, los cuales provienen principalmente del zooplancton del medio silvestre, mientras que para los crustáceos, los pigmentos provienen principalmente de las algas. Algunos crustáceos son capaces de depositar directamente astaxantina en sus tejidos y pueden transformar el  $\beta$ -caroteno y zeaxantina en astaxantina (Menasveta, 1993). Los carotenoides son tóxicos en dosis elevadas siendo la  $DL_{50}$  por encima de 1000 mg/kg variando según la especie y la vía de administración. Son sensibles a la luz, el calor y el oxígeno (Chien y Jeng, 1992).

#### **2.4.1 $\beta$ -caroteno**

El  $\beta$ -caroteno ( $C_{40}H_{56}$ ) o  $\beta,\beta$ -caroteno (IUPAC por sus siglas en inglés: International Union of Pure and Applied Chemistry), es el más ampliamente distribuido y abundante carotenoide en la naturaleza (Liaaen-Jensen *et al.*, 2001). Además de su importancia como un precursor de la vitamina A, el  $\beta$ -caroteno, ha sido caracterizado como un agente antioxidante (Burton y Ingold 1984; Lim *et al.*, 1992; Matsushita *et al.*, 2000). Es un buen secuestrador de radicales en condiciones de baja presión de oxígeno y pierde su capacidad antioxidante en altas presiones de oxígeno mostrando propiedades autocatalíticas produciendo un efecto prooxidante (Burton y Ingold 1984). Mejora el sistema inmune

innato de la trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) aumentando la actividad lisosima y la citotoxicidad de (Amar *et al.*, 2001). Se ha reportado que ayudan en la protección del desarrollo gonadal de la langosta *Cherax quadricarinatus* neutralizando los radicales libres y evitando la peroxidación de lípidos (Sagi *et al.*, 1995) y de *Litopenaeus vannamei* (Liñan-Cabello *et al.*, 2003).

#### **2.4.2 Zeaxantina**

La zeaxantina ( $C_{40}H_{56}O_2$ ) o  $\beta,\beta$ -caroteno-3,3'-diol (IUPAC), se encuentra principalmente en prochlorophytas, cianobacterias, algas verdes, crisofitas, rodofitas y plantas superiores en general (Jeffrey *et al.*, 1997). Pertenece al grupo de las xantofilas, las cuales administradas en las dietas han mostrado generar respuesta inmune celular (fitohemaglutinación) en machos del ave zebra *Taeniopygia guttata* (McGraw y Ardia 2004), reducen la peroxidación de fosfolípidos (Lim *et al.*, 1992; Matsushita *et al.*, 2000), es precursor de vitamina A, en trucha arcoiris y pollos (Schiedt *et al.*, 1985) y en *Tilapia nilotica* (Katsuyama *et al.*, 1988). Los productores de salmónidos utilizan comúnmente cataxantina y astaxantina, debido a que la zeaxantina tarda más en absorberse y transportarse a los tejidos (Guillou *et al.*, 1992).

#### **2.4.3 Astaxantina**

La astaxantina ( $C_{40}H_{52}O_4$ ) o 3,3-dihidroxi- $\beta,\beta$ -caroteno-4,4'-diona (IUPAC). Es un oxycarotenoide derivado del  $\beta$ -caroteno, y consiste de una larga cadena de carbonos poli-insaturada con grupos funcionales tanto al inicio como al final de la cadena con tres isómeros ópticos (3S,3'S; 3S,3'R y 3R,3'R) (Jeffrey *et al.*, 1997: Coral-Hinostroza y

Bjerkeng 2002). En el caso de los crustáceos y los salmónidos, el pigmento primario de la coloración rojo-rosada es la astaxantina, aunque existen más de 20 carotenoides que han sido identificados, como es el caso de la cantaxantina, la luteína, el  $\beta$ -caroteno y la zeaxantina, entre otros. Entre las funciones que se le atribuyen a la astaxantina en crustáceos son; camuflaje, reproducción, protección de membranas celulares, antioxidante intracelular, mejoramiento de respuesta inmunológica y reserva de oxígeno intracelular. Tiene la habilidad de quelatar sustancias tóxicas (radicales libres), incrementa la tolerancia al estrés (Menasveta, 1993), inhibe la peroxidación lipídica mitocondrial, es donador de oxígeno en ambientes donde la presión parcial de oxígeno es extremadamente baja (huevo, células con rápido crecimiento y estanques con grandes cantidades de sedimentos), lo que permite un buen desarrollo de postlarvas y juveniles de camarón en cultivo bajo condiciones estresantes (Chien y Jeng, 1992). Los crustáceos son incapaces de sintetizar astaxantina, por lo cual, dependen de una adecuada ingestión. En el caso particular de los camarones, son capaces de oxidar y convertir el  $\beta$ -caroteno, la zeaxantina y otros pigmentos intermedios en astaxantina. Sin embargo, la proporción molecular necesaria de cada uno de los carotenoides para obtener una molécula de astaxantina es extremadamente alta, por lo cual es un proceso metabólicamente ineficiente (Storebakken y Austreng 1987). La astaxantina en crustáceos se encuentra de forma libre (sin esterificar), esterificada (unida a un ácido graso o dos) o cualquiera de las dos formas anteriores (libre o esterificada) asociada a proteínas formando carotenoproteínas y carotenolipoproteínas (coloración en crustáceos) (Storebakken y Austreng, 1987; Menasveta, 1993).

### III. JUSTIFICACIÓN

El desarrollo de la industria camaronera en México se ha realizado principalmente en la vertiente del Pacífico, sobre todo en el estado de Sinaloa y Sonora, donde funcionan aproximadamente 150 granjas comerciales (INEGI 1999a,b), principalmente bajo el esquema semi-intensivo. El desarrollo de esta actividad presenta una serie de ventajas como son: ubicarse en la franja tropical y subtropical, condiciones ambientales adecuadas para el cultivo de la mayoría de las especies comerciales de camarón *L. vannamei*, *L. stylirostris* y *Farfantapenaeus californiensis*, pero aún fuera de estas franjas se pueden cultivar especies tropicales durante una época del año (Martínez-Córdova *et al.*, 2002). Las posibilidades de comercialización son mucho más favorables que para otros productores, principalmente los ejidales, quienes tienen que invertir en la transportación del producto. Estas ventajas para desarrollar la camaronicultura no están siendo aprovechadas al 100 %, debido a varios factores tales como: adquisición de reproductores del medio natural sanos, producción de postlarva libre de patógenos, disponibilidad de alimento vivo y artificial que cubra los requerimientos nutricionales, cultivo exclusivo de *L. vannamei* el cual es difícil de cultivar en temporadas invernales. Además, el establecimiento de monocultivos intensivos o semi-intensivos y prácticas inadecuadas en el manejo de sistemas de producción, repercute en que los diferentes patógenos ataquen con mayor facilidad los cultivos de camarón. Los virus y las bacterias son los patógenos que mayor daño causan a los cultivos de camarón (Lightner, 1996). El virus WSSV, actualmente está ocasionando epizootias que repercuten en graves pérdidas económicas que van desde el 50 al 100 % de la inversión total en la mayoría de los cultivos (Jory, 1999; Lightner 1996; Tian *et al.*, 2003). El sistema inmune

de *L. vannamei* juega un papel importante en la defensa contra diferentes enfermedades, sobre todo bajo condiciones de cultivo (Vargas-Albores 1996). Deficiencias nutricionales resultan en fuertes condicionantes de supresión de diversas funciones inmunes celulares y humorales que son fundamentales para proteger eficientemente a un organismo contra infecciones bacterianas o virales (Rengipat *et al.*, 1998). Por tal razón, es necesario evitar deficiencias nutricionales que disminuyan la maquinaria de defensa de los organismos. Una alternativa para la camaronicultura, es evaluar y emplear aditivos alimentarios que mejoren el estatus nutricional e inmunológico como los pigmentos carotenoides (Meyers y Latscha, 1997). No existen trabajos que demuestren con claridad que el  $\beta$ -caroteno, la zeaxantina y la astaxantina mejoren la resistencia del camarón a las infecciones de WSSV y *V. harveyi*. Con base a lo anterior, se plantea la hipótesis de que la inclusión de los pigmentos carotenoides  $\beta$ -caroteno, zeaxantina o astaxantina como aditivos en la dieta tendrá un efecto benéfico sobre el sistema inmune de juveniles del camarón *Litopenaeus vannamei*, confiriéndoles una mayor resistencia contra agentes patógenos como el virus de la mancha blanca WSSV y la bacteria *Vibrio harveyi*.

## IV. OBJETIVOS

### Objetivo General

Evaluar el efecto de la inclusión de carotenoides en el alimento sobre la respuesta inmune del camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*).

### Objetivos particulares

1. Determinar el efecto de  $\beta$ -caroteno, zeaxantina y astaxantina, a dos niveles de inclusión en el alimento, sobre el crecimiento, la utilización del alimento y la respuesta inmune de juveniles de *L. vannamei*.
2. Evaluar la capacidad del  $\beta$ -caroteno, zeaxantina y astaxantina para prevenir la infección del virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV) en juveniles de *L. vannamei*.
3. Evaluar la capacidad del  $\beta$ -caroteno, zeaxantina y astaxantina para prevenir infecciones producidas por *V. harveyi*.

## V. MATERIALES Y MÉTODOS

Los trabajos experimentales se realizaron en los Laboratorios de Nutrición Acuícola, Patogénesis Microbiana y Ecofisiología de Organismos Acuáticos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C., (CIBNOR) ubicado a 17 km. de la ciudad de La Paz, Baja California Sur, México y en el Laboratorio de Sanidad Acuícola del Centro de Ciencias de Sinaloa (CCS), en Culiacán, Sinaloa, México.

### 5.1 Pigmentos carotenoides

Los pigmentos se obtuvieron con la casa comercial correspondiente; 500 g de Hi-Zea (zeaxantina), con una concentración de 30 g activos/kg, de los cuales el 70% es zeaxantina, 10% luteína, 20% otros (clorofilas, flavonoides y productos de degradación) vehiculizado en aceite de soya, proporcionados por la empresa Industrial Orgánica Monterrey N.L., México; 5 g de  $\beta$ -caroteno (C-9750) al 95% de pureza adquiridos en SIGMA INC; 50 g de Florafil AX (2% de astaxantina), con una concentración de 20 g/kg, vehiculizada en ácido oleico, proporcionados por la compañía Productos Deshidratados de México S.A. de C.V. Los Mochis, Sinaloa, México.

### 5.2 Análisis químicos de pigmentos

Se realizaron análisis químicos de los pigmentos por triplicado, en el Laboratorio de Análisis Químicos Proximales del CIBNOR: Humedad (A.O.A.C., 1995, No. 930.15), extracto etéreo (A.O.A.C., 1995, No. 920.39) y cenizas (A.O.A.C., 1995, No. 942.05).

### 5.3 Formulación y fabricación de alimentos.

Se formularon alimentos compuestos para camarón con la ayuda del paquete MIXIT-Win<sup>MR</sup> (Agricultural Software Consultants, Inc., San Diego, Ca, USA). Para la fabricación de los alimentos se siguió la metodología empleada por Civera y Guillaume (1989). Se fabricó un alimento base (control) de acuerdo a los requerimientos nutricios reportados para el camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (Akiyama 1991), al cual se le adicionaron tres pigmentos carotenoides ( $\beta$ -caroteno, zeaxantina o astaxantina) a dos niveles de inclusión 50 y 100 mg/kg (Tabla 1), obteniéndose un total de siete alimentos (seis experimentales y un control). 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 pudieran afectar la composición final del alimento, en el laboratorio de Nutrición Acuícola del CIBNOR, fueron tamizados todos los ingredientes sólidos a través de un tamiz de 250  $\mu$ m. En la planta de alimentos del CIBNOR se mezclaron los macroingredientes (harina de pescado, pasta de soya, harina integral de trigo y gluten de trigo) y los microingredientes (premezcla de vitaminas, premezcla de minerales, cloruro de colina, vitamina C y fosfato dibásico de sodio) en una mezcladora (KITCHEN AID<sup>MR</sup>) durante 20 minutos. 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 pigmento carotenoide correspondiente ( $\beta$ -caroteno, zeaxantina, y astaxantina). Se mezclaron los ingredientes secos con la emulsión durante 10 minutos y posteriormente se adicionó agua aproximadamente al 40 % de del peso total de la masa del alimento. La masa obtenida fue extruída en tres ocasiones en un molino de carne (TOR-REY<sup>MR</sup> Monterrey, N.L., México) obteniendo pelets de 2 mm de

diámetro, los cuales fueron cortados manualmente y secados a 40 °C en un estufa con flujo de aire (VWR 1680 HAFO SERIES) determinando la humedad periódicamente en una termobalanza (OHAUS MB200) hasta obtener aproximadamente un 8% de humedad en cada alimento. Para proteger a los pigmentos de la luz, los alimentos se empaquetaron en bolsas negras de plástico, etiquetadas y almacenadas en refrigeración (4 °C) hasta su uso.

#### **5.4 Análisis químicos proximales de alimentos**

Los análisis químicos proximales de los alimentos experimentales se llevaron a cabo como se indica en la sección 5.2.

#### **5.5 Extracción y cuantificación de carotenoides totales**

Se molieron 10 g de alimento de los diferentes alimentos y se pesó, pesó un gramo de cada uno para colocarlos en tubos de vidrio a los que se les adicionaron 5 mL de acetona. Se dejaron reposar 24 horas a 5 °C, cubiertos con papel aluminio y se centrifugaron a 4000 rpm durante 15 minutos a 5 °C (Vidussi *et al.*, 1996). Los extractos se filtraron a través de una membrana de vidrio de 0.45 µm de poro y el volumen se recuperó en tubo Eppendorf, al cual se le agregaron 0.1 g de sulfato de potasio, se agitó vigorosamente y se centrifugó a 4000 rpm durante 5 minutos a 5 °C. Se recuperó el sobrenadante y se colocó en una celda de cuarzo de 0.5 mL para leer la absorbancia a 460 nm en un espectrofotómetro UV/VIS (Spectrophotometer Beckman DU-640). Para realizar los cálculos de carotenoides totales se preparó una solución stock con β-caroteno (99% de pureza) a partir de una concentración de 1 mg/mL, realizando una curva patrón utilizando la pendiente y la ordenada al origen para determinar la concentración.

## 5.6 Hidroestabilidad de alimentos

Se pesaron 2 g de cada alimento, por triplicado y se colocaron en un matraz 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 filtró con la ayuda de una bomba de vacío, a través de un papel filtro Whatman No.1, previamente secado y pesado. El papel filtro con el alimento residual se secó en una estufa con flujo de aire a 70 °C por 24 horas. La fórmula utilizada para determinar la estabilidad de la muestra en el agua, calculada como porcentaje de materia retenida, es la siguiente:

$$\% MSR = \frac{PSAR}{PSAI} \times 100$$

%MSR = Porcentaje de materia seca residual

PSAR = Peso seco del alimento residual

PSAI = Peso seco del alimento inicial

## **5.7 Experimento 1. Efecto de $\beta$ -caroteno, zeaxantina, y astaxantina, a dos niveles de inclusión en el alimento, sobre el crecimiento, la utilización del alimento y la respuesta inmune de juveniles de *L. vannamei*.**

### **5.7.1 Organismos experimentales.**

Se obtuvieron 4,000 postlarvas (PL15) de *L. vannamei* provenientes de cuatro familias del laboratorio de Biogenética del CIBNOR. Los organismos se aclimataron en dos tanques circulares de 1,500 L y 1.7 m<sup>2</sup> con 2,000 postlarvas por tanque dentro del Laboratorio de Nutrición Experimental del CIBNOR a 27 °C y alimentados con alimento para camarón Salt Creek (Salt Lake City, UT, U.S.A.), 54% de proteína y calamar fresco. Posteriormente, se molió alimento peletizado comercial para camarón PIASA 40% de proteína y se tamizó a 850  $\mu$ m para ir sustituyendo gradualmente el alimento Salt Creek y el calamar fresco. Se estuvo realizando mantenimiento diario, recambio de agua 50%, se retiraba alimento no consumido, muertos y mudas hasta alcanzar tallas con peso promedio de 0.5 g con los que se realizó el bioensayo de crecimiento.

### **5.7.2 Sistema de cultivo**

El sistema de cultivo utilizado para llevar a cabo las evaluaciones biológicas del experimento 1 consistió de 48 tanques de fibra de vidrio con capacidad de 60 L (34 x 55 x 38 cm), dentro de un sistema que cuenta con agua de mar filtrada a 5 micras, a través de un sistema de filtros de arena de 70 micras (Cristal<sup>F10</sup>), cartuchos de 50 y 10 micras y luz UV (Pentair Aquaculture<sup>TM</sup> El Monte CA, USA). La aireación del agua se llevó a cabo por mangueras de aireación alimentadas con un soplador de 4.8 HP (Boldov®) y la temperatura

del agua fue controlada por calentadores sumergibles de 300 W (EBO-JAGER). La iluminación del sistema experimental se hizo con focos de 40 w controlados por un Timer manteniendo una fotofase entre 8:00 AM y 8:00 PM constante durante los experimentos.

De los tanques de aclimatación se pesaron individualmente juveniles de *L. vannamei* y se seleccionaron 480 organismos con un peso entre 0.4 y 0.5 g, distribuyéndose aleatoriamente en 42 acuarios a razón de 10 organismos por acuario. Para evaluar el crecimiento y la respuesta inmune se diseñaron 7 alimentos isoproteicos, isolipídicos e isocalóricos:

Control: Sin pigmentos carotenoides

BC-50: Alimento con 50 mg/kg de  $\beta$ -caroteno.

BC-100: Alimento con 100 mg/kg de  $\beta$ -caroteno.

HZ-50: Alimento con 50 mg/kg de zeaxantina.

HZ-100: Alimento con 100 mg/kg de zeaxantina.

AX-50: Alimento con 50 mg/kg de astaxantina.

AX-100: Alimento con 100 mg/kg de astaxantina.

Cada uno de los siete alimentos fue asignado aleatoriamente a 6 acuarios (sextuplicado). El primer día se les suministró alimento a razón del 10% de la biomasa total por acuario y se ajustó posteriormente en función del consumo diario, procurando mantener un excedente de alimento en cada acuario. Se realizaron dos biometrías de los organismos cada 15 días, donde todos los organismos se pesaron individualmente en una balanza

OHAUS<sup>MR</sup> con una precisión de ( $\pm 0.01$  g), eliminando lo mejor posible el exceso de agua con papel absorbente.

**Tabla 1. Composición de los alimentos (g/100 g alimento) para medir crecimiento, utilización del alimento y respuesta inmune con  $\beta$ -caroteno, zeaxantina, y astaxantina, a dos niveles de inclusión 50 y 100 mg/kg.**

<b>Ingredientes (BH)</b>	<b>Control</b>	<b>BC-50</b>	<b>BC-100</b>	<b>HZ-50</b>	<b>HZ-100</b>	<b>AX-50</b>	<b>AX-100</b>
Harina de pescado <sup>1</sup>	20.00	20.00	20.00	20.00	20.00	20.00	20.00
Pasta de soya <sup>2</sup>	25.00	25.00	25.00	25.00	25.00	25.00	25.00
Harina integral de trigo <sup>3</sup>	38.91	38.906	38.895	38.86	38.83	38.856	38.906
Gluten de trigo <sup>4</sup>	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00
Ácido algínico <sup>5</sup>	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
Premezcla de vitaminas <sup>6</sup>	1.80	1.80	1.80	1.80	1.80	1.80	1.80
Premezcla de minerales <sup>7</sup>	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
Cloruro de colina <sup>8</sup>	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
Vitamina C <sup>9</sup>	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09
Fosfato dibásico de sodio <sup>10</sup>	1.20	1.20	1.20	1.20	1.20	1.20	1.20
Colesterol <sup>11</sup>	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
Aceite de hígado de bacalao <sup>12</sup>	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00
Aceite de girasol <sup>13</sup>	1.30	1.30	1.30	1.10	0.90	1.10	0.80
Lecitina de soya <sup>14</sup>	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50
BHT <sup>15</sup>	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004
$\beta$ -caroteno <sup>16</sup>	0.00	0.0053	0.0105	0.00	0.00	0.00	0.00
Zeaxantina <sup>17</sup>	0.00	0.00	0.00	0.2380	0.4760	0.00	0.00
Astaxantina <sup>18</sup>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.25	0.50

BH = Base húmeda. <sup>1</sup> Harina de pescado HP0312, <sup>2</sup> Pasta de soya PS0312, <sup>3</sup> Harina integral de trigo HIT0312, <sup>4</sup> Gluten de trigo GT0107-1, <sup>5</sup> Ácido algínico (Sigma A-7128), <sup>6</sup> y <sup>7</sup> La composición de las premezclas de vitaminas y minerales se muestran en las tablas 2 y 3 respectivamente, <sup>8</sup> Cloruro de colina (<2004 Cloco62), <sup>9</sup> Vitamina C (Stay-C 35% a.a.), <sup>10</sup> Fosfato dibásico de Na (<2004 Sigma S-0876), <sup>11</sup> Colesterol (2004 Sigma C-8503), <sup>12</sup> Aceite hígado de bacalao AcHB0312-1, <sup>13</sup> Aceite girasol AcGir0401, <sup>14</sup> Lecitina soya LS0303, <sup>15</sup> BHT (<2004 ICN101162), <sup>16</sup>  $\beta$ -caroteno (bcaro0410 Sigma C-9750), <sup>17</sup> Pigmento Hi-Zea HZ0409 (Industrial Orgánica, Monterrey, N.L.) y <sup>18</sup> Astaxantina Ax0408-1 (Productos Deshidratados de México).

**Tabla 2. Composición de la premezcla de vitaminas**

VITAMINAS	g/100 g de premezcla	NÚMERO DE CATÁLOGO ICN <sup>1</sup> , SIGMA <sup>2</sup>
Vitamina A acetato (Retinol)	0.5	160079 <sup>1</sup>
Vitamina D <sub>3</sub> (Colalciferol)	0.0001	160107 <sup>1</sup>
Vitamina E (Tocoferol)	0.8	T-3376 <sup>2</sup>
Vitamina K <sub>3</sub> (Menadiona)	0.2	102259 <sup>1</sup>
Tiamina (B <sub>1</sub> ) Hidroclorada	0.05	103029 <sup>1</sup>
Riboflavina (B <sub>2</sub> )	0.3	102813 <sup>1</sup>
Piridoxina (B <sub>6</sub> ) Hidroclorada	0.1	102777 <sup>1</sup>
Ácido DL-Pantoténico	0.5	101228 <sup>1</sup>
Ácido Nicotínico (Niacina)	0.5	102446 <sup>1</sup>
D-Biotina	0.005	101023 <sup>1</sup>
Inositol	0.5	102052 <sup>1</sup>
Cianocobalamina (B <sub>12</sub> )	0.0002	103271 <sup>1</sup>
Ácido Fólico	0.018	101725 <sup>1</sup>
Celulosa (vehículo)	86.52	C-8002 <sup>2</sup>

<sup>1</sup> ICN Biomedicals Inc. Ohio. USA. <sup>2</sup> Sigma Co. St. Louis. USA.

**Tabla 3. Composición de la premezcla de minerales.**

Minerales	g/100 g de premezcla	Catálogo SIGMA <sup>1</sup>
CoCl·6H <sub>2</sub> O	0.004	C-2644
CuSO <sub>4</sub> ·5 H <sub>2</sub> O	0.25	C-7631
FeSO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O	4	F-7002
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	28.398	M-1880
MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	0.65	M-6528
KI	0.067	P-4286
Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	0.01	S-1382
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	13.193	Z-0501
Celulosa (Vehículo)	53.428	C-8002

<sup>1</sup> Sigma Co. St. Louis. USA.

Las condiciones de cultivo que se utilizaron fueron: temperatura  $27 \pm 0.5$  °C, salinidad:  $39 \pm 1$  unidades prácticas de salinidad (ups); oxígeno disuelto:  $>4$  mg/L; alimentación: *ad libitum*; duración: 30 días; recambio de agua/día: 60 %; fotoperíodo controlado: 12 horas luz: 12 horas oscuridad (fotofase de 8:00 AM a 8:00 PM). El experimento tuvo una duración de 30 días en los que diariamente se monitoreó la temperatura y tres veces por semana el oxígeno disuelto, ambas mediciones se realizaron con un oxímetro YSI<sup>MR</sup> modelo 58 (San Diego, CA, U.S.A.) (el medidor de temperatura del oxímetro se calibró diariamente con un termómetro Baunman). Se registró la salinidad dos veces por semana por medio de un refractómetro YSI<sup>MR</sup> modelo RF20 (San Diego, CA, U.S.A.). Se realizó mantenimiento diario realizando un recambio de agua del 30%, retirando el alimento no consumido, muertos y mudas.

### 5.7.3 Criterios de evaluación de crecimiento y utilización del alimento

Se utilizaron los índices más comunes para la evaluación biológica de alimentos (Tacon, 1989):

Supervivencia (S): Es el porcentaje de organismos vivos durante el tiempo de experimentación.

$$S = \frac{N_f}{N_i} \times 100$$

Donde: Nf= número final de organismos.

Ni= número inicial de organismos.

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

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

Donde: Pf = peso final del organismo

Pi = peso inicial del organismo

Alimento Aparentemente Consumido (AC) expresado en g/camarón/día.

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

Donde: Atc = alimento total consumido por acuario

Ni = número de organismos iniciales

Nf = número de organismos finales

Factor de conversión alimenticia (FCA): Es la cantidad de alimento (g) necesaria para que el camarón aumente una unidad de peso.

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

Donde: Aac = alimento aparentemente consumido

Ipc = Incremento en peso corregido

El factor de conversión alimenticia se corrigió en función de la mortalidad, de acuerdo a Kitabayashi *et al.* (1971).

$$IPC = Bf + 1/2(Ppf + Ppi)(Nm) - Bi$$

Donde:

IPC = Incremento en peso corregido

Bf = Biomasa final

Bi = Biomasa inicial

Ppf = Peso promedio final

Ppi = Peso promedio inicial

Nm = Número de muertos

#### **5.7.4 Detección de actividad enzimática y de respuesta inmune.**

Se realizaron dos muestreos durante el experimento (15 y 30 días), seleccionándose 10 organismos en estadio C (intermuda) por tratamiento, congelándose los organismos a -60°C en un ultracongelador (SO-LOW Revco Scientific inc.). Se realizaron disecciones de músculo y hepatopáncreas, homogenizándose 100 mg de tejido en 1 mL de buffer fosfato 50 mM, tanto de músculo como de hepatopáncreas correspondiente para cada medición enzimática catalasa (pH 7.0) y SOD (pH 7.8) y se centrifugaron a 10,000 rpm durante 5 minutos a 4 °C en una microcentrífuga refrigerada para eliminar lípidos y restos celulares. De los productos homogenizados obtenidos se realizaron preparaciones en citocentrífuga: una para cuantificar proteína soluble (Bradford, 1976), otra para medir la actividad de la catalasa (Aebi, 1984) y súperoxido dismutasa (McCord and Fridovich, 1979).

#### **5.7.5 Determinación de proteína soluble en músculo y hepatopáncreas**

Se determinó la cantidad de proteína soluble mediante el kit “Bio-Rad”, el cual esta basado en el método de Bradford (1976). Se mezclaron 160 µL del colorante azul de

Coomassie con 40  $\mu\text{L}$  de la muestra por cada pozo dentro de una microplaca, incubándose durante 5 minutos a temperatura ambiente, donde el colorante se liga a los aminoácidos básicos y aromáticos, especialmente la arginina, generando una variación de color rojo (estado protonado) a una coloración azul (estado no protonado) al formarse el complejo colorante-proteína en condiciones ácidas. La determinación de la coloración se realizó espectrofotométricamente a una longitud de onda de 595 nm con previa elaboración de una curva estándar de Albúmina sérica bovina (Sigma A-9430).

#### **5.7.6 Actividad Catalasa (CAT) (E.C. 1.11.1.7)**

El método consiste en medir el decremento en la concentración del  $\text{H}_2\text{O}_2$  a 240 nm (Aebi, 1984). Se homogenizaron 100 mg de tejido (músculo o hepatopáncreas), en 1,000  $\mu\text{L}$  de buffer fosfato 50 mM (pH 7.0), posteriormente se centrifugó 5 min a 10,000 rpm (8,000 g) a 4 °C. En una celda de cuarzo se agregaron 495  $\mu\text{L}$  de peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 8 mM ajustado a una absorbancia de  $0.5 \pm 0.01$  a 240 nm y 5  $\mu\text{L}$  de muestra (sobrenadante). Se agitó y se registró el  $\Delta\text{A}/\text{min}$  a 240 nm en un espectro UV/VIS (Spectrophotometer Beekman DU-640). Los valores negativos de la pendiente  $\Delta\text{A}/\text{min}$  indican actividad catalasa. Se utilizó catalasa de hígado de bovino (Sigma C-9322) como estándar. Los cálculos se realizaron con la siguiente ecuación:

$$\text{U/ml} = (\Delta\text{A} / \text{min} \times \text{CE} \times \text{Factor de Dilución}) / 60 \text{ seg}$$

$$\text{U/mg} = (\text{U/mL}) / (\text{mg/mL proteína})$$

Donde CE es el coeficiente de extinción del peróxido y el  $\Delta\text{A}/\text{min}$  es el cambio en la densidad óptica por unidad de tiempo generado por el consumo del peróxido de hidrógeno,

por lo que una unidad se considera como la descomposición de 1  $\mu\text{mol}$  de peróxido por minuto a 25 °C.

#### **5.7.7 Súper Oxido Dismutasa (SOD) (E.C. 1.15.1.1)**

Se midió la actividad SOD en músculo y hepatopáncreas mediante el método espectrofotométrico descrito por McCord y Fridovich (1969), donde la reacción xantina/xantina oxidasa es la generadora del radical anión y el citocromo C es el detector de éste. Por lo tanto, este ensayo es una técnica basada en la inhibición de la reducción del citocromo C por la SOD. La técnica consistió en adicionar en una celda de plástico 1,970  $\mu\text{L}$  de la solución 1 (Solución 1; Mezclar 25 mL de buffer fosfato 50 mM pH 7.8, 1 mL de EDTA 10.7 mM, 1 mL citocromo C 1.1 mM y 50 mL de xantina 0.108 mM) más 10  $\mu\text{L}$  de muestra. Se agitó y graficó el cambio de absorbancia por un minuto (lectura 2). Posteriormente, se le adicionaron 20  $\mu\text{L}$  de solución 2 [Solución 2; Xantina oxidasa preparada en agua fría desionizada hasta obtener un  $\Delta A/\text{min}$ . (Lectura 1) entre  $0.025 \pm 0.005$ ], registrándose el cambio de absorbancia durante un minuto (Lectura 3). La actividad de esta enzima se cuantificó por espectrofotometría a 550 nm, midiendo el cambio de absorbancia debido al efecto inhibitorio de SOD sobre la reducción del citocromo C por el anión superóxido. Experimentalmente, el anión superóxido se generó por la reacción de xantina oxidasa y xantina como sustrato. El anión reduce al citocromo C-Fe<sup>+3</sup> a citocromo C-Fe<sup>+2</sup>. Se utilizó superóxido dismutasa de eritrocitos de bovino (Sigma S-2515) como estándar. Los cálculos se realizaron mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{A-B}{A} * 100 \text{ (Donde } A = \text{Lectura 1 y } B = \text{Lectura 3-Lectura 2)}$$

$U/mL = \% \text{ de inhibición} / (50 \% * mL \text{ de la muestra})$

$U/mg = (U/mL) / mg^{-1} mL \text{ de proteína en la muestra}$

Los resultados se expresan en unidades (U) de SOD, siendo una unidad la cantidad de enzima que inhibe la reducción del citocromo C en un 50%.

#### **5.7.8 Conteo total de hemocitos (CTH).**

Al final del bioensayo de crecimiento (30 días) se seleccionaron tres organismos en estadio C (intermuda) extrayéndose una muestra aproximada de 50  $\mu$ L de hemolinfa por camarón de la base del pleópodo del primer segmento abdominal cerca del poro genital. La hemolinfa se obtuvo utilizando una jeringa de insulina de 1.0 mL conteniendo 250  $\mu$ L de solución anticoagulante preenfriada a 4 °C, la cual fue diseñada con base a los valores iónicos y osmóticos de la hemolinfa de camarón (450 mM NaCl, 10 mM KCl, 10 mM EDTA-Na<sub>2</sub>, 10 mM HEPES, pH 7.3, 850 mOsm kg<sup>-1</sup>) (Vargas-Albores *et al.*, 1993; Vargas-Albores *et al.*, 1996). La hemolinfa se depositó en tubos de vidrio estériles y se mantuvo en baño de hielo. El contenido de los hemocitos circulantes se contabilizó en un hematocitómetro utilizando un microscopio de contraste de fase.

## **5.8 Experimento 2. Evaluación de la capacidad de los carotenoides para prevenir la infección del virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV) en camarón blanco.**

### **5.8.1 Análisis por PCR para la detección de WSSV.**

Se utilizó el Kit comercial para detección de WSSV [Kit IQ 2000<sup>TM</sup> WSSV (Farming IntelliGene Tech. Corp)]. Este kit tiene una secuencia de dos pasos. En el primer paso, una región conservada de la secuencia del ADN de WSSV, un segmento de 910 pb se amplificó por iniciadores específicos. En el segundo, los iniciadores anidados se añadieron para seguir amplificando tres segmentos (910, 550 y 296 pb) a partir del producto de la amplificación inicial. Por medio de electroforesis y colorante de bromuro de etidio, se observaron los fragmentos amplificados bajo luz ultravioleta.

### **5.8.2 Obtención de camarones libres de WSSV.**

Se extrajeron aleatoriamente 20 camarones con un peso promedio de 7 g, de cultivos en jaulas flotantes ubicadas en Bahía Altata, en la comunidad de El Tetuán, Navolato, Sinaloa. Posteriormente se extrajeron 10 camarones al azar y se realizó una mezcla del primer par de pleópodos, a partir de la cual se verificó que los organismos estuvieran libre del virus de la mancha blanca mediante PCR, con el Kit IQ 2000<sup>TM</sup> WSSV (Farming IntelliGene Tech. Corp). Criterio de diagnóstico: las muestras negativas únicamente mostraron una banda, 848 pb la cual es el producto del gen específico del camarón. Las muestras positivas mostraron una banda a 296 pb ó 550 pb. Si no se ve ninguna banda en el gel, significa que el ADN es de mala calidad. Cada experimento requiere controles negativos y positivos; si el estándar positivo 10<sup>2</sup> no muestra una banda a

296 pb, la reacción de PCR falló. Por otro lado, si el blanco muestra una banda a 296 pb, significa que hubo contaminación.

### **5.8.3 Elaboración del inóculo con WSSV.**

A partir de organismos donados por el Centro de Ciencias de Sinaloa y previamente diagnosticados positivos a WSSV, se procedió a realizar una solución patrón. Se extrajeron los pleópodos y las branquias de 5 organismos y se realizó un homogenizado con agua de mar estéril con una proporción 1:5 p/v. A partir de la solución patrón se realizaron diluciones con las cuales se determinó la  $DL_{50}$  (Prior, *et al.*, 2003).

### **5.8.4 Organismos experimentales**

Se obtuvieron 500 organismos de *L. vannamei* con un peso promedio de 7 g, en cultivos de jaulas flotantes ubicadas en Bahía Altata, a través de la cooperativa Barra de Palmitas, en la comunidad de El Tetuán, Navolato, Sinaloa. Los organismos se transportaron en agua de mar (26 °C, pH 7.8 y 40 ups) en cajas de poliestireno de la granja al Laboratorio de Sanidad Acuícola del Centro de Ciencias de Sinaloa. Los camarones se aclimataron en 5 tanques de plástico de 150 litros con un promedio de 100 organismos por tanque, alimentándose con un alimento peletizado PIASA con 40% de proteína. Las condiciones en las que se mantuvieron hasta su utilización fueron: temperatura  $27 \pm 1$  °C, salinidad:  $40 \pm 1$  ups; oxígeno disuelto:  $>4$  mg/L; alimentación: *ad libitum*; duración: 4 días; recambio de agua/día: 60%; fotoperíodo: natural.

### **5.8.5 Sistema de cultivo**

El sistema de cultivo utilizado para llevar a cabo la determinación de la dosis letal media  $DL_{50}$  y el reto viral consistió de 18 acuarios de vidrio con capacidad de 25 L (25 x 50 x 20 cm). El sistema de cultivo utilizado en el bioensayo de inmunoestimulación, consistió de 28 acuarios de plástico con una capacidad de 30 L (30 x 50 x 30). En ambos sistemas se utilizó agua de mar filtrada, a través de un sistema de filtros de arena de 50 micras, filtros de carbón activado y luz UV, proveniente del laboratorio de producción de postlarva Tres Amigos SA de CV, ubicado en la comunidad de Celestino Gasca, La Cruz, Elota, Sinaloa. La aireación del agua se llevó a cabo por mangueras de aireación alimentadas con bombas de aireación de 3.5 L/min. (Air-Pump Resunt). La temperatura del agua registrada fue de  $27 \pm 1$  °C y el fotoperíodo natural tuvo una fotofase de 6:30 AM a las 7:30 PM.

### **5.8.6 Diseño experimental y condiciones de cultivo**

Una vez que se verificó que los organismos estaban libres de WSSV, se pesaron individualmente organismos de *L. vannamei* y se seleccionaron 50 organismos con un peso entre 4.5 y 6 g, distribuyéndose aleatoriamente en 10 acuarios a razón de 5 organismos por acuario con dos réplicas por tratamiento (diluciones). Para determinar la dosis letal media  $DL_{50}$  se evaluaron cuatro diluciones: (1:5, 1:50, 1:50 y 1:5,000), un control positivo y un blanco (10 acuarios en total) 5 tratamientos en total. Los organismos se alimentaron manualmente con el alimento control otorgando una ración del 4 % de la biomasa inicial en cada acuario, la cual se suministró en tres porciones (0800:1500:2000 hrs). Posteriormente, la cantidad se ajustó diariamente en función del alimento consumido.

Las condiciones de cultivo que se utilizaron fueron: temperatura  $27 \pm 1$  °C, salinidad:  $40 \pm 1$  ups; oxígeno disuelto:  $>4$  mg/L; alimentación: *ad libitum*; duración: 6 días; recambio de agua/día: 10%; fotoperíodo natural: 10 horas luz: 14 horas oscuridad. Se registró diariamente la temperatura (termómetro de mercurio), el oxígeno (oxímetro YSI 55-12FT), pH (Potenciómetro Orion Research SA250) y salinidad (refractómetro Sper Scientific 300011).

#### **5.8.7 Determinación de la dosis letal media DL<sub>50</sub>**

A cada organismo se le inyectó una dosis de 20 µL por gramo de peso corporal de inóculo correspondiente a cada dilución, en la región dorso lateral, a la altura del tercer segmento abdominal. Una vez inoculados, los organismos se revisaron cada seis horas, registrándose los cambios en comportamiento, coloración y supervivencia. A los primeros cinco organismos muertos de cada tratamiento se le cortaron el primer par de pleópodos y se fijaron en alcohol al 96 % para análisis de PCR-WSSV y el resto del organismo se procesó con solución fijadora Davidson's para análisis de histopatología. Una vez alcanzado el 50 % de mortalidad en las unidades experimentales, los organismos sobrevivientes se retiraron para su análisis mediante PCR e histología. El agua utilizada durante el bioensayo, el alimento no consumido y las mudas, se trataron con cloro al 10% durante 24 horas, desechando el agua en el drenaje municipal, separando los sólidos con un cedazo y, junto con los organismos muertos se almacenaron en un congelador a -20 °C, para su posterior incineración.

### **5.8.8 Bioensayo de inmunoestimulación**

Se pesaron individualmente organismos de *L. vannamei* y se seleccionaron 70 organismos libres de WSSV con un peso promedio de 6.67 g, distribuyéndose aleatoriamente en 15 acuarios a razón de 5 organismos por acuario. Para determinar el efecto de los pigmentos sobre la supervivencia en el reto viral se aplicaron los tratamientos que se consideró tuvieron un mejor efecto sobre el crecimiento y la respuesta inmune, evaluados en el experimento 1: Control, BC-100: alimento con 100 mg/kg de  $\beta$ -caroteno, HZ-100: alimento con 100 mg/kg de zeaxantina, AX-100: alimento con 100 mg/kg de astaxantina.

Las condiciones de cultivo que se utilizaron fueron: temperatura  $27 \pm 2$  °C, salinidad:  $37 \pm 1$  ups; oxígeno disuelto:  $>4$  mg/L; alimentación: *ad libitum*; duración: 15 días; recambio de agua/día: 30%; fotoperíodo natural: 10 horas luz: 14 horas oscuridad. Los alimentos se suministraron manualmente a razón del 4% de la biomasa inicial de cada tanque, y posteriormente se ajustó diariamente la ración en función del alimento consumido. Se registró diariamente la temperatura, el oxígeno y la salinidad.

### **5.8.9 Reto viral**

Después de alimentar los organismos durante 15 días con los tratamientos experimentales, se realizó el reto viral de la siguiente manera: se colocaron 5 organismos en cada unidad experimental, con dos réplicas por tratamiento y se inyectaron con 20  $\mu$ L de inóculo por gramo de peso corporal, a partir de una mezcla de solución salina estéril con el

inóculo de WSSV (dilución 1:500); al blanco se le inyectó el mismo volumen de solución salina estéril. Una vez inoculados, los organismos se revisaron cada hora, observando cambios en comportamiento, coloración y supervivencia. Los organismos se alimentaron con el alimento control otorgando una ración del 4 % de la biomasa total inicial en cada una de las unidades experimentales, la cual se suministró en tres porciones (0800:1500:2000 hrs.). A los primeros cinco organismos muertos de cada tratamiento se les cortó el primer par de pleópodos y se fijó en alcohol al 96 % para análisis de PCR-WSSV. El resto del organismo se procesó con solución fijadora Davidson's para análisis de histopatología. Una vez alcanzado el 50 % de mortalidad en las unidades experimentales, los organismos sobrevivientes se retiraron para su análisis mediante PCR e histopatología. Se emplearon las medidas de seguridad descritas en la sección 5.8.7.

#### **5.8.10 Análisis histopatológico**

Los organismos se preservaron en solución fijadora Davidson's durante 48 hrs. y posteriormente se transfirieron a etanol al 70 % (Bell and Lightner, 1988, Hasson *et al.*, 1997). Para realizar el análisis histológico se utilizó la técnica convencional de tinción Hematoxilina-Eosina usada por (Bell and Lightner, 1988). Los organismos se disectaron en cuatro secciones: cefalotórax y branquias (cortes longitudinales), tercer segmento abdominal y el intestino posterior (cortes transversales). Los tejidos se colocaron en cápsulas de plástico, con la superficie a observar en contacto con ésta; se incluyeron en parafina y se cortaron a 5 micras en un microtomo Leica RM2025. Los cortes obtenidos se colocaron en baño de flotación adicionado con gelatina tipo reactivo y se recuperaron por medio de un portaobjetos, los cuales fueron secados a temperatura ambiente. Los cortes

fueron teñidos con Hematoxilina-Eosina y, una vez teñidos, se montaron de manera permanente utilizando un fijador comercial (entellan), posteriormente se observaron en un microscopio óptico (Olimpos BX41). Las imágenes de los cortes que presentaron cambios o alteraciones celulares relevantes se digitalizaron y se analizaron en un analizador de imágenes (Image-Pro Plus versión 4.1 para Windows). El procesamiento de tejidos infectados por WSSV se realizó en el Laboratorio de Sanidad Acuícola del Centro de Ciencias de Sinaloa, Culiacán, Sinaloa.

### **5.9 Experimento 3. Evaluación de la capacidad de los carotenoides para prevenir la infección producida por *V. harveyi*.**

#### **5.9.1 Organismos experimentales.**

Se seleccionaron 1,000 organismos de *L. vannamei*, con un peso promedio de 5 g los cuales se capturaron utilizando una atarraya de nylon en los estanques de engorda, en la empresa Acuaculturas de La Paz, S.A de C.V. (APSA) ubicada en el km 10 de la carretera a Pichilingue B.C.S. y, se transportaron en un tanque de 500 L, a una temperatura de 26 °C, salinidad 38 ups y oxigenación constante, de la granja a las instalaciones del CIBNOR. Los organismos se aclimataron en tres tanques de 1500 L y 1.7 m<sup>2</sup> con aproximadamente 350 individuos por tanque dentro del Laboratorio de Nutrición Experimental del CIBNOR (27 °C, 40 ups y oxígeno disuelto > 4 mg/L), alimentándose con alimento peletizado PIASA 40 % de proteína dos veces al día (09:00 y 17:00).

### **5.9.2 Elaboración del inóculo con *V. harveyi*.**

La cepa bacteriana (*V. harveyi*) utilizada en este experimento fue donada por el Laboratorio de Biotecnología Marina del CIBNOR. Para activar la cepa, se sembró en placa por estría abierta en medio de cultivo bacteriológico (medio marino sólido 2260) y en medio de cultivo vibrio-específico (TCBS) para corroborar que pertenece al género vibrio. A partir de estos cultivos se realizaron resiembras en medio marino líquido 2260 en tubos de ensaye de 50 mL, incubándose durante 24 hrs a 30 °C con agitación lenta y constante. Para separar las células del medio de cultivo se le adicionó a cada tubo 50 mL de agua marina estéril y se centrifugó durante 30 minutos a 10,000 rpm a temperatura ambiente en una centrifuga de tina (Beckman J2-MC). El sobrenadante se desechó y el paquete celular (pelet) se resuspendió en 50 mL de agua marina estéril (solución stock). Se determinó el número de células por mililitro de la solución stock mediante un hematocitómetro, por conteo en placa y relación absorbancia-concentración celular. Una vez determinada la concentración celular de la solución stock, se realizaron las diluciones correspondientes para la determinación de la dosis letal media  $DL_{50}$  y el reto bacteriano con las dietas experimentales en una campana de flujo laminar previamente esterilizada con rayos UV (NSF®).

### **5.9.3 Sistema de cultivo, diseño experimental y condiciones de cultivo.**

El sistema de cultivo utilizado para llevar a cabo la determinación de la dosis letal media  $DL_{50}$  y el reto bacteriano consistió de 21 acuarios de vidrio con capacidad de 30 L (25 x 50 x 30 cm.) utilizando agua de mar filtrada, a través de un sistema de filtros de arena de 50 micras, ubicado en la cámara refrigerada (No.4) en el laboratorio de Ecofisiología de

Organismos Acuáticos del CIBNOR. La aireación del agua se llevó a cabo por mangueras de aireación alimentadas con un soplador de 4.8 HP (Boldov®) y la temperatura del agua fue controlada por calentadores sumergibles de 300 W (Rena Cal). La iluminación del sistema experimental se hizo con lámparas incandescentes blancas, controladas manualmente, manteniendo un fotoperíodo (10h luz/14h obs.) constante durante los experimentos.

Se pesaron individualmente organismos de *L. vannamei* y se seleccionaron 105 organismos con un peso entre 5 y 7 g, distribuyéndose aleatoriamente en 15 acuarios a razón de 7 organismos por acuario. Para determinar la capacidad de los pigmentos para prevenir infecciones producidas por *V. harveyi*, se aplicaron los tratamientos que se consideró tuvieron un mejor efecto sobre el crecimiento y la respuesta inmune evaluados en el experimento 1: Control, BC-100: alimento con 100 mg/kg de  $\beta$ -caroteno, HZ-100: alimento con 100 mg/kg de zeaxantina, AX-100: alimento con 100 mg/kg de astaxantina.

Las condiciones de cultivo que se utilizaron fueron: temperatura  $27 \pm 0.5$  °C, salinidad:  $40 \pm 1$  ups; oxígeno disuelto:  $>4$  mg/L; alimentación: *ad libitum*; duración: 15 días; recambio de agua/día: 30 %; fotoperíodo natural: 10 horas luz: 14 horas oscuridad. Los alimentos se suministraron manualmente a razón del 4 % de la biomasa inicial en cada tanque, posteriormente se ajustó la ración diariamente en función del alimento consumido. Se registró diariamente la temperatura, el oxígeno y la salinidad.

#### **5.9.4 Determinación de la dosis subletal (DL<sub>50</sub>)**

A cada organismo se le inyectó una dosis de 20 µL por gramo de peso corporal de inóculo correspondiente a cada dilución ( $1 \times 10^7$ ,  $8 \times 10^6$ ,  $4 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^4$  cél/mL y un blanco con agua salina estéril) en la región dorso lateral, a la altura del tercer segmento abdominal. Una vez inoculados, los organismos se revisaron cada seis horas, registrándose los cambios en comportamiento, coloración y supervivencia. Toda el agua utilizada durante el bioensayo, el alimento no consumido y las mudas, se desinfectaron utilizando pastillas de hipoclorito de sodio dentro del tanque almacenador durante 24 horas, desechándose el agua clorada en el drenaje del laboratorio de Ecofisiología de Organismos Acuáticos. Los organismos muertos, cajas de petri y tubos de ensaye con crecimiento bacteriano, se esterilizaron y se desecharon junto con el material material biológico de desecho del laboratorio de Patogénesis Microbiana.

#### **5.9.5 Reto bacteriano**

Después de alimentar los organismos durante 15 días con los tratamientos experimentales (Blanco, control (+), BC-100, HZ-100 y AX-100), se realizó el reto bacteriano de la siguiente manera: se inyectó cada organismo con 20 µL de inóculo por gramo de peso corporal a partir de una mezcla de solución salina estéril con el inóculo de *V. harveyi* a una concentración de  $8 \times 10^6$  ufc/mL. Al blanco se le inyectó el mismo volumen de solución salina estéril. Una vez inoculados, los organismos se revisaron cada seis horas, observando cambios en comportamiento, coloración y supervivencia. Los organismos se alimentaron con el alimento control otorgando una ración del 4 % de la biomasa total

inicial en cada una de las unidades experimentales, la cual se suministró en dos porciones (0900:1700 hrs). Se realizaron dos muestreos durante el experimento (48 y 144 hrs.), seleccionando al azar un individuo por acuario (tres por tratamiento), extrayendo aproximadamente 300  $\mu\text{L}$  de hemolinfa por camarón y posteriormente se fijaron en solución Davidson's para análisis de histopatología. En la hemolinfa se determinó el conteo total de hemocitos (CTH), tiempo de coagulación, proteína plasmática y anión superóxido. Se utilizaron las medidas de bioseguridad empleadas en la sección (5.8.7).

### **5.9.6 Anión superóxido**

La prueba se basa en la reducción del Nitro Blue Tetrazolium (NBT) en azul de formazan durante la generación de anión superóxido. La técnica consistió en evaluar el cambio de densidad óptica generado por la producción endógena del radical  $\text{O}_2^-$  en hemocitos. Se prepararon cuatro alícuotas de 100  $\mu\text{L}$  de hemolinfa, cada una en tubos Eppendorf por camarón, las cuales se centrifugaron 5 minutos a 800 g a 4 °C. Se desechó el sobrenadante y se adicionaron 100  $\mu\text{L}$  de anticoagulante: se centrifugó y se desechó el sobrenadante. Dos de los tubos son positivos y dos negativos, a los positivos se les adicionó 50  $\mu\text{L}$  de Laminarina al 0.2% y a los negativos 50  $\mu\text{L}$  de HBSS y 50  $\mu\text{L}$  de NBT al 0.3% en positivos y negativos. Los tubos se incubaron a 37 °C por 30 minutos, posteriormente se centrifugaron durante 5 minutos a 800 g a 4 °C y se desechó el sobrenadante. Se realizaron dos lavados, el primero con 100  $\mu\text{L}$  de metanol absoluto y el segundo con 100  $\mu\text{L}$  de metanol al 70%; en ambos lavados se centrifugó y se desechó el sobrenadante. Se secaron los tubos a temperatura ambiente (2 hrs.) y se les adicionó 120  $\mu\text{L}$  de KOH 2M + 140  $\mu\text{L}$

de DMSO, se agitaron los tubos fuertemente en un agitador vortex y se leyeron a 630 nm en el lector de microplaca.

#### **5.9.7 Análisis estadísticos**

Los datos obtenidos en los diferentes parámetros evaluados fueron sujetos a un análisis exploratorio (pruebas de normalidad y homocedasticidad): la normalidad se verificó mediante la prueba de Lilliefors y Shapiro, la homogeneidad de varianzas se verificó mediante la prueba de Levene. Posteriormente se realizó un análisis de varianza (ANOVA) (Zar, 1996). Todas las pruebas estadísticas se realizaron al 95% de probabilidad ( $P = 0.05$ ) en el programa Statistica 7.0. En los casos donde hubo diferencias significativas la prueba a posteriori que se utilizó fue la de Tukey ( $P = 0.05$ ). En algunos casos para comparar los datos dentro y entre los tratamientos se realizaron pruebas de Mann-Whitney ( $P = 0.05$ ). Todos los datos fueron graficados como media  $\pm$  desviación estándar.

## VI. RESULTADOS

### 6.1 Experimento 1. Efecto de $\beta$ -caroteno, zeaxantina, y astaxantina, a dos niveles de inclusión en el alimento, sobre el crecimiento, la utilización del alimento y la respuesta inmune de juveniles de *L. vannamei*.

#### 6.1.1 Composición química de los alimentos

Los pigmentos carotenoides utilizados en este trabajo ( $\beta$ -caroteno, zeaxantina y astaxantina) contienen un alto contenido de extracto etéreo, el cual varió de 20.67 a 93.99%, y un bajo contenido de ceniza ( $< 0.3\%$ ). El  $\beta$ -caroteno es el que presentó el menor porcentaje de extracto etéreo (20.67%), ceniza y humedad (0%) (Tabla 4).

**Tabla 4.- Composición química de los pigmentos comerciales.**

Pigmentos	Análisis Químicos (%)				
	Proteína	Extracto etéreo	Fibra	Ceniza	Humedad
$\beta$ -caroteno	N.D.	20.67 $\pm$ 0.22	N.D.	0.00	0.00
Zeaxantina	N.D.	93.99 $\pm$ 0.28	N.D.	0.00	3.78 $\pm$ 0.17
Astaxantina	N.D.	90.47 $\pm$ 0.28	N.D.	0.28 $\pm$ 0.16	0.16 $\pm$ 0.17

N.D. No determinado

La Tabla 5 muestra la composición química proximal (en base seca) del alimento control. No se realizó este análisis con los seis alimentos experimentales (BC-50, BC-100, HZ-50, HZ-100, AX-50 y AX-100) puesto que solo se diferencian de su formulación en el nivel de inclusión de los pigmentos (Tabla 1), lo cual no afectaría la composición química proximal, por lo que se asume que la composición química de los alimentos experimentales es similar.

**Tabla 5. Composición química proximal del alimento control.**

Humedad (%)	5.76 ± 0.12
Proteína cruda	36.35 ± 0.20
Extracto etéreo	7.77 ± 0.66
Fibra cruda	0.86 ± 0.02
Cenizas	7.87 ± 0.17
E.L.N. <sup>1</sup>	47.15 ± 0.37
Energía (cal/g)	4393.92 ± 9.01

Valores promedio de tres réplicas (± desviación estándar), expresados en g/100 g de materia seca, excepto humedad. <sup>1</sup>E.L.N.: Extracto libre de nitrógeno.

**Tabla 6. Estabilidad en el agua de los alimentos utilizados para evaluar crecimiento, utilización del alimento y respuesta inmune.**

Alimentos	Estabilidad (%)
Control	92.563 ± 0.177
BC-50	92.551 ± 3.502
BC-100	90.694 ± 2.084
HZ-50	92.409 ± 4.104
HZ-100	93.037 ± 0.917
AX-50	90.924 ± 0.637
AX-100	90.697 ± 2.470

Valores promedio de tres réplicas ± desviación estándar. No se encontraron diferencias significativas en la estabilidad de los alimentos ( $P > 0.05$ ).

es similar a la del alimento control. La estabilidad de los alimentos fue elevada (>90%) y no se encontraron diferencias significativas entre los alimentos ( $P > 0.05$ ) (Tabla 6).

El alimento control tuvo una concentración de carotenoides totales de 1.14 mg/kg, siendo ésta muy inferior a la encontrada en los alimentos experimentales. Los niveles de carotenoides totales en los alimentos experimentales fueron muy cercanos a los calculados durante la formulación y no se encontraron diferencias significativas entre los alimentos ( $P > 0.05$ ) dentro de un mismo nivel de inclusión de los diversos pigmentos.

**Tabla 7. Concentración de carotenoides totales en los alimentos utilizados para evaluar crecimiento, utilización del alimento y respuesta inmune.**

Alimento	mg/kg
Control	1.14 ± 0.074 <sup>c</sup>
BC-50	55.52 ± 2.39 <sup>a</sup>
BC-100	95.90 ± 3.66 <sup>b</sup>
HZ-50	61.22 ± 3.58 <sup>a</sup>
HZ-100	101.67 ± 4.5 <sup>b</sup>
AX-50	49.67 ± 4.26 <sup>a</sup>
AX-100	94.67 ± 0.57 <sup>b</sup>

Valores promedio de tres réplicas ± desviación estándar. Superíndices diferentes en la columna indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).

### 6.1.2 Parámetros zootécnicos

El tipo de pigmento utilizado o el nivel de inclusión (50 y 100 mg/kg) en los seis alimentos experimentales no tuvieron efecto significativo ( $P>0.05$ ) sobre la supervivencia, el crecimiento ponderal, la tasa de crecimiento, el alimento consumido o el factor de conversión alimenticia (Tabla 8).

**Tabla 8. Resultados zootécnicos de juveniles de camarón *L. vannamei* alimentados durante 30 días con diferentes tipos de pigmentos a dos concentraciones (50 y 100 mg/kg).**

Alimento	Peso Promedio inicial (g)	Peso promedio final (g)	Supervivencia	Tasa de crecimiento (%)	Alimento consumido g/cam/día	Factor de conversión alimenticia
<b>Control</b>	0.502 ± 0.07	2.60 ± 0.45	96.67	380.89 ± 87.07	0.130 ± 0.006	1.43 ± 0.12
<b>BC-50</b>	0.512 ± 0.06	2.50 ± 0.62	96.67	337.97 ± 60.97	0.130 ± 0.019	1.42 ± 0.28
<b>BC-100</b>	0.507 ± 0.06	2.50 ± 0.49	90.00	284.99 ± 104.37	0.112 ± 0.026	1.40 ± 0.13
<b>HZ-50</b>	0.508 ± 0.07	2.58 ± 0.93	93.33	369.66 ± 129	0.100 ± 0.012	1.42 ± 0.08
<b>HZ-100</b>	0.501 ± 0.06	2.50 ± 0.51	96.67	339.50 ± 52.06	0.125 ± 0.017	1.59 ± 0.28
<b>AX-50</b>	0.510 ± 0.07	2.54 ± 0.49	100	350.17 ± 50.24	0.116 ± 0.006	1.37 ± 0.18
<b>AX-100</b>	0.492 ± 0.06	2.40 ± 0.65	96.67	357.32 ± 72.49	0.131 ± 0.013	1.57 ± 0.40

Valores promedio de 3 réplicas ± desviación estándar. Control, BC-50: Alimento con 50 mg/kg de  $\beta$ -caroteno, BC-100: Alimento con 100 mg/kg de  $\beta$ -caroteno, HZ-50: Alimento con 50 mg/kg de zeaxantina, HZ-100: Alimento con 100 mg/kg de zeaxantina, AX-50: Alimento con 50 mg/kg de astaxantina, AX-100: Alimento con 100 mg/kg de astaxantina.

### 6.1.3 Proteína soluble

No se encontraron diferencias significativas en la concentración de proteína soluble en músculo y en hepatopáncreas entre ninguno de los tratamientos a los 15 días (Fig. 1). A los treinta días del experimento, la concentración de proteína aumentó significativamente en los tratamientos BC-50, HZ-50, AX-50 y AX-100 con respecto al control. Todos los tratamientos tuvieron un incremento significativo ( $P < 0.05$ ) en la concentración de proteína en hepatopáncreas a los 30 días de experimentación.

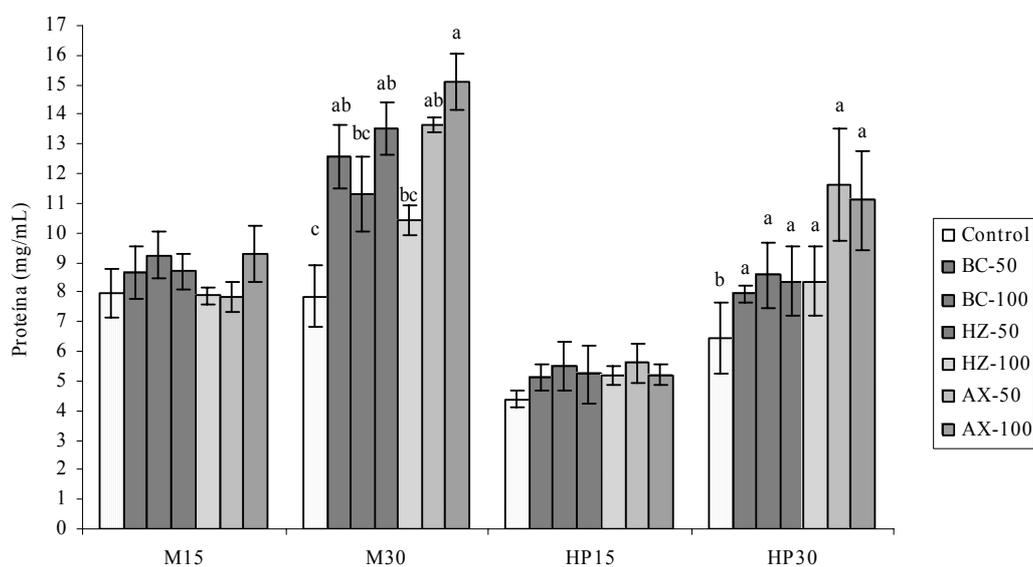


Figura 1. Valores promedio de 3 réplicas ( $\pm$  desviación estándar). Proteína soluble en músculo y hepatopáncreas de camarón *L. vannamei* a los 15 (M15 y HP15) y 30 (M30 y HP30) días de ser alimentados con alimentos que contenían 50 y 100 (mg/kg) de  $\beta$ -caroteno, zeaxantina y astaxantina. Alimentos: Control, BC-50: Alimento con 50 mg/kg de  $\beta$ -caroteno, BC-100: Alimento con 100 mg/kg de  $\beta$ -caroteno, HZ-50: Alimento con 50 mg/kg de zeaxantina, HZ-100: Alimento con 100 mg/kg de zeaxantina, AX-50: Alimento con 50 mg/kg de astaxantina, AX-100: Alimento con 100 mg/kg de astaxantina. Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).

Para evaluar el efecto de los pigmentos sobre la concentración de proteína soluble a través del tiempo, entre los 15 y 30 días de alimentación para cada alimento, se realizó una prueba de Mann-Whitney (Steel y Torie 1997), encontrándose un aumento significativo ( $P$

< 0.05) a los 30 días del experimento en la concentración de proteína soluble en músculo y hepatopáncreas de todos los tratamientos, excepto el control (Fig. 2).

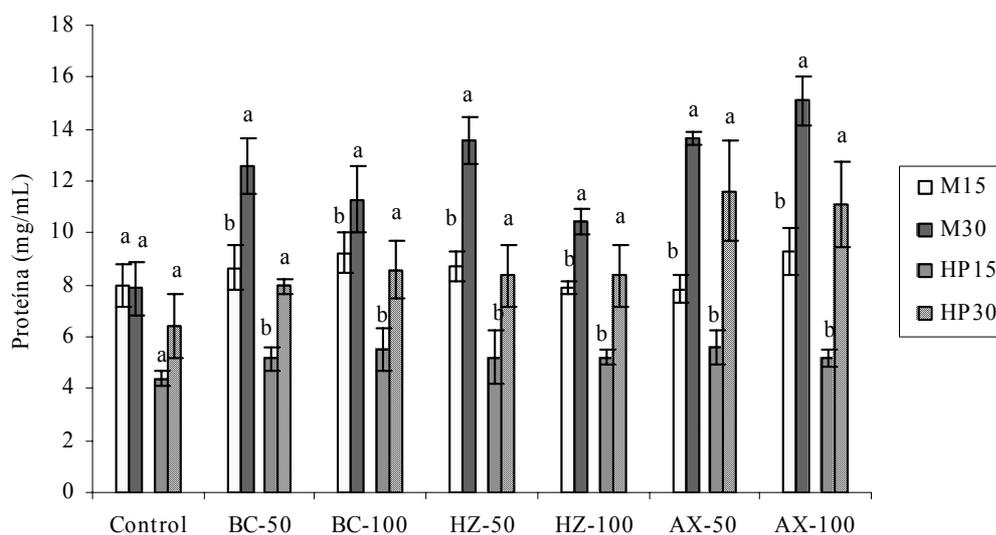


Figura 2. Valores promedio de 3 réplicas ( $\pm$  desviación estándar). Proteína soluble en músculo de camarón *L. vannamei* a los 15 y 30 días (M15 y M30) y en hepatopáncreas a los 15 y 30 días (HP15 y HP30) de ser alimentados con alimentos que contenían 50 y 100 (mg/kg) 2 concentraciones de  $\beta$ -caroteno, zeaxantina y astaxantina. Alimentos: Control, BC-50: Alimento con 50 mg/kg de  $\beta$ -caroteno, BC-100: Alimento con 100 mg/kg de  $\beta$ -caroteno, HZ-50: Alimento con 50 mg/kg de zeaxantina, HZ-100: Alimento con 100 mg/kg de zeaxantina, AX-50: Alimento con 50 mg/kg de astaxantina, AX-100: Alimento con 100 mg/kg de astaxantina. Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).

#### 6.1.4 Actividad catalasa en músculo y hepatopáncreas

En la figura 3 se puede observar el efecto de los pigmentos en la actividad catalasa en músculo y hepatopáncreas, obteniéndose en ambos casos una disminución significativa ( $P < 0.05$ ) en la actividad enzimática a los 30 días de alimentación y un incremento en la actividad catalasa a los 15 días de alimentación. (Fig. 3, inciso A, B).

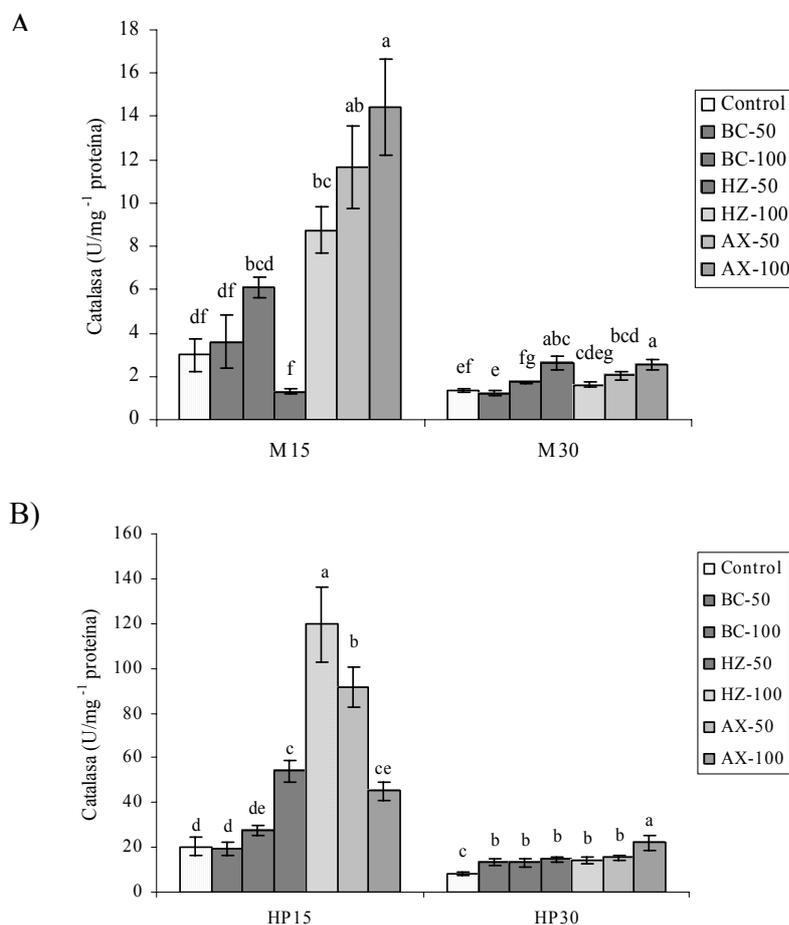


Figura 3. Valores promedio de 3 réplicas ( $\pm$  desviación estándar). Actividad catalasa en músculo (A) de camarón *L. vannamei* a los 15 y 30 días (M15 y M30) y hepatopáncreas (B) a los 15 y 30 días (HP15 y HP30) de ser alimentados con alimentos que contenían 50 y 100 (mg/kg) de  $\beta$ -caroteno, zeaxantina y astaxantina. Alimentos; Control, BC-50: Alimento con 50 mg/kg de  $\beta$ -caroteno, BC-100: Alimento con 100 mg/kg de  $\beta$ -caroteno, HZ-50: Alimento con 50 mg/kg de zeaxantina, HZ-100: Alimento con 100 mg/kg de zeaxantina, AX-50: Alimento con 50 mg/kg de astaxantina, AX-100: Alimento con 100 mg/kg de astaxantina. Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).

La figura 4 muestra el efecto de los pigmentos carotenoides a través del tiempo de alimentación (15 y 30 días), donde se observa que la actividad catalasa en músculo y hepatopáncreas disminuyó a los 30 días de alimentación entre cada uno de los alimentos ( $P < 0.05$ ), excepto el tratamiento HZ-50 en músculo (Fig. 4, inciso A) y AX-100 en

hepatopáncreas (Fig. 4, inciso B), los cuales presentaron una menor actividad a los 15 días del experimento.

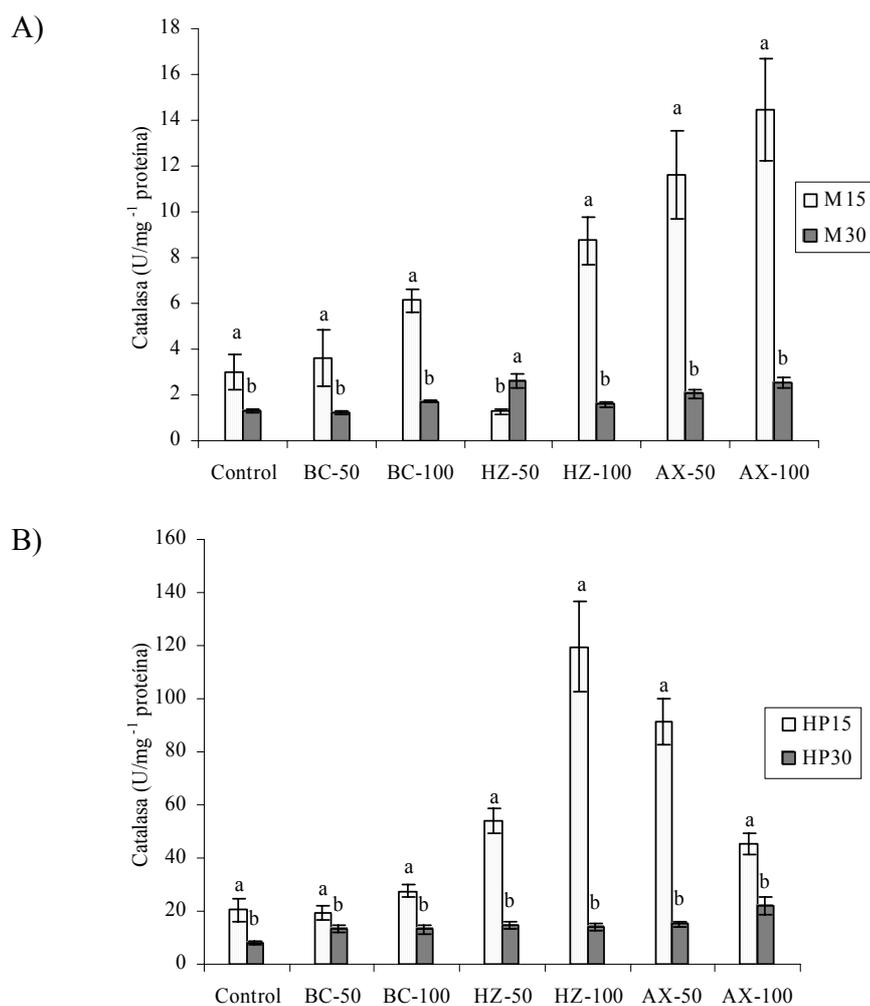


Figura 4. Valores promedio de 3 réplicas ( $\pm$  desviación estándar). Efecto en el tiempo de alimentación con pigmentos sobre la actividad catalasa en músculo de camarón *L. vannamei* entre los 15 y 30 días (A) y hepatopáncreas entre 15 y 30 días (B) de ser alimentados con alimentos que contenían 50 y 100 (mg/kg) de  $\beta$ -caroteno, zeaxantina y astaxantina. Alimentos; T-0: Alimento PIASA 40 % proteína (día cero), Control, BC-50: Alimento con 50 mg/kg de  $\beta$ -caroteno, BC-100: Alimento con 100 mg/kg de  $\beta$ -caroteno, HZ-50: Alimento con 50 mg/kg de zeaxantina, HZ-100: Alimento con 100 mg/kg de zeaxantina, AX-50: Alimento con 50 mg/kg de astaxantina, AX-100: Alimento con 100 mg/kg de astaxantina. Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).

### 6.1.5 Actividad SOD en músculo y hepatopáncreas

La actividad SOD en músculo a los 15 días fue significativamente menor en los tratamientos HZ-50 y HZ-100 con respecto al control. A los 30 días, la actividad disminuyó significativamente ( $P < 0.05$ ) en todos los tratamientos respecto al control, aunque éste último se mantuvo a un nivel cercano al que tenía al día 15. (Fig. 5, inciso A). En la figura 5 (incisos A y B), se puede apreciar que tanto en músculo como en hepatopáncreas, a los 30 días de alimentación existe una tendencia a disminuir la actividad SOD.

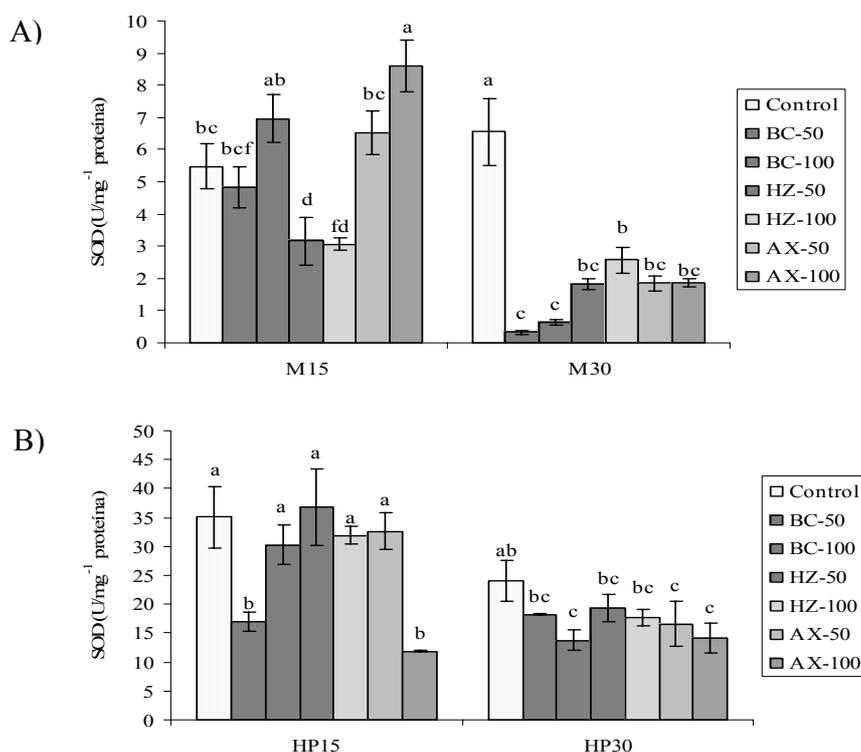


Figura 5. Valores promedio de 3 réplicas ( $\pm$  desviación estándar). Actividad Superóxido Dismutasa en músculo (A) de camarón *L. vannamei* a los 15 y 30 días (M15 y M30) y hepatopáncreas (B) a los 15 y 30 días (HP15 y HP30) de ser alimentados con alimentos que contenían 50 y 100 (mg/kg) de  $\beta$ -caroteno, zeaxantina y astaxantina. Alimentos; Control, BC-50: Alimento con 50 mg/kg de  $\beta$ -caroteno, BC-100: Alimento con 100 mg/kg de  $\beta$ -caroteno, HZ-50: Alimento con 50 mg/kg de zeaxantina, HZ-100: Alimento con 100 mg/kg de zeaxantina, AX-50: Alimento con 50 mg/kg de astaxantina, AX-100: Alimento con 100 mg/kg de astaxantina. Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).

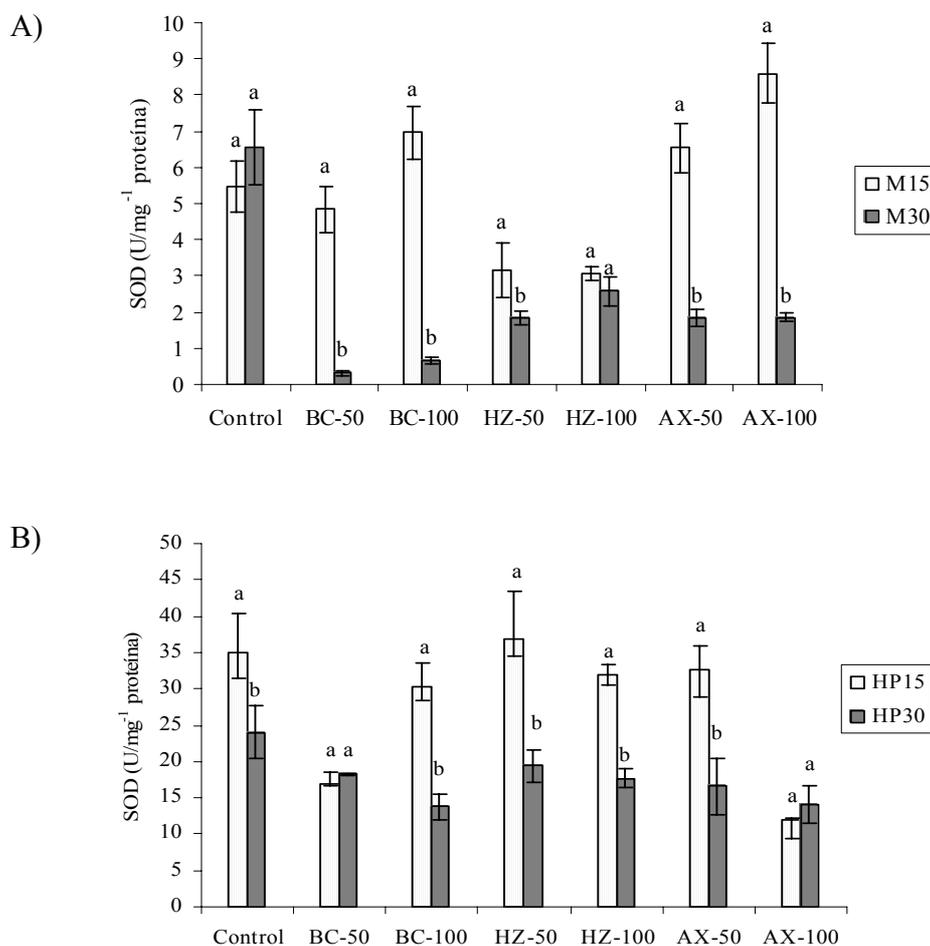


Figura 6. Valores promedio de 3 réplicas ( $\pm$  desviación estándar). Actividad Super Oxido Dismutasa en músculo de camarón *L. vannamei* a los 15 y 30 días (A) y hepatopáncreas a los 15 y 30 días (B) de ser alimentados con alimentos que contenían 50 y 100 (mg/kg) de  $\beta$ -caroteno, zeaxantina y astaxantina. Alimentos; Control, BC-50: Alimento con 50 mg/kg de  $\beta$ -caroteno, BC-100: Alimento con 100 mg/kg de  $\beta$ -caroteno, HZ-50: Alimento con 50 mg/kg de zeaxantina, HZ-100: Alimento con 100 mg/kg de zeaxantina, AX-50: Alimento con 50 mg/kg de astaxantina, AX-100: Alimento con 100 mg/kg de astaxantina. Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).

Los tratamientos BC-50, BC-100, HZ-50, AX-50 y AX-100 mostraron una disminución significativa en la actividad SOD en músculo a los 30 días de alimentación con respecto a los 15 días (Fig. 6, inciso A). Se observó una disminución significativa ( $P < 0.05$ ) en la actividad SOD en hepatopáncreas a los 30 días de alimentación en los tratamientos BC-100, HZ-50, HZ-100 y AX-50 (Fig.6, inciso B).

### 6.1.6 Conteo total de hemocitos (CTH)

En la figura 7 se puede observar el efecto del nivel de concentración y el tipo de pigmento, donde el número total de hemocitos fue significativamente mayor ( $P < 0.05$ ) a los 30 días de alimentación con las dietas que contenían astaxantina a 100 mg/kg ( $22.77 \times 10^6$  cél /mL), zeaxantina a 50 mg/kg ( $16.95 \times 10^6$  cél /mL) y zeaxantina a 100 mg/kg ( $12.98 \times 10^6$  cél /mL) respecto a los demás tratamientos.

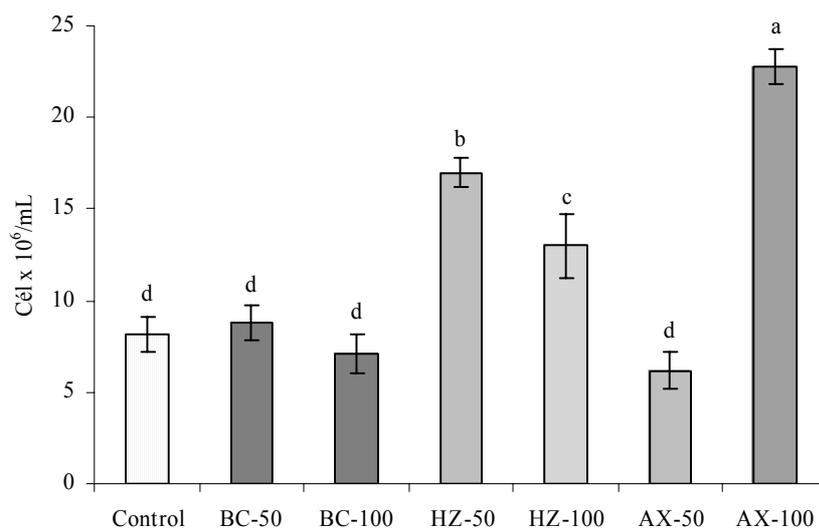


Figura 7. Valores promedio de 3 réplicas ( $\pm$  desviación estándar). Efecto del nivel de concentración de  $\beta$ -caroteno, zeaxantina y astaxantina en el conteo total de hemocitos a los treinta días del experimento. Control, BC-50: Alimento con 50 mg/kg de  $\beta$ -caroteno, BC-100: Alimento con 100 mg/kg de  $\beta$ -caroteno, HZ-50: Alimento con 50 mg/kg de zeaxantina, HZ-100: Alimento con 100 mg/kg de zeaxantina, AX-50: Alimento con 50 mg/kg de astaxantina, AX-100: Alimento con 100 mg/kg de astaxantina. Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ )

## 6.2 Experimento 2. Evaluación de la capacidad de los carotenoides para prevenir la infección del virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV) en camarón blanco.

### 6.2.1 Dosis letal media (DL<sub>50</sub>)

En el experimento previo para determinar la dilución del virus más adecuada para realizar la prueba del reto viral en organismos alimentados con los diferentes pigmentos, se observó que a las doce horas post-infección se manifiesta una sintomatología similar en los organismos de todas las diluciones administradas, caracterizada por una coloración rojiza de urópodos y pleópodos, expansión de cromatóforos, natación errática y letargia. A las 24 horas, la dilución 1:5 manifestó un 100% de mortalidad (Fig.8). Los tratamientos con las diluciones 1:50, 1:500 y 1:5000 presentaron una mortalidad del 50% entre las 48 y 60 horas. En base a estos resultados se seleccionó la dilución 1:500 como la dosis letal media DL<sub>50</sub>.

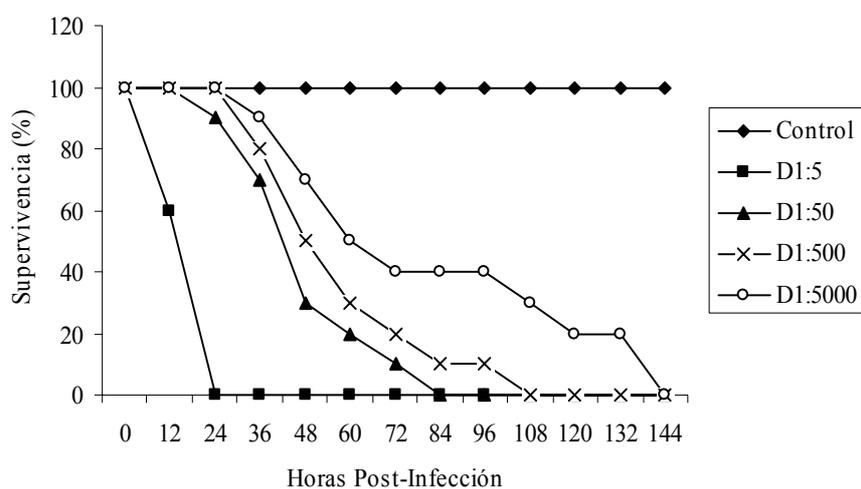


Figura 8. Valores promedio de 3 réplicas. Curvas de supervivencia de *L. vannamei* infectados con cuatro diluciones (1:5, 1:50, 1:500, 1:5000) del virus de la mancha blanca (WSSV).

### 6.2.2 Reto viral con WSSV

Los organismos que se infectaron con la dilución 1:500, presentaron la misma sintomatología a partir de las 12 horas post-infección; coloración rojiza de urópodos y pleópodos, natación errática, disminución en el consumo del alimento, estado de letargia, postración dorso lateral, expansión de cromatóforos, y en fase terminal, una coloración rojiza generalizada. Se observaron alteraciones hematológicas caracterizadas por la presencia de células necróticas con núcleos picnóticos y cariorréxicos, hemolinfa con coloraciones rosadas, provocadas por una inadecuada actividad fenoloxidasa (PO) plasmática (Motesdeoca, *et al.*, 2002). El análisis de PCR-WSSV resultó positivo para todos los tratamientos infectados, y negativo para el blanco. Cuando el control positivo manifestó el 50 % de mortalidad, el blanco presentó (0 %), BC-100 (30 %), HZ-100 (70 %) y AX-100 (70 %) (Fig. 9).

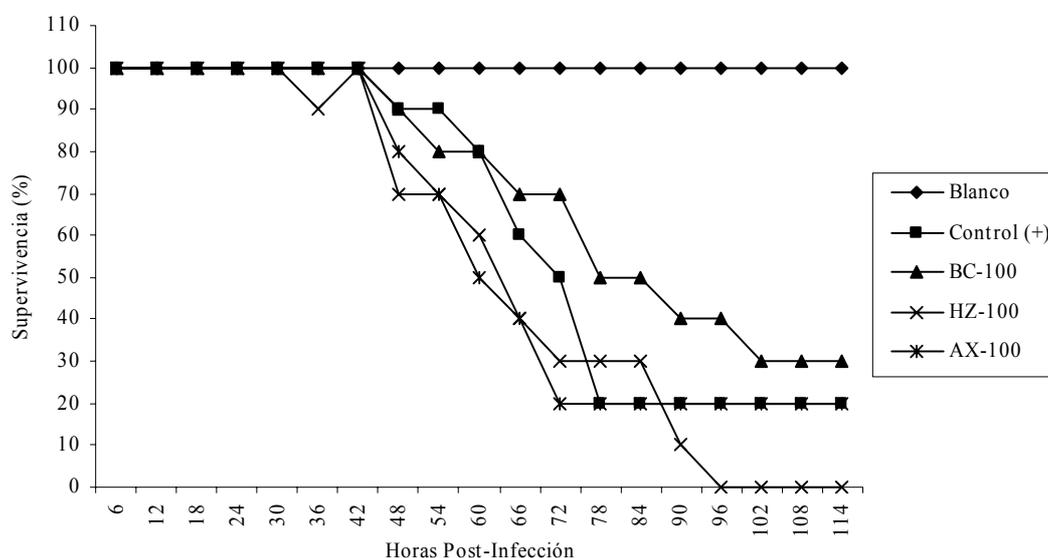


Figura 9. Valores promedio de 2 réplicas. Curvas de supervivencia de *L. vannamei* infectados con una dilución 1:100 del virus de la mancha blanca (WSSV), previamente alimentados durante 15 días con alimentos conteniendo  $\beta$ -caroteno, zeaxantina y astaxantina. Alimentos; Control (-): Sin virus, Control (+): Con virus, BC-100: Alimento con 100 mg/kg de  $\beta$ -caroteno, HZ-100: Alimento con 100 mg/kg de zeaxantina, AX-100: Alimento con 100 mg/kg de astaxantina.

**Tabla 9. Efecto de carotenoides en la supervivencia de *L. vannamei* frente a un reto viral (WSSV).**

Tratamiento	Supervivencia (%)
Blanco	100 ± 0.0 <sup>a</sup>
Control (+)	50 ± 14.14 <sup>b</sup>
BC-100	70 ± 14.14 <sup>b</sup>
HZ-100	30 ± 14.14 <sup>b</sup>
AX-100	30 ± 14.14 <sup>b</sup>

Valores promedio de dos réplicas (± desviación estándar). Letras diferentes en la columna indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).

Cuando el control positivo registró un 50% de supervivencia, el blanco se mantuvo con el 100% de supervivencia, BC-100 (70%), HZ-100 (30%) y AX-100 (30%). A pesar de que el BC-100 muestra una diferencia del 20% respecto al control positivo, todos los tratamientos disminuyeron significativamente ( $P < 0.05$ ) respecto al blanco (Tabla 9).

### 6.2.3 Conteo total de hemocitos (CTH)

A las 72 horas del reto viral, la cantidad de hemocitos circulantes (CTH) disminuyó significativamente ( $P < 0.05$ ) de  $12.3 \times 10^6$  cél/mL en el blanco a  $0.73-2.55 \times 10^6$  cél/mL en todos los tratamientos (Fig. 10).

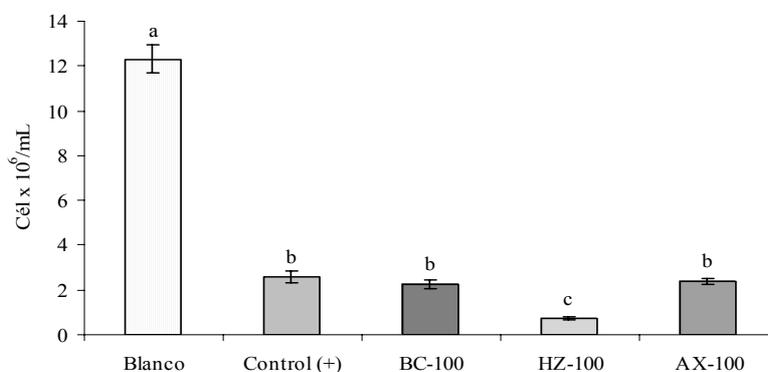


Figura 10. Valores promedio de 3 organismos ( $\pm$  desviación estándar). Conteo Total de Hemocitos obtenidos en organismos de *L. vannamei*, a partir del 50 % de sobrevivencia, infectados con una dilución 1:500 con el virus de la mancha blanca (WSSV), previamente alimentados durante 15 días con alimento conteniendo  $\beta$ -caroteno, zeaxantina y astaxantina. Alimentos; control (-): sin infección viral, control (+): con infección viral, BC-100: alimento con 100 mg/kg de  $\beta$ -caroteno, HZ-100: alimento con 100 mg/kg de zeaxantina, AX-100: alimento con 100 mg/kg de astaxantina. Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).

Se observó una variación en la coloración de la hemolinfa clasificándose de la siguiente manera: Azul fuerte: blanco; azul tenue-rosáceo: control (+); rosáceo: BC-100; café tenue: HZ-100 y AX-100. El sistema de coagulación en la hemolinfa se vio afectado por la infección viral, evidenciándose por tiempos de coagulación mayores a 90 segundos en todos los tratamientos evaluados, y tiempos de coagulación menores a 10 segundos que el blanco. Los hemocitos infectados presentaban un alto grado de degranulación, núcleos picnóticos y estado de cariorréxis (Tabla 10).

#### 6.2.4 Proteína plasmática

En la figura 11 se observa que a las 72 horas post-infección, la concentración de proteína plasmática disminuyó significativamente ( $P < 0.05$ ) de 228.6 mg/mL en el blanco,

a menos de 100 mg/mL en todos demás tratamientos, siendo el tratamiento BC-100 el que menor proteína presentó.

**Tabla 10. Características observadas en hemolinfa y hemocitos en organismos en fase terminal infectados con el virus de la mancha blanca (WSSV).**

Tratamientos	Hemolinfa		Hemocitos
	Coloración	T. de coagulación	Características celulares
Blanco	Azul fuerte	< 10 seg.	Normales.
Control (+)	Azul tenue-rosáceo	> 90 seg.	Degranulación, Núcleos picnóticos.
BC-100	rosáceo	> 90 seg.	Degranulación, Núcleos picnóticos.
HZ-100	café tenue	> 90 seg.	Degranulación, Núcleos picnóticos y cariorréxicos.
AX-100	café tenue	> 90 seg.	Degranulación, Núcleos picnóticos y cariorréxicos.

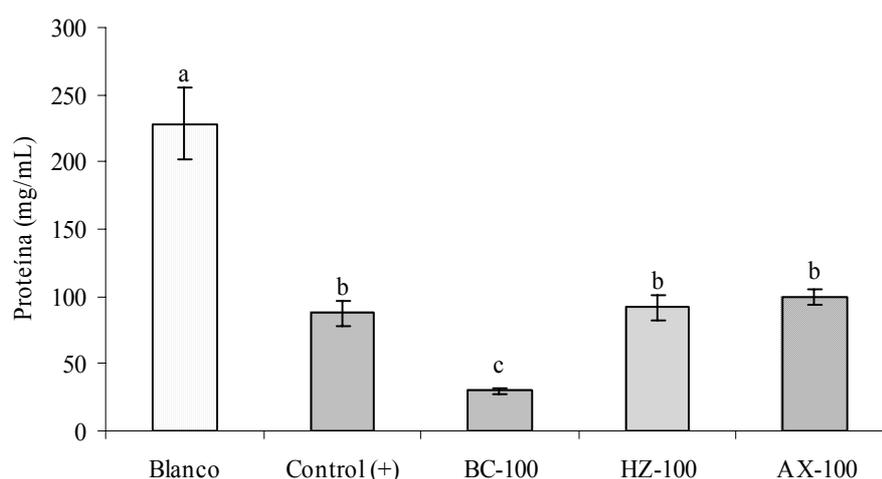


Figura 11. Valores promedio de 3 organismos ( $\pm$  desviación estándar) .Concentración de proteína plasmática a las 72 horas post-infección con el virus de la mancha blanca (WSSV). Alimentos; Blanco: Sin infección viral, control (+): con infección viral, BC-100: Alimento con 100 mg/kg de  $\beta$ -caroteno, HZ-100: Alimento con 100 mg/kg de zeaxantina, AX-100: Alimento con 100 mg/kg de astaxantina. Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).

### 6.2.5 Análisis histopatológico

El análisis histológico de las laminillas examinadas muestra dos lesiones típicas de WSSV: a) la presencia de abundantes inclusiones esféricas basofílicas de varios diámetros, que son núcleos hipertrofiados picnóticos o cariorréxicos en las células de origen ectodérmico y mesodérmico como el epitelio cuticular de todo el organismo (Fig. 12, *i*), del estómago (Fig. 12, *ii*), glándula antenal (Fig. 12, *iv*) y de los apéndices. b) necrosis del órgano linfóide (Fig. 12, *iii*) y tejido conjuntivo en branquias (Fig. 12, *ii*) caracterizada por la presencia de picnosis nuclear y cariorréxis, es común encontrarse un ligero incremento en la eosinofilia citoplasmática de las células afectadas (pero por la tinción no se pudo observar). No se observaron infiltraciones hemocíticas y lesiones melanizadas, por lo que se infiere que no hubo respuesta del hospedero a la infección. El 100% de los organismos infectados con la dilución 1:500 presentaron lesiones patognomónicas del WSSV, las cuales fueron confirmadas mediante PCR. La Tabla 11 muestra el daño histológico generado por el agente infeccioso viral graduado en cuatro niveles en base a las dos lesiones descritas anteriormente para cada órgano y tejido.

**Tabla 11. Nivel de infección generado por el WSSV en órganos y tejidos de *L. vannamei*.**

<b>Alimentos</b>	<b>OL</b>	<b>EC</b>	<b>GA</b>	<b>B</b>	<b>TH</b>	<b>IP</b>
Blanco	-	-	-	-	-	-
Control (+)	+++	++++	++	+++	+++	+++
BC-100	++++	++++	+	++	++++	++
HZ-100	++++	++++	++++	++++	++++	++
AX-100	++++	++++	+++	+++	++++	++++

OL: Órgano linfoide, EC: Epitelio cuticular, GA: Glándula antenal, B: Branquias, TH: Tejido hematopoyético, IP: Intestino posterior. Nivel de infección, (-): Sin infección, (+): Infección sin expresión de enfermedad, (++) : Infección con expresión de enfermedad moderada, (+++) : Infección con expresión de enfermedad severa, (++++): Infección con expresión de enfermedad muy severa.

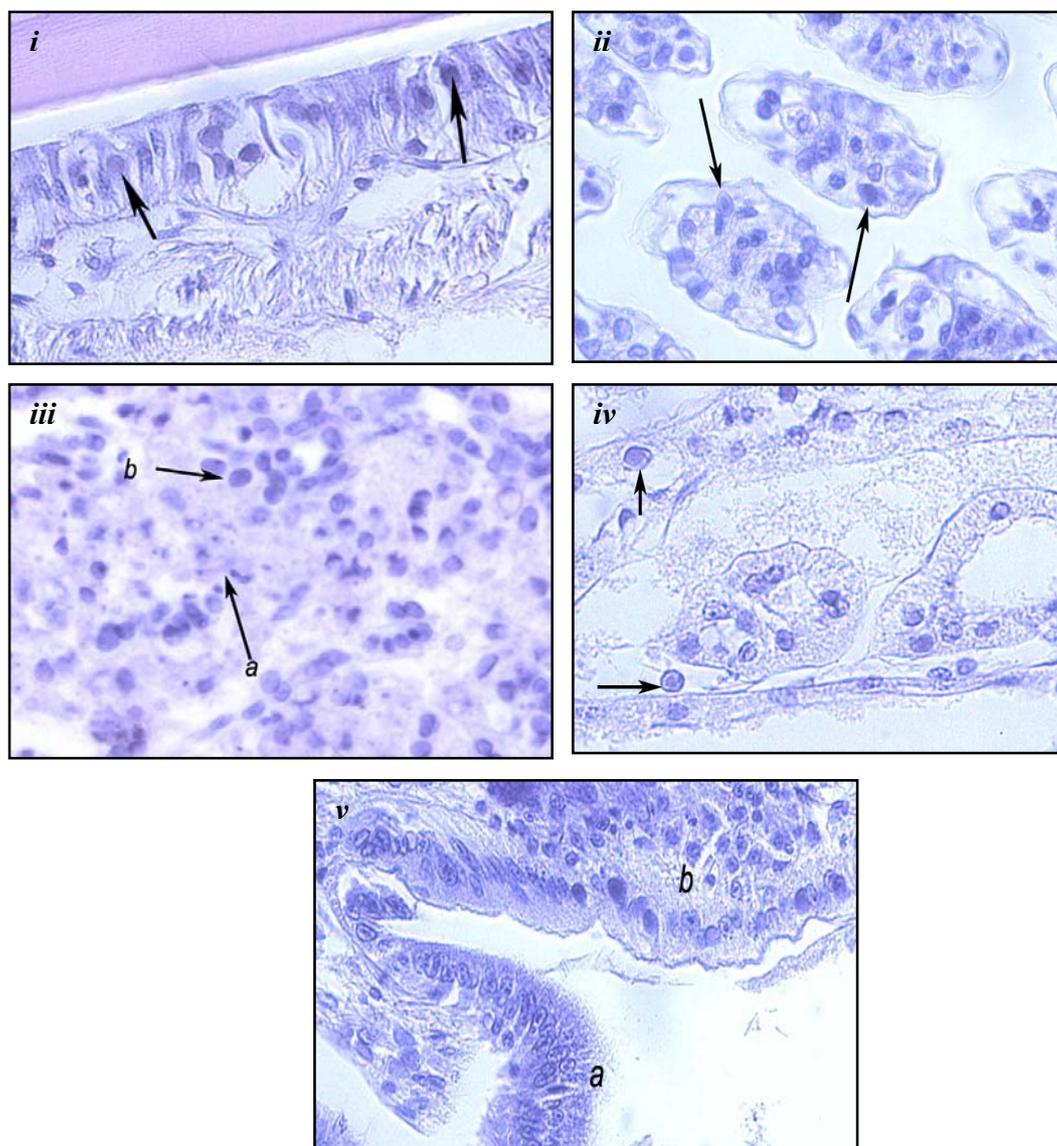


Figura 12. Cortes histológicos longitudinales de *L. vannamei* infectados con WSSV. Descripción de imágenes. *i*: Cefalotórax mostrando cuerpos de inclusión intranuclear en epitelio cuticular, *ii*: Branquias mostrando cuerpos de inclusión, *iii*: Necrosis en órgano linfoide (a) y cuerpos de inclusión intranuclear (b), *iv*: Glándula antenal mostrando cuerpos de inclusión y *v*: sección histológica del abdomen dónde se observa el caecum medio posterior sin cuerpos de inclusión (a) y el intestino posterior (Hindgut) con cuerpos de inclusión y necrosis (Téc. H&E X 400).

### 6.3 Experimento 3. Evaluación de la capacidad de los carotenoides para prevenir la infección producida por *V. harveyi*.

#### 6.3.1 Determinación de la dosis letal media (DL<sub>50</sub>)

La figura 13 muestra la supervivencia obtenida en *L. vannamei* retado con *V. harveyi* a dosis de  $1 \times 10^7$ ,  $8 \times 10^6$ ,  $4 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^6$  y  $1 \times 10^5$  (ufc/mL), identificadas como D1, D2, D3, D4 y D5 respectivamente, preparadas a partir de una solución stock con una concentración de  $(1 \times 10^{12}$  ufc/mL). Entre las 36 y 48 horas post-infección, la dosis D2 registró el 50 % de supervivencia (DL<sub>50</sub>), mientras que los demás tratamientos registraron los siguientes porcentajes: D1 (0 %), D3 (66.67 %), D4 y D5 (100 %).

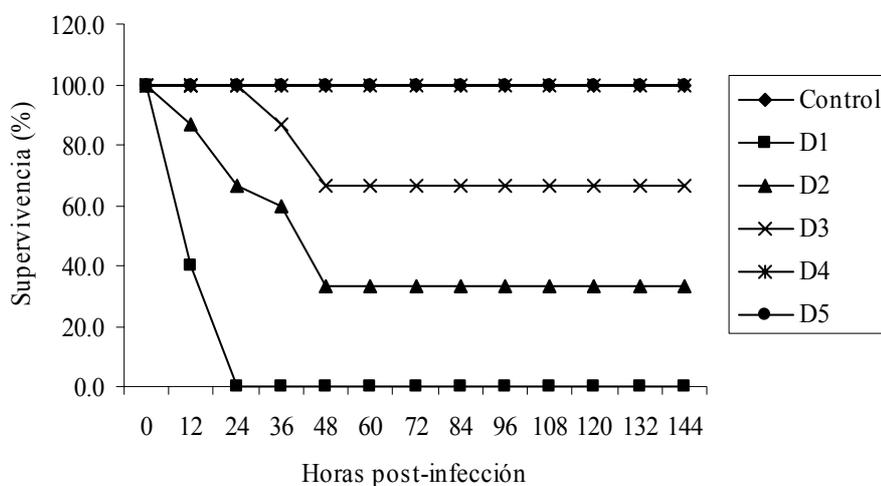


Figura 13. Valores promedio de 3 réplicas  $\pm$  desviación estándar. Curvas de supervivencia de *L. vannamei* infectados con cinco dosis conteniendo *V. harveyi*. Dosis, Control: Solución salina estéril, D1:  $1 \times 10^7$  ufc/mL, D2:  $8 \times 10^6$  ufc/mL, D3:  $4 \times 10^6$  ufc/mL, D4:  $1 \times 10^6$  ufc/mL y D5:  $1 \times 10^5$  ufc/mL. Se inyectaron 120  $\mu$ L de inóculo por camarón con un total de 15 organismos por dosis.

### 6.3.2 Reto con *V. harveyi*

En las curvas de supervivencia obtenidas con el reto bacteriano (seis días) se observa que la mortalidad que presentaron todos los tratamientos se llevó a cabo en las primeras 48 horas (Fig. 14). Durante el reto bacteriano con *V. harveyi* se registró un individuo muerto correspondiente al blanco el cual no presentó lesiones típicas de vibriosis. En contraste, en los tratamientos retados con una dosis de  $8 \times 10^6$  ufc/mL a las 24 y 144 horas post-infección, se obtuvo una mayor supervivencia en BC-100 ( $P < 0.05$ ) respecto al control positivo, HZ-100 y AX-100 (Tabla 12).

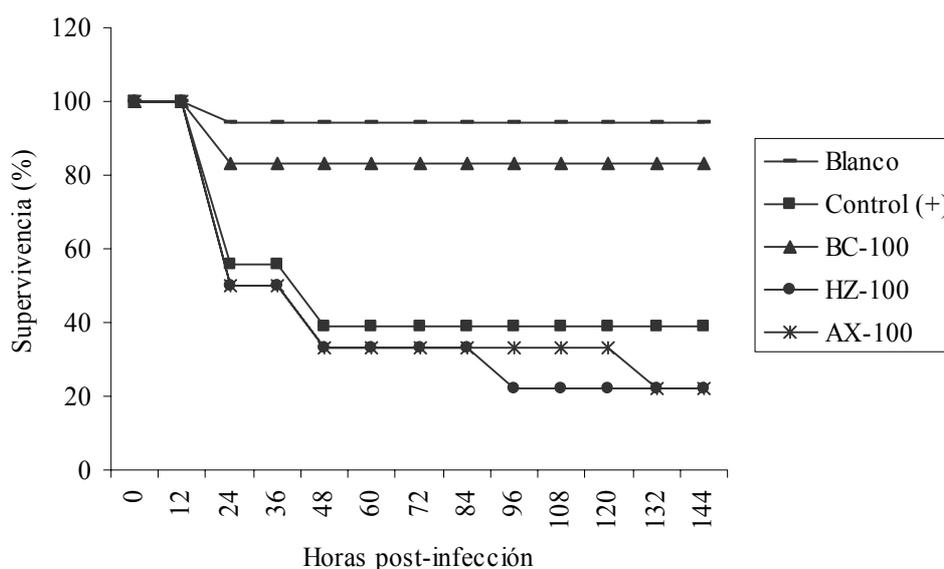


Figura 14. Valores promedio de 3 réplicas. Curvas de supervivencia de *L. vannamei* infectados con una dosis de  $9.2 \times 10^5$  ufc/camarón de *V. harveyi*, previamente alimentados durante 15 días con alimento conteniendo  $\beta$ -caroteno, zeaxantina y astaxantina. Alimentos; Control (-): Solución salina estéril, Control (+): Con bacteria, BC-100: Alimento con 100 mg/kg de  $\beta$ -caroteno, HZ-100: Alimento con 100 mg/kg de zeaxantina, AX-100: Alimento con 100 mg/kg de astaxantina.

**Tabla 12. Supervivencia obtenida en *L. vannamei* retados con *V. harveyi*.**

Tratamientos	Supervivencia (%)	
	48 horas	144 horas
Blanco	94.44 ± 9.62 <sup>a</sup>	94.44 ± 9.62 <sup>a</sup>
Control (-)	38.89 ± 9.62 <sup>b</sup>	38.89 ± 9.62 <sup>b</sup>
BC-100	83.33 ± 16.67 <sup>a</sup>	83.33 ± 16.67 <sup>a</sup>
HZ-100	33.33 ± 16.67 <sup>b</sup>	22.22 ± 9.62 <sup>b</sup>
AX-100	33.33 ± 16.67 <sup>b</sup>	22.22 ± 9.62 <sup>b</sup>

Valores promedio de 3 réplicas (± desviación estándar). Letras diferentes en las columnas indican diferencias estadísticas significativas ( $P < 0.05$ ). Alimentos; Control (-): Sin bacteria, Control (+): Con bacteria, BC-100: Alimento con 100 mg/kg de  $\beta$ -caroteno, HZ-100: Alimento con 100 mg/kg de zeaxantina, AX-100: Alimento con 100 mg/kg de astaxantina.

### 6.3.3 Proteína plasmática

La concentración de proteína plasmática disminuyó significativamente ( $P < 0.05$ ) en el control positivo a las 48 (79.05 mg/mL) y 144 (52.49 mg/mL) horas post-infección respecto a los demás tratamientos a las 48 horas (Control (-): 119.8 mg/mL; BC-100: 117.5 mg/mL; HZ-100: 131.65 mg/mL y AX-100: 129.82 mg/mL) y 144 horas (Blanco; 111.68 y BC-100; 118.72). En la figura 15 se puede observar que los tratamientos con pigmentos mantienen aproximadamente el mismo nivel de concentración de proteína plasmática a las 48 y 144 horas post-infección que el blanco.

### 6.3.4 Actividad SOD en hemocitos

En la figura 16 se puede observar que la actividad SOD en hemocitos a través del tiempo 48 y 144 horas se mantuvo entre las 55 y 70 unidades, excepto el tratamiento AX-

100 que aumento significativamente ( $P < 0.05$ ) respecto al blanco a las 48 horas post-infección.

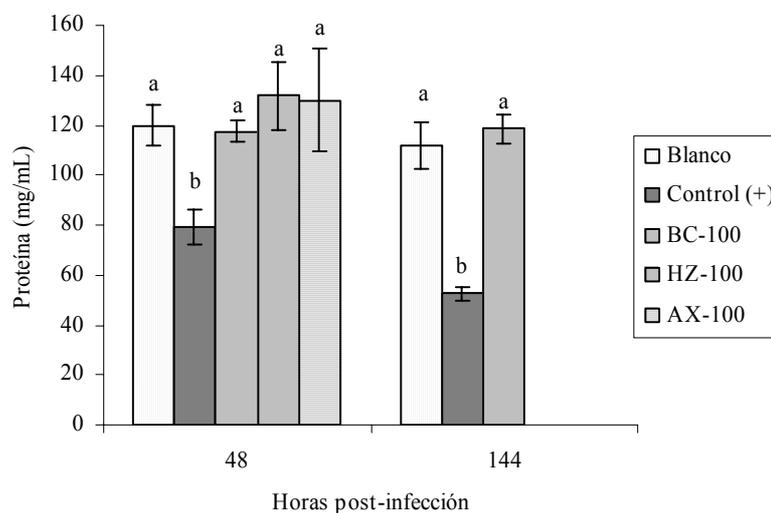


Figura 15. Valores promedio de 3 réplicas ( $\pm$  desviación estándar). Concentración de proteína plasmática a las 48 y 144 horas post-infección con una dosis de  $8 \times 10^6$  ufc/mL de *V. harveyi*. Alimentos; Control (-): Sin bacteria, Control (+): Con bacteria, BC-100: Alimento con 100 mg/kg de  $\beta$ -caroteno, HZ-100: Alimento con 100 mg/kg de zeaxantina, AX-100: Alimento con 100 mg/kg de astaxantina. Letras diferentes sobre las barras indican diferencias estadísticas significativas ( $P < 0.05$ ).

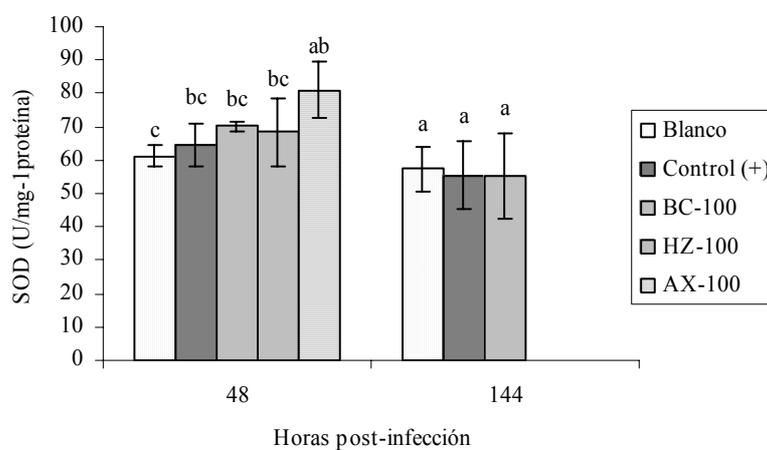


Figura 16. Actividad SOD en hemocitos a las 48 y 144 horas post-infección con una dosis de  $8 \times 10^6$  ufc/mL de *V. harveyi*. Alimentos; Control (-): Sin bacteria, Control (+): Con bacteria, BC-100: Alimento con 100 mg/kg de  $\beta$ -caroteno, HZ-100: Alimento con 100 mg/kg de zeaxantina, AX-100: Alimento con 100 mg/kg de astaxantina. Letras diferentes sobre las barras indican diferencias estadísticas significativas ( $P < 0.05$ ).

### 6.3.5 Anión súper oxido ( $O_2^-$ )

La producción endógena de anión súper oxido ( $O_2^-$ ) en hemocitos durante el reto bacteriano, aumentó significativamente ( $P < 0.05$ ) en los tratamientos con pigmentos respecto al control positivo y el blanco a las 48 horas post-infección. A las 144 horas post-infección se observa una disminución general en la producción de anión superóxido, no encontrándose diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) entre los tratamientos control positivo, blanco y BC-100 (Fig. 17)

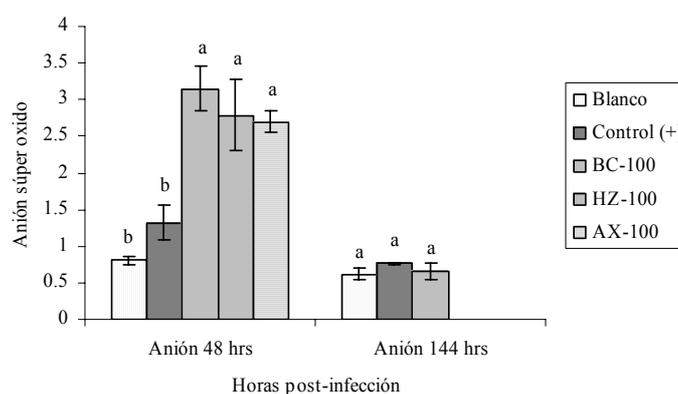


Figura 17. Producción de anión súper oxido ( $O_2^-$ ) en hemocitos a las 48 y 144 horas post-infección con una dosis de  $8 \times 10^6$  ufc/mL de *V. harveyi*. Alimentos; Control (-): Sin bacteria, Control (+): Con bacteria, BC-100: Alimento con 100 mg/kg de  $\beta$ -caroteno, HZ-100: Alimento con 100 mg/kg de zeaxantina, AX-100: Alimento con 100 mg/kg de astaxantina. Letras diferentes sobre las barras indican diferencias estadísticas significativas ( $P < 0.05$ ).

### 6.3.6 Conteo total de hemocitos (CTH) y tiempo de coagulación

A las 48 horas post-infección el conteo total de hemocitos (CTH) disminuyó significativamente ( $P < 0.05$ ) en todos los tratamientos: Control positivo:  $4.79 \times 10^6$ ; BC-100:  $2.3 \times 10^6$ ; HZ-100:  $3.18 \times 10^6$  y AX-100:  $4.74 \times 10^6$  (cél/mL) respecto al blanco ( $11.75 \times 10^6$ ), siendo el tratamiento BC-100 el más bajo, ya que fue significativamente menor que el blanco (Fig. 18). A las 144 horas post infección el conteo total de hemocitos

aumentó significativamente en el tratamiento de BC-100 ( $11.25 \times 10^6$  cel/ml) respecto al control positivo ( $6.9 \times 10^6$  cel/ml).

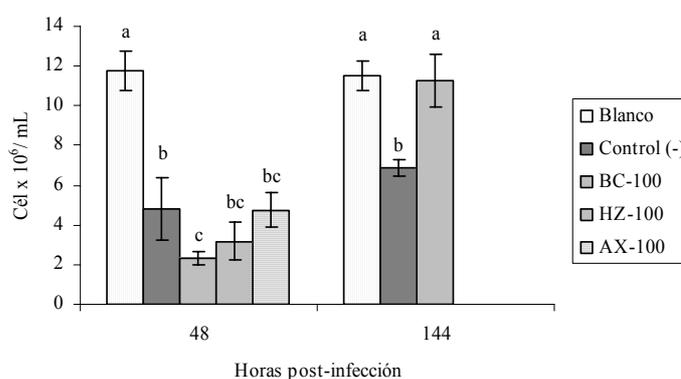


Figura 18. Conteo total de hemocitos (CTH) a las 48 y 144 horas post-infección con una dosis de  $8 \times 10^6$  ufc/mL de *V. harveyi*. Alimentos; Control (-): Sin bacteria, Control (+): Con bacteria, BC-100: Alimento con 100 mg/kg de  $\beta$ -caroteno, HZ-100: Alimento con 100 mg/kg de zeaxantina, AX-100: Alimento con 100 mg/kg de astaxantina. Letras diferentes sobre las barras indican diferencias estadísticas significativas ( $P < 0.05$ ).

El tiempo de coagulación se vio afectado a las 48 horas post-infección, haciéndose más notable en el control positivo (20-30 segundos), regresando a condiciones normales a las 144 horas (0-5 segundos); notándose una mejor respuesta en el tiempo de coagulación (5-10 seg) con el tratamiento BC-100 (Tabla 13).

### 6.3.7 Análisis histopatológico

El análisis histopatológico de las laminillas examinadas en tejidos infectados por *V. harveyi* (Fig. 19) mostró básicamente vibriosis sistémica, caracterizada por granulomas, nódulos, necrosis, edemas y atrofia celular, distribuidos en diferentes órganos y tejidos, tales como: hepatopáncreas, órgano linfoide, ciego medio anterior, corazón, glándula antenal, branquias, tejido nervioso, tejido conectivo general, tejido hematopoyético y músculo.

En la Tabla 14 se resume el daño causado por el agente infeccioso en órganos y tejidos, graduado en cuatro cruces, donde cada cruz evidencia un grado de infección evaluado por la presencia de granulomas, nódulos y necrosis.

**Tabla 13. Tiempo de coagulación de hemolinfa de *L. vannamei* a las 0, 48 y 144 horas post-infección con *V. harveyi*.**

Tratamientos	Tiempo de coagulación		
	0 horas	48 horas	144 horas
Blanco	0-5 seg	0-5 seg	0-5 seg
Control (+)	0-5 seg	20-30 seg	0-5 seg
BC-100	0-5 seg	5-10 seg	0-5 seg
HZ-100	0-5 seg	20-30 seg	0-5 seg
AX-100	0-5 seg	20-30 seg	0-5 seg

**Tabla 14. Nivel de infección generado por el *V. harveyi* en órganos y tejidos de *L. vannamei*.**

Órganos y tejidos analizados	48 Hrs					144 Hrs.	
	Blanco	Control (+)	BC-100	HZ-100	AX-100	Control (+)	BC-100
HP	-	++	-	+	+	+	-
OL	-	++	+	+	++	+++	+
CMA	-	+	+	-	+	-	-
C	-	++	-	+	-	++	-
GA	-	++	+	+	-	-	-
B	-	++	+	++	+	++	+
TN	-	++	-	+	++	-	-
TCG	-	+++	+	++	++	+	-
TH	-	++	-	-	-	-	-
M	-	++++	+++	++++	+++	+++	++

HP: hepatopáncreas, OL: órgano linfoide, CMA: caecum medio anterior, C: corazón GA: glándula antenal, B: branquias, TN: tejido nervioso, TCG: tejido conectivo general, TH: tejido hematopoyético y M: músculo. Nivel de infección, (-): sin infección, (+): infección sin expresión de enfermedad, (++) : infección con expresión de enfermedad moderada, (+++) : infección con expresión de enfermedad severa, (++++): infección con expresión de enfermedad muy severa.

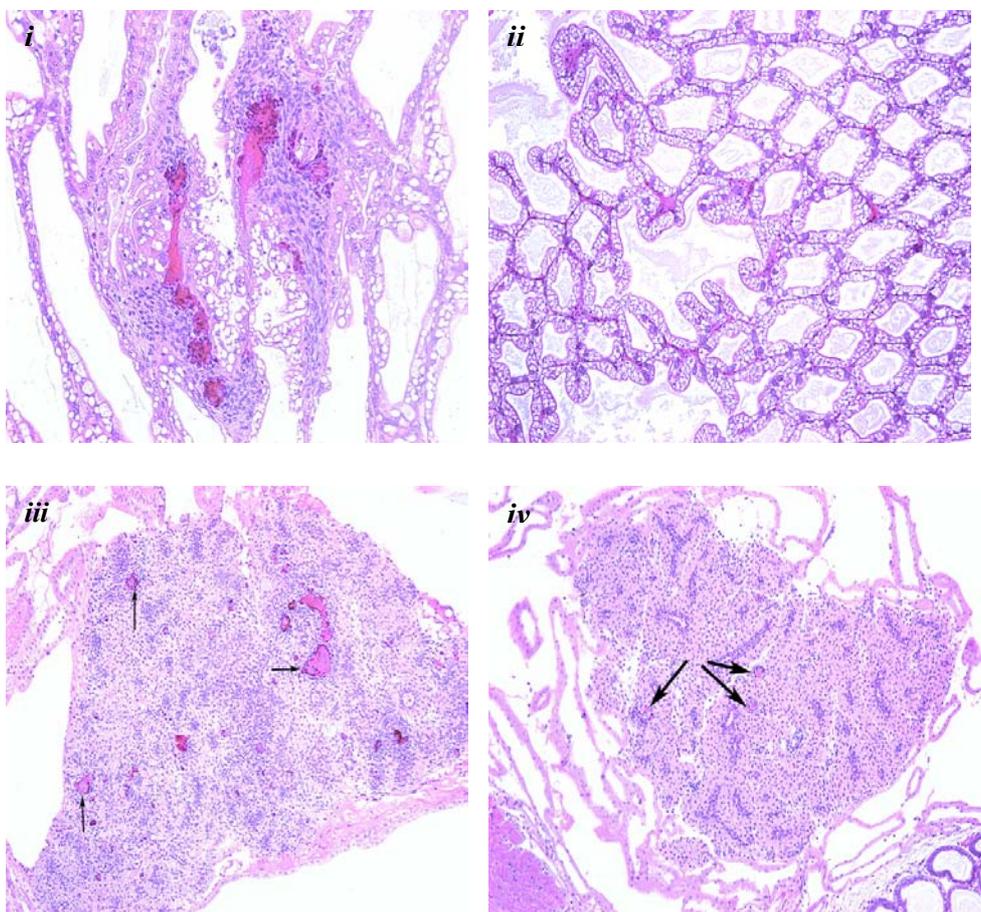


Figura 19. Cortes longitudinales de cefalotórax de *L. vannamei* infectados con *V. harveyi*. Descripción de imágenes. *i*: Hepatopáncreas de control positivo mostrando granulomas y nódulos (Téc. H&E X 400), *ii*: Hepatopáncreas de BC-100 sin presencia de granulomas o nódulos (Téc. H&E X 200), *iii*: Control positivo mostrando granulomas y nódulos en órgano linfoide y *iv*: BC-100 mostrando pequeños nódulos y ausencia de granulomas en órgano linfoide. (Téc. H&E X 100).

## VII DISCUSIÓN

### **7.1 Efecto de $\beta$ -caroteno, zeaxantina y astaxantina, a dos niveles de inclusión en el alimento, sobre el crecimiento, la utilización del alimento y la respuesta inmune de juveniles de *L. vannamei*.**

Los pigmentos carotenoides en crustáceos funcionan como agentes pigmentantes, antioxidantes, como fuente de pro-vitamina A, protección celular contra daños oxidativos, y potencial reproductivo (Chien and Jeng 1992; Menasveta 1993; Liñan-Cabello *et al.*, 2002), los cuales, suministrados a través del alimento, en organismos de importancia acuícola, como truchas y camarones han mostrado no afectar el crecimiento, la utilización del alimento e incrementan la respuesta inmune inespecífica (Amar, *et al.*, 2001; Arredondo-Figueroa *et al.*, 2003; Boonyaratpalin *et al.*, 2001). En este trabajo, se demuestra que el  $\beta$ -caroteno, zeaxantina y astaxantina a los dos niveles de inclusión utilizados (50 y 100 mg/kg), no afectaron la supervivencia, la ganancia en peso, el crecimiento en peso relativo, el alimento consumido y el factor de conversión alimenticia, que son los parámetros zootécnicos más importantes en el cultivo de camarón. Esto concuerda con otros trabajos como el de Arredondo-Figueroa *et al.*, (2003) dónde se evaluó el efecto de extractos de carotenoides esterificados y saponificados de chile (*Capsicum annuum*) en comparación con la astaxantina sobre el crecimiento de juveniles de *L. vannamei*, y reportan que no se encontraron diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos. Boonyaratpalin *et al.* (2001) obtuvieron resultados similares a los de este trabajo y los de Arredondo-Figueroa y colaboradores, evaluando el efecto de el  $\beta$ -caroteno y la astaxantina sobre el crecimiento y la utilización del alimento en *Penaeus monodon*. Amar

*et al.*, (2000<sup>a</sup>; 2001<sup>b</sup>) encontraron que los pigmentos carotenoides no afectan el crecimiento y la utilización del alimento de la trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*). La importancia de los carotenoides como moléculas bioactivas reside en gran medida en su conversión a retinoides, los cuales están involucrados en la activación de receptores nucleares de hormonas (Liñan-Cabello 2002), son precursores de vitaminas y potentes antioxidantes pero no son considerados como precursores de moléculas promotoras de crecimiento puesto que no promueven la síntesis de biomoléculas que se traduzcan en un crecimiento somático, lo cual puede explicar el por qué diferentes trabajos llegan a la conclusión de que adicionar pigmentos carotenoides en las dietas no promueve el crecimiento de los organismos.

Hasta donde sabemos, no existen trabajos publicados donde se haya evaluado el efecto de los pigmentos carotenoides adicionados como aditivos en dietas balanceadas sobre la proteína soluble, la actividad enzimática de la SOD y catalasa en músculo y hepatopáncreas de camarón *L. vannamei* en condiciones de cultivo intensivo a nivel laboratorio, y la relación que pueda existir entre estas enzimas y las variaciones de proteína soluble en los tejidos evaluados con la defensa del hospedero durante un proceso de infección con WSSV y *V. harveyi*. La inclusión de pigmentos carotenoides como aditivos en alimentos balanceados para el cultivo de *L. vannamei*, promueve en el camarón un aumento en la respuesta antioxidante celular, disminuyendo el índice de peroxidación de lípidos y fosfolípidos, manteniendo la fluidez de las membranas celulares generando un aumento en la respuesta inmune (Goodwin 1986; Bendich 1989). El  $\beta$ -caroteno, la zeaxantina y la astaxantina en conjunto con enzimas como la superóxido dismutasa y la

catalasa eliminan radicales libres, como el oxígeno singlete ( $^1\text{O}_2$ ), anión superóxido ( $\text{O}_2^-$ ), peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) y peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ), que son producidos durante la respiración y procesos de oxidación química (Hansberg, 2002). Los radicales libres se generan también mediante la defensa del hospedero durante procesos de invasión por diversos patógenos (virus, bacterias, hongos y parásitos) activados por la presencia de lipopolisacáridos (LPS) y los  $\beta$ -glucanos de las paredes celulares de estos patógenos (Barraco *et al.*, 1991; Campa-Córdova<sup>a</sup> *et al.*, 2002; Campa-Córdova<sup>b</sup> *et al.*, 2002). La enzima súper óxido dismutasa dismuta el radical ( $\text{O}_2^-$ ) (McCord y Fridovich, 1969; McCord *et al.*, 1971), produciendo en una etapa de la reacción peróxido de hidrógeno el cual es degradado por la catalasa en  $\text{CO}_2$  y agua (Dunford, 1999). A excepción del tratamiento HZ-50 en músculo para catalasa y, HZ-100 para músculo, BC-50 y AX-100 en hepatopáncreas para SOD, los restantes alimentos adicionados con pigmentos carotenoides evaluados en este trabajo a las dosis de 50 y 100 mg/kg durante treinta días de experimentación, provocaron una disminución significativa, en la actividad de la SOD y la catalasa tanto en músculo como en hepatopáncreas respecto al alimento control (Figs.4, 6), siendo a los quince días cuando presentaron su máxima actividad, por lo que es importante resaltar que estas enzimas al eliminar los radicales libres, disminuyen el riesgo del daño que pueden causar las especies reactivas de oxígeno al ADN, a las proteínas y a los lípidos (Hansberg, 2002), contribuyendo a la estabilidad fisiológica del organismo, y por ende un mejor funcionamiento de órganos y tejidos.

La absorción, transporte y almacenamiento de pigmentos carotenoides se basa en su capacidad para unirse a lípidos y proteínas (Storebakken y Austreng, 1987) y de su

biodisponibilidad la cual esta relacionada directamente con el coeficiente de digestibilidad aparente para cada tipo de pigmento, estos varían dependiendo de su composición de isómeros (Liaaen-Jensen *et al.*, 2001). Debido a estos factores, la disminución a los treinta días de experimentación respecto a los 15 días sobre la actividad SOD y catalasa en músculo y hepatopáncreas, puede deberse a la mezcla de isómeros presentes en el  $\beta$ -caroteno, la zeaxantina y la astaxantina. Por lo anteriormente descrito, el sistema antioxidante podría ayudar a las células a mejorar los procesos de síntesis (proteínas, lípidos, carbohidratos y ácidos nucleicos), almacenamiento de nutrientes (reservas lipídicas y proteicas), también podrían en determinados procesos, como en la coagulación y la producción de células hemocíticas, mejorar el funcionamiento durante la síntesis de la maquinaria enzimática de defensa, conformada principalmente por proPO, proteínas de coagulación, aglutininas, enzimas hidrolíticas, péptidos antimicrobianos y proteínas de reconocimiento (Vargas-Albores, 1996; Sritunyalucksana y Söderhäll, 2000; Rendón y Balcazar, 2003). A pesar de que los resultados obtenidos en este experimento indican un aumento en la actividad enzimática de las enzimas SOD y catalasa en músculo y hepatopáncreas con respecto al control, bajo condiciones controladas, no es un indicativo determinante para inferir que pueden tener un efecto adverso sobre patógenos virales como el WSSV y bacterianos como *V. harveyi*.

## **7.2 Evaluación de la capacidad de los carotenoides para prevenir la infección del virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV) en camarón blanco.**

Los ensayos *in vivo* son la forma más común de evaluar la infectividad y la susceptibilidad de camarones a infecciones virales (Brock, 1992; Durand *et al.*, 2000; Lightner y Redman, 1998; Poulos *et al.*, 2001; Lightner, 1996; Prior *et al.*, 2003), sin embargo se encuentra en fase experimental la posibilidad de producir células de camarón, lo que permitiría realizar ensayos *in vitro* (Kasornchandra y Boonyaratpalin, 1998). Para realizar retos virales en camarones sujetos a una línea de investigación es necesario realizar pruebas de mortalidad para obtener la dosis subletal, dosis letal media y la dosis letal (DSL,  $DL_{50}$  y  $DL_{100}$ ) que nos indiquen el grado de infectividad de las diluciones realizadas a partir de tejidos infectados previamente diagnosticados positivos a WSSV mediante PCR (Brock y Main, 1994; Prior *et al.*, 2003). Los inóculos realizados con virus que afectan los cultivos de camarón se han realizado a partir de tejidos infectados sin conocer con exactitud la cantidad de partículas virales, lo cual se puede realizar mediante PCR en tiempo real (Durand *et al.*, 2002). La dosis letal media  $DL_{50}$  se obtuvo en este trabajo con una dilución de 1:500 (Fig. 8), con la que se realizaron los retos con los alimentos experimentales (Control, BC-100, HZ-100 y AX -100).

Las dietas evaluadas con los pigmentos carotenoides como el  $\beta$ -caroteno, astaxantina y zeaxantina a una concentración de 100 (mg/kg), suministrados a través del alimento, no tuvieron un efecto significativo en la supervivencia frente a una infección viral (Fig. 9). Lo anterior se complementa por el hecho de que los niveles de hemocitos y

proteínas plasmáticas disminuyeron significativamente en todos los organismos infectados a las 72 horas post-infección (Figs. 10 y 11). Además se observaron alteraciones hematológicas caracterizadas por la presencia de células necróticas con núcleos picnóticos y cariorréxicos (Tabla 10), hemolinfa con coloraciones rosadas, provocadas por una inadecuada actividad fenoloxidasa (PO) plasmática (Motesdeoca *et al.*, (2002). Zhang *et al.* (2005) describen en su trabajo que el WSSV puede estimular la actividad fenoloxidasa, superóxido dimutasa, fosfatasa alcalina y fosfatasa ácida en *Fenneropenaeus chinensis* en el órgano linfoide y las branquias durante las primeras horas post-infección, y que este grupo de enzimas pueden facilitar la degradación de partículas extrañas filtradas por estos órganos durante las primeras horas post-infección. Sin embargo, en el presente experimento, al aumentar el tiempo de infección (72 horas) las células murieron y no pudieron ser sustituidas por el tejido hematopoyético, puesto que se encuentra dañado por el virus (Tabla 11). Motesdeoca *et al.*, (2002) describen patologías de WSSV en *L. vannamei* similares a las de este trabajo en organismos infectados en una granja de Ecuador. La afectación de los hemocitos puede disminuir la capacidad de respuesta inmune, celular y humoral, como la fagocitosis, encapsulación, sistema proPO, síntesis y liberación de peneidinas, aglutininas y proteínas de coagulación. Al disminuir la proteína plasmática se afecta la hemocianina disminuyendo el transporte de oxígeno a los tejidos ocasionando condiciones hipóxicas que son adversas para el desarrollo de los procesos vitales del organismo, que le podrían ocasionar la muerte. El alimento con  $\beta$ -caroteno a una concentración de 100 mg/kg, permitió obtener aparentemente una mayor supervivencia a las 72 horas post-infección en comparación con el control, el de astaxantina y el de zeaxantina (Fig. 9). Sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticas significativas

por lo que no podemos inferir que el pigmento tuvo un efecto positivo contra el virus de la mancha blanca. Hasta el momento no existen trabajos donde se haya evaluado el efecto de  $\beta$ -caroteno, la zeaxantina y la astaxantina en forma simultanea en *L. vannamei* en infecciones producidas por agentes etiológicos virales como el WSSV.

El análisis histopatológico nos indica un G4 de afectación en necrosis y cuerpos de inclusión intranuclear donde la mayoría de los tejidos afectados son de origen ectodermal y mesodermal (Fig. 12). Estos resultados pueden ser debido a la alta carga viral del inóculo, es un riesgo que se corre cuando no se realiza una cuantificación del agente viral (Prior *et al.*, 2003), por tal razón, se recomienda que al realizar trabajos de este tipo, la mejor opción es realizar cuantificaciones de viriones mediante PCR en tiempo real.

### **7.3 Experimento 3. Evaluación de la capacidad de los carotenoides para prevenir la infección producida por *V. harveyi*.**

Se han realizado una gran variedad de experimentos de patogenicidad con diferentes especies de *Vibrio* en peneidos, en donde la mayoría de los casos se han necesitado altas concentraciones en los inóculos para poder reproducir la enfermedad de manera experimental (Lightner, 1988), donde se han obtenido diferentes concentraciones de dosis letal media ( $DL_{50}$ ),  $1.1 \times 10^5$  ufc/g con *V. alginolyticus* en *P. monodon* intramuscularmente en 7 días (Lee *et al.*, 1996);  $8.2 \times 10^4$  ufc/camarón, con *V. harveyi* en *P. monodon* intramuscularmente en 7 días (Liu *et al.*, 1996);  $4.9 \times 10^6$  ufc/mL con *V. harveyi* en *L. vannamei* por inmersión en 2 horas (Robertson *et al.*, 1998);  $10^6$  ufc/camarón

con *V. parahaemolyticus* en *P. monodon* intramuscularmente en 7 días (Alapide-Tendencia y Dureza, 1997);  $6.3 \times 10^3$  ufc/camarón con *V. penaeicida* en *P. japonicus* intramuscularmente (de la Peña *et al.*, 1993); 5 ufc/camarón con *V. penaeicida* en *L. stylirostris* intramuscularmente en 2 días (Saulnier *et al.*, 2000). En este trabajo la dosis letal media obtenida fue de  $1.3 \times 10^5$  ufc/camarón con *V. harveyi* *L. vannamei* administrada intramuscularmente en 48 horas lo cual es normal respecto a las anteriores  $DL_{50}$  señaladas.

Se han reportado diferentes CTH, para diferentes especies, registrando esta variable alrededor de  $14-32 \times 10^7$  en *Carcinus maenas*,  $2.85 \times 10^7$  en *Palaemon elegans*,  $2.97 \times 10^7$  en *Crangon crangon* y  $3.32 \times 10^6$  en *Squilla mantis* (Lorenzon *et al.*, 1999),  $1.8 \times 10^7$  cel/mL en *Liocarcinus depurator* (Hammond y Smith, 2002),  $1.41 \times 10^7$  cel/mL en *Macrobrachium rosenbergii* (Cheng, *et al.*, 2002),  $45 \times 10^3$  cel/mL en *Farfantepenaeus paulensis* (Perazzolo *et al.*, 2002),  $1.7 \times 10^7$  cel/mL en *Penaeus japonicus* (Song *et al.*, 2003),  $1.84 \times 10^7$  cel/mL en *Penaeus stylirostris* (Le Moullac, *et al.*, 1998),  $5.9 \times 10^7$  cel/mL en *P. monodon* (Van de Braak, 2002),  $4.3 \times 10^4$  cel/mL en *L. setiferus* (Pascual *et al.*, 2003) y  $7.2 \times 10^4$  cel/mL (Sánchez *et al.*, 2001) y en *L. vannamei*  $1.64 \times 10^7$  cel/mL (Song, *et al.*, 2003),  $1.17 \times 10^7$  cel/mL (Liu y Chen, 2004),  $1.96 \times 10^6$  cel/mL (Tseng y Chen, 2004),  $7.91 \times 10^6$  cel/mL (Magallón, 2004) y, en este trabajo se obtuvo un conteo de  $8-12 \times 10^6$  cel/mL en tratamientos controles. Los conteos totales de hemocitos circulantes varían entre especies de crustáceos y en la misma especie siendo esta variable afectada por el sexo, muda, desarrollo, estado reproductivo, nutrición y condiciones ambientales (Cheng *et al.*, 2002; Cheng *et al.*, 2003).

La disminución de CTH puede ser ocasionada por diferentes variables en diferentes especies, observándose una disminución del CTH en *L. setiferus* cuando hay un incremento de temperatura (Pascual *et al.*, 2003), por el manejo de los organismos en *L. setiferus* (Sánchez *et al.*, 2001) y *Haliotis tuberculata* (Malham *et al.*, 2003), por reducción de salinidad en *Farfantepenaeus paulensis* (Perazzolo *et al.*, 2002). Bajo condiciones hipóxicas se han encontrado disminuciones en el CTH en *L. vannamei* (Magallon, 2004) y *Penaeus stylirostris* (Le Moullac *et al.*, 1998). En *Macrobrachium rosenbergii* se ha observado una disminución del CTH cuando hay una disminución de oxígeno (Cheng *et al.*, 2002), un incremento en el pH (9.0) o decremento (4.6-5.0), un aumento en la temperatura o una reducción en la salinidad disminuyen el CTH para esta especie (Cheng y Chen, 2000). Se han encontrado disminuciones en el CTH en *Haliotis diversicolor supertexto* cuando esta es infectada con *V. parahemolyticus* (Cheng *et al.*, 2004). En *L. vannamei* infectado con *V. alginoliticus* asociada a niveles elevados de nitritos el CTH se reduce significativamente respecto al blanco (Tseng y Chen, 2000).

En los crustáceos decápodos se conocen muy bien el ciclo de vida, el consumo de alimentos, enfermedades más comunes, contaminantes y estresores ambientales que afectan el conteo de hemocitos circulantes tanto en cantidad como calidad (Le Moullac y Haffner 2000). Como se describió en el párrafo anterior, las infecciones producidas por patógenos como virus, bacterias, protozoarios, hongos y toxinas marinas pueden causar una disminución en el conteo total de hemocitos. En el presente trabajo, se encontró una disminución significativa en el conteo total de hemocitos y proteínas plasmáticas en los tratamientos evaluados respecto al blanco (Figs. 15 y 18), lo cual indica que durante una

infección con *V. harveyi*, en *L. vannamei* disminuye el CTH y la concentración de proteína plasmática, esto puede deberse a que los hemocitos responden ante el patógeno mediante infiltraciones hemocíticas para iniciar con los mecanismos de defensa humoral y celular mediante la liberación de enzimas proteolíticas, sistema proPO, proteínas de coagulación encapsulación y fagocitosis. Este mecanismo de respuesta es complementado con la síntesis de hemocitos en los tejidos hematopoyéticos, los cuales se encuentran dañados, por lo que el proceso de renovación celular no funciona adecuadamente, incurriendo entonces el organismo en una disminución de células, que son liberadas al torrente sanguíneo.

Las proteínas son un nutriente esencial para los organismos y en camarones son básicas para el crecimiento (Andrews *et al.*, 1972), osmoregulación (Lignot *et al.*, 1999; Lignot *et al.*, 2000), gluconeogénesis (Rosas *et al.*, 2002) y el sistema inmune (Johansson *et al.*, 2000; Pascual *et al.*, 2003; Sánchez *et al.*, 2001; Sritunyalucksana y Söderhäll, 2000). Por tal razón es importante conocer la concentración de proteínas sanguíneas ya que nos pueden indicar el estatus nutricional y el estado del sistema inmune. Durante el presente experimento la proteína plasmática disminuyó significativamente a las 48 y 144 horas post-infección en los organismos que no fueron alimentados con pigmentos carotenoides, esto puede afectar el transporte de oxígeno a los tejidos puesto que la hemocianina puede llegar a formar entre el 60% y 90% de la proteína plasmática (Rosas *et al.*, 2002).

La actividad SOD en hemocitos presentó un ligero incremento en los organismos infectados respecto al control positivo, observándose a las 144 horas post-infección una actividad similar en los organismos infectados y no infectados, y la producción de anión superóxido se incrementó significativamente en los organismos alimentados con pigmentos

carotenoides a las 48 horas post-infección, regresando a estados basales a las 144 horas post-infección. Lo anterior señalado es un proceso de defensa del organismo bajo condiciones normales, ya que los hemocitos responden a diferentes estímulos, liberando radicales libres (Holmblad y Söderhäll, 1999). En este experimento los camarones al ser sujetos de un proceso de infección inducida con *V. harveyi*, respondieron con un aumento en la producción de anión superóxido; esto nos muestra que si bien se genera citotoxicidad hacia un patógeno, como lo muestra el alimento control manteniendo una producción endógena de ( $O_2^-$ ), las dietas con pigmentos carotenoides presentaron un incremento significativo en la producción ( $O_2^-$ ), respecto al control (+) a las 48 horas post-infección. Este aumento en la producción de  $O_2^-$ , probablemente aumentaría la capacidad citotóxica de los hemocitos durante la proliferación de diversos patógenos, lo cual coadyudaría en el mejoramiento de la respuesta inmune celular, puesto que una vez que inactive al patógeno, permitiría que la respuesta inmune celular del camarón localice el patógeno y pueda eliminarlo, ya sea por fagocitosis, encapsulación y nodulación antes que el patógeno cause daños severos en los tejidos.

La coagulación en crustáceos se lleva a cabo mediante la acción de proteínas de coagulación que son liberadas por degranulación celular de hemocitos granulocitos (Rendón y Balcazar, 2002), logrando de esta manera la rápida cicatrización de daños celulares que pueden ser atacados rápidamente por bacterias y virus. Los tiempos de coagulación obtenidos en este trabajo indican que los organismos alimentados con zeaxantina y astaxantina presentan tiempo de coagulación igual que el control positivo siendo de 20-30 segundos a las 48 horas post-infección. Los organismos alimentados con  $\beta$ -

caroteno presentaron tiempos de coagulación muy similares al blanco 5-10 segundos. Todos los organismos presentaron tiempos de coagulación de 0-5 segundos a las 144 horas post-infección.

El análisis histopatológico nos confirma el daño causado por *V. harveyi* en diferentes órganos y tejidos (Tabla 14). Se observa un mayor daño en los organismos del control (+), probablemente debido a una disminución de su capacidad citotóxica, por la baja producción de  $O_2^-$  (Fig. 17), disminución del CTH, disminución del tiempo de coagulación y una disminución en la concentración de proteína plasmática. El alimento con  $\beta$ -caroteno presentó menor daño histológico, una mayor producción de  $O_2^-$ , menor tiempo de coagulación y mayor concentración de proteína plasmática que el tratamiento sin pigmento, control (+), lo cual se refleja en una mayor supervivencia.

De acuerdo a los resultados obtenidos, podemos inferir que el  $\beta$ -caroteno puede aumentar la capacidad citotóxica de los hemocitos hacia *V. harveyi*, por lo que coincidimos con otros trabajos que demuestran que los pigmentos carotenoides promueven y mejoran los diferentes mecanismos de bio-defensa en distintos grupos de organismos, como lo mencionan Amar *et al.* (2001) donde encontraron que el  $\beta$ -caroteno y la astaxantina aumentan la actividad lisosima, fagocitosis y citotoxicidad inespecífica en la trucha arcoiris *Oncorhynchus mykiss* y mejoran la respuesta inmune celular en el ave zebra *Taeniopygia guttata* (Kevin *et al.*, 2004). Merchie *et al.*, (1998) reportan una tendencia en la resistencia contra *V. harveyi* en postlarvas de *P. monodon* alimentadas con dietas de astaxantina a 230

y 810 mg/kg<sup>-1</sup> con diferentes niveles de inclusión de ácido ascórbico (100, 1700, 3400 y 200, 1700) mg/kg<sup>-1</sup> respectivamente.

En resumen, el  $\beta$ -caroteno, la zeaxantina y la astaxantina empleados como aditivos alimentarios en alimentos balanceados y administrados durante 30 días no afectaron la supervivencia, la ganancia en peso, el crecimiento en peso relativo, el alimento consumido y el factor de conversión alimenticia. A pesar de que el  $\beta$ -caroteno en el reto viral permitió obtener una mayor supervivencia respecto a los demás tratamientos, la diferencia no fue significativa, por lo que los pigmentos no mostraron ser eficaces en la prevención de la infección producida por el virus de la mancha blanca. Sin embargo, en las infecciones producidas por *V. harveyi*, el  $\beta$ -caroteno tuvo un efecto benéfico en la supervivencia. Para entender los mecanismos de acción de los pigmentos evaluados es necesario conocer los procesos de absorción, transporte y almacenamiento, así como la composición de isómeros, y la posible activación de genes inducibles. Para obtener este tipo de información es necesario determinar los tipos de isómeros mediante HPLC, la posición de enlaces específicos mediante Resonancia Magnética Nuclear y estudios de expresión diferencial para obtener los ARNm inducibles en músculo, hepatopáncreas y hemocitos.

## VIII CONCLUSIONES

1. El empleo de pigmentos carotenoides como aditivos en dietas balanceadas para juveniles de *L. vannamei*, a concentraciones de 50 y 100 mg/kg de  $\beta$ -caroteno, zeaxantina o astaxantina, no tuvo efectos marcados sobre la supervivencia, el crecimiento y la utilización del alimento de *L. vannamei*, pero sí influyó el estatus inmunológico de los organismos, bajo condiciones de cultivo intensivo a nivel laboratorio.
2. Los pigmentos evaluados mejoran la capacidad antioxidante de la SOD y la catalasa en músculo y hepatopáncreas, por lo que esto puede contribuir a reducir el daño que pueden generar los radicales libres en los tejidos.
3. Los pigmentos  $\beta$ -caroteno, zeaxantina y astaxantina no tuvieron un efecto benéfico en la prevención de infecciones producidas por el virus de la mancha blanca, bajo las condiciones empleadas en el presente trabajo, obteniéndose altas tasas de mortalidad con todos los tratamientos alimenticios.
4. La inclusión de  $\beta$ -caroteno, a una concentración de 100 mg/kg de dieta, mejoró significativamente la supervivencia de juveniles de camarón blanco *L. vannamei*, retados con la bacteria patógena *V. harveyi*, por lo que su uso a través del alimento, permite mejorar la resistencia del camarón contra infecciones causadas por esta bacteria *V. harveyi*.

## IX RECOMENDACIONES

En base a las conclusiones planteadas se proponen las siguientes recomendaciones:

1. No se recomienda el uso de  $\beta$ -caroteno, zeaxantina y astaxantina a concentraciones de 50 y 100 mg/kg suministradas en el alimento durante 15 y 30 días como promotores de crecimiento puesto que no mostraron efecto significativo en la supervivencia, la ganancia en peso, el crecimiento en peso relativo, el alimento consumido y el factor de conversión alimenticia, sin embargo, es importante aclarar que el emplearlos no produce efectos negativos en el estatus nutricional del organismo.
2. No se recomienda su uso para prevenir infecciones producidas por el virus de la mancha blanca.
3. Se recomienda su uso para prevenir infecciones producidas por *V. harveyi*.
4. Estudiar la proporción de isómeros de diferentes fuentes de pigmentos, ya que esto varía su función biológica.
5. Determinar los coeficientes de digestibilidad aparente de los diferentes pigmentos y de diferentes fuentes, sintéticas o naturales.
6. Establecer líneas celulares y realizar ensayos *in vitro* para obtener información mas puntual sobre el efecto de los pigmentos en actividades enzimáticas, mecanismos de acción y respuesta celular frente a un virus o una bacteria.
7. Realizar estudios moleculares para determinar la posible expresión de genes involucrados en la respuesta inmunológica.

## X LITERATURA CITADA

Aebi H.E. 1987. Catalase. In: Bergmeyer H.U. (ed.), *Methods of Enzymatic Analysis*, Vol. III. VCH. Germany.

Akiyama, D.M. y Dominy, W.G.. (1989). Penaeid shrimp nutrition for the comercial feed industry. En: *Texas Shrimp Farming Manual*, Vol. 1: Grow-out Technology. Texas Agricultural Extension Service and Texas A&M University, Sea Grant College Program. 50 p.

Alapide-Tendencia, E.V., Dureza, L.A. (1997). Isolation of *Vibrio spp.* from *Penaeus monodon* (Fabricius) with red disease syndrome. *Aquaculture*. 154:107-114.

Alvarez, J.D., Austin, B., Alvarez, A.M. y Reyes, H. (1998). *Vibrio harveyi*: a pathogen of penaeid shrimps and fish in Venezuela. *Journal of Fish Diseases*. 21: 313-316.

Amar<sup>b</sup>, E.C., Kiron, V., Satoh, S. and Watanabe, T. (2001). Influence of various dietary synthetic carotenoides on bio-defense mechanisms in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquaculture Research*. 32: 162-173.

Amar<sup>a</sup>, E.C., Kiron, V., Satoh, S. and Watanabe, T. (2000). Effect of  $\beta$ -carotene on the immune response of rainbow trout. *Fisheries Science*. 66: 1068-1075.

Andrews, J.W., Sick, L.V., B.G.J. 1972. The influence of dietary proteins and energy levels on growth and survival of penaid shrimp. *Aquaculture*. 191: 3-11.

Association of Official Analytical Chemists (AOAC). 1995. *Official methods of analysis*. AOAC. Washington, D.C., USA. 1234 pp.

Arredondo-Figueroa, J.L., Pedroza-Islas, R., Ponce-Palafox, J.T. and Vernon-Carter, E.J. (2003). Pigmentation of pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*, BOONE 1931) with esterified and saponified carotenoids from red chili (*Capsicum annuum*) in comparison to astaxanthin. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 2: 101-108.

Arumugam, M., Romestand, B., Torreilles, J., Roch, P. 2000. In vitro production of superoxide and nitric oxide (as nitrite and nitrate) by *Mytilus galloprovinciales* haemocytes upon incubation with PMA or laminarin or during yeast phagocytosis. *European Journal of Cell Biology*. 79:513-519.

Bacherè, E., Destoumieux, D., Bulet, P. (2000). Penaeidins, antimicrobial peptides of shrimp: a comparison with other effectors of innate immunity. *Aquaculture*. 191: 71-88.

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

- Badui, D.S. 1986. Química de los alimentos. Editorial Alambra Mexicana, S.A. Primera Impresión, 1981. 430 pp.
- Barraco, M.A., Duvic, B., Söderhäll, K. 1991. The  $\beta$ -1,3-glucan-binding protein from the crayfish *Pacifastacus leniusculus*, when reacted with a  $\beta$ -1,3-glucan, induces spreading and degranulation of crayfish granular cells. *Cell and Tissue Research*. 266 (3): 491-497.
- Baumann, P., Baumann, L. y Mandel, M. (1971). Taxonomy of marine bacteria: the genus *Beneckeia*. *Journal of Bacteriology*. 107: 268-294.
- Beck, G. y Habicht, G.S. 1996. Immunity and the Invertebrates. *Scientific American*.
- Bendich, A. (1989). Carotenoids and the immune response. *Journal Nutrition*. 119: 112-115.
- Boonyaratpalin, M., Thongrod, S., Supamattaya, K., Britton, G., Schlipalius, I.E. 2001. Effects of  $\beta$ -carotene source, *Dunaliella salina*, and astaxantina on pigmentation, growth, survival and health of *Penaeus monodon*. *Aquaculture Research*. 32: 182-190.
- Bonami, J.R. y Lightner, D.V. 2003. Qualitative and quantitative studies on the relative virus load of tails and heads of shrimp acutely infected with WSSV. *Aquaculture*. 216: 9-18.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem*. 72, 248-254.
- Brock, J.A. 1992. Current diagnostic methods for agents and diseases of farmed marine shrimp. In: Fulks, W., Main, K.L. (eds). *Diseases of cultered penaeid shrimp in Asia and the United States*. The Oceanic Institute, Honolulu, HI. 209-231 p.
- Brock, J.A. y Main, K.L. 1994. A guide to the common problems and diseases of cultured *Penaeus vannamei*. World Aquaculture Society, Baton rouge, LA.
- Burton, G.W. y Ingold, K.U. (1984).  $\beta$ -Carotene: An unusual type of lipid antioxidant. *Science*. 224:569-573.
- Campa-Córdova<sup>a</sup>, A., Hernández-Saavedra, N., De Philippis, R. Ascencio, F. 2002. Superoxide dismutase as modulator of immune function in American white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Comparative Biochemistry and Physiology. PartC*. 133: 557-565.
- Campa-Córdova<sup>b</sup>, A., Hernández-Saavedra, N., 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 of  $\beta$ -glucan and sulphated polysaccharide. *Fish and Shellfish Immunology*. 12: 353-366.

- Cheng, W., Liu, Ch., Hsu, J., Chen, J. 2002. Effect of hypoxia on the immune response of giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* and its susceptibility to pathogen *Enterococcus*. *Fish and Shellfish Immunology*. 13: 351-365.
- Cheng, W., Juang, F., Li, L., Lin, M., Liu, Ch., Chen, J. 2003. The immune response of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* and its susceptibility to *Lactococcus garvieae* in relation to the moult stage. *Aquaculture*. 218: 33-45.
- Cheng, W., Li, Ch., Chen, J. 2004. Effect of dissolved oxygen on the immune response of *Haliotis diversicolor supertexta* and its susceptibility to *Vibrio parahemolyticus*. *Aquaculture*. 232: 103-115.
- Chien, Y.H. y Jeng, S.C. (1992). Pigmentation of Kuruma prawn, *Penaeus japonicus* Bate, by various pigment sources and levels and feeding regimes. *Aquaculture* 102: 333-346.
- Coral-Hinostroza, G.N. y Bjerkgeng, B. (2002). "Astaxanthin from the red crab langostilla (*Pleuroncodes planipes*): optical R/S isomers and fatty acid moieties of astaxanthin esters." *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 133: 437-444.
- Civera, R. y Guillaume, J.C. 1989. Effect of sodium phytate on growth and tissue mineralisation of *Penaeus japonicus* and *Penaeus vannamei* juveniles. *Aquaculture*, (77) 145-156.
- Cruz-Suárez, L. E. (1999). "Digestión en Camarón y su Relación con Formulación y Fabricación de Alimentos Balanceados." In: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Mendoza-Alfaro. (Eds). *Avances en Nutrición Acuícola III. Memorias del Tercer Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. 11 al 13 de noviembre de 1996, UALN, Monterrey, Nuevo León, México.
- De la Peña, L.D., Tamaki, T., Momoyama, K., Nakai, T., Muroga, K. 1993. Characteristics of the causative bacterium of vibriosis in the Kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. *Aquaculture*. 115:1-12.
- Destoumieux, D., Muñoz, M., Cosseau, C., Rodríguez, J., Bulet. 2000. Penaeidins, antimicrobial peptides with chitin-binding activity, are produced and stored in shrimp granulocytes and released alter microbial challenge. *Journal of Cell Sciences*. 113: 461-469.
- Drossos G., A. Lazou, P. Panagopoulos y Westaby, S. 1995. Deferoxamine cardioplegia reduces superoxide radical production in human myocardium. *Ann. Thorac. Surg*. 59: 169-172.
- Dunford, H.B. 1999. *Heme Peroxidases*. Wiley-VCH, New York., Tang-Nelson, K.,

- Durand, S.V. Tang, K.F.J., Lightner, D.V. 2000. Frozen commodity shrimp: potential avenue for introduction of white spot syndrome and yellow head virus. *J. Aquatic Anim Health*. 12:128-135.
- FAO. (2002). Yearbook of Fishery Statistics. Aquaculture Production. FAO Statistics. Vol. 90 No. 2. Roma pp. 1-30.
- Fang, Y., Yang, S., Wu, G. (2002). Free Radicals, Antioxidants and Nutrition. *Nutrition*. 18: 872-879.
- Fukuhara, R. Tezuka, T., Kageyama, T. 2002. Structure, molecular evolution, and gene expression of primate superoxide dismutase. *Gene*. 296: 99-109.
- Goodwin, T.W. (1984). The Biochemistry of carotenoids. Volume II. Animals. USA, NY. Chapman and Hall.
- Goodwin, T.W. (1986). Metabolism, nutrition and function of carotenoids. *Ann Rev. Nutr*. 6: 273-297.
- Guillou, A., Choubert, G., De La Noüe, J. 1992. Absorption and blood clearance of labeled carotenoids [ $^{14}\text{C}$ ]astaxanthin, [ $^3\text{H}$ ]canthaxanthin and [ $^3\text{H}$ ]zeaxanthin] in mature female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp. biochem. Physiol.* Vol. 103A, No. 2. 301-306 pp.
- Gourdon, I., Guérin, M.C., Torreilles, J. Roch, P. 2001. Nitric Oxide generation by hemocytes of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Nitric Oxide. Biology and Chemistry*. 5 (1):1-6.
- Guohua, Y., Juan, Q., Zhiming, W., Yipeng, Q. (2003). A phage-displayed peptide can inhibit infection by white spot syndrome virus of shrimp. *Journal of General Virology*. 84(9): 2545-2553.
- Guzmán, A., y Ascencio-Valle, F. (2000). Infectious disease in shrimp species with aquaculture potencial. *Resent Res. Devl Microbiology*. 4:333-348.
- Hansberg, W. 2002. Biología de las especies de oxígeno reactivas. Eds. Cea Bonilla, A., del Arenal Mena, I.P., Rivero Rosas, H., Vázquez-Contreras, E. Mensaje Bioquímico, Vol XXVI.
- Hammond, J.A. y Smith, V.J.. 2002. Lipopolysaccharide induces DNA-synthesis in a subpopulation of hemocytes from the swimming crab, *Liocarcinus depurator*. *Developmental and Comparative Immunology*. 26: 227-236.
- Hertrampf, J. W. and F. Piedad-Pascual (2000). Handbook on Ingredients for Aquaculture Feeds. Netherlands.

Homblad, T. y K. Söderhäll. 1999. Cell adhesion molecules and antioxidative enzymes in a crustacean, possible role in immunity. *Aquaculture*. 172: 111-123.

Houlihan, D., Boujard, T., Jobling, M. 2001. food intake in Fish. Blackwell Science Ltd. Reino Unido. 418 p.

INEGI (1999a), Anuario estadístico del estado de Sinaloa, México, INEGI.

INEGI (1999b), Anuario estadístico del estado de Sonora, México, INEGI.

ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses). 2005. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/index.htm>.

Itami, T., Asano, M., Tokushige, K., Jubono, Takeno, N., Nishimura, H., Maeda, M., Kondo, M., Takahashi, Y. (1998). "Enhancement of disease resistance of karuma shrimp, *Penaeus japonicus*, after oral administration of peptidoglycan derived from *Bifidobacterium thermophilum*." *Aquaculture* 164: 277-288.

Jeffrey, S.W., Mantoura, R.F.C., Wright, S.W. 1997. Phytoplankton pigments in oceanography. UNESCO. FRANCIA. 661.P

Johanson, M.W., Keiser, P., Stritunyalucksana, P.P., Söderhäll, K. 2000. Crustacean haemocytes and haematopoiesis. *Aquaculture*. 191. 45-52.

Jory, D.E. 1999. Shrimp white spot virus in the western hemisphere. *Aquaculture Magazine*. 25: 83-91.

Jory, D.E. 1998 Status of world shrimp culture. *Aquaculture Magazine*. Buyers Guide. 32-41 pp.

Kasornchandra, J. y Boonyaratpalin, S. (1998). Primary shrimp cell culture: applications for studying white spot syndrome virus (WSSV). In: Flegel TW (ed) *Advances in shrimp biotechnology*. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok, 273-276 p.

Katsuyama, M. y Matsuno, T.. 1988. Carotenoid and vitamin A, and metabolism of carotenoids, beta-carotene, canthaxanthin, astaxanthin, zeaxanthin, lutein and tunaxanthin in tilapia *Tilapia nilotica*. *Comp. Biochem. Physiol.* 90B: 131-139.

Kitabayashi, K., Kurata, H., Shudo, H., Nakamura, K., Isikawa, S. 1971. Studies of formula feed for kuruma Prat I: on the relationship among glucosamine, phosphorus and calcium. *Bulletin of Takai Regional Fisheries Research Laboratory*. 65: 91-107.

- Lavine, M.D. y Strand, M.R.. 2002. Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 32: 1295-1309.
- Le Moullac G. y Haffner, P. 2000. Environmental factors affecting immunoresponse in Crustacea. *Aquaculture*. 191: 121-131.
- Le Moullac, G., Zoyez, C., Saulnier, D., Ansquer, D., Avarre, J.C., Levy, P. 1998. Effect of hypoxic stress on the immune response and the resistance to vibriosis of the shrimp *Penaeus stylirostris*. *Fish and Shellfish Immunology*. 8: 621-629.
- Lee, F.A. (1975). *Basic Food Chemistry*. Avi Texbook Series. USA. 430 p.
- Lee, K.K., Yu, S.R., Chen, F.R., Yang, T.Z., Liu, P.C. (1996). Virulence of *Vibrio alginolyticus* isolated from diseased tiger prawn *Penaeus monodon*. *Current Microbiology*. 32: 229-231.
- Lightner, D.V. (1988). Vibrio disease of penaeid shrimp. In: Sinderman, C.J., Lightner, D.V. (Eds.), *Disease Diagnosis and Control in North American Marine Aquaculture Developments in Aquaculture and Fisheries Science* vol. 17 Elsevier, Amsterdam, pp. 42-47.
- Lightner<sup>a</sup>, D.V. (1996). The penaeid shrimp viruses IHHN and TSV: epizootiology, production impacts and role of international trade in their distribution in the Americas. *Revue Scientifique et Technique Office International des Epizooties*. 15: 579-601.
- Lightner<sup>b</sup>, D.V. (1996). *A handbook of Shrimp Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Cultured Penaeid Shrimp*. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA, 305 pp.
- Lightner, D.V. y Redman, R.M. 1998. Shrimp diseases and current diagnostic methods. *Aquaculture*. 164: 201-220.
- Lignot, J.H. Cochard, J.C., Soyey, C., Lemaire, P., Charmantier, G. 1999. Osmoregulatory capacity according to nutritional status, molt stage and body weight in *Penaeus stylirostris*. *Aquaculture*. 170: 79-92.
- Lignot, J.H. Spaning-Pierrot, C., Charmantier, G., 2000. Osmoregulatory capacity as a tool in monitoring the physiological condition and the effect of stress in crustaceans. *Aquaculture*. 191:209-245.
- Lim, B.P., Nagao, A., Terao, J., Tanaka, K., Suzuki, T., Takama, K. 1992. Antioxidant activity of xanthophylls on peroxy radical-mediated phospholipids peroxidation. *Biochim. Biophys.* 1126: 178-184.

- Liu, Ch. y J. Chen. 2004. Effect of ammonia on the immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus*. *Fish and Shellfish Immunology*. 16: 321-334.
- Liu, P.C., Lee, K.K., Yii, K.C., Kou, G.H., Chen, S.N. (1996). Isolation of *Vibrio harveyi* from diseased prawn *Penaeus japonicus*. *Current Microbiology*. 33: 129-132.
- Lorenzon, S., Guarrini, S., Smith, V.J. Ferrero, E. 1999. Effect of LPS injection on circulating haemocytes in crustacean in vivo. *Fish and Shellfish Immunology*. 9: 31-50.
- Lo, C. F., Hsu, H.C., Tsai, M.F., Ho, C.H., Peng, S.E., Kou, G.H., Lightner, D.V. (1999). Specific genomic DNA fragment analysis of different geographical clinical samples of shrimp white spot syndrome virus. *Diseases of Aquatic Organisms* 35: 175-185
- Liñan-Cabello, M.A., Medina-Zendejas, R., Sánchez-Barajas, M. y Mena-Herrera, A. (2004). Effects of carotenoids and retinol in oocyte maturation of crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Aquaculture Research*. 35: 905-911.
- López, N., Cuzon, G., Gaxiola, G., Taboada, G., Valenzuela, M., Pascual, C., Sánchez, A., Rosas, C. (2003). "Physiological, nutritional, and immunological role of dietary  $\beta$ -glucan and ascorbic acid 2-monophosphate in *Litopenaeus vannamei*." *Aquaculture* 224: 223-243.
- Magallón, P. 2004. Evaluación de moléculas asociadas al sistema inmune, bajo condiciones agudas de hipoxia en camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, BOONE, 1931. Tesis de Maestría. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. 118 pp.
- Malham, Sh., Lacoste, A., Gélébart, F., Cueff, A., Poulet, S. 2003. Evidence for a direct link between stress and immunity in the Mollusc *Haliotis tuberculata*. *Journal of experimental zoology*. 295A: 136-144.
- Marklund, S. y Marklund, G. 1974. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem*. 47: 469-479.
- Martínez-Córdova, L.R., 1999. Cultivo de camarones pendedos. Principios y prácticas. AGT Editores, México. 283 p.
- Matsushita, Y., Suzuki, R., Nara, E., Yokohama, A., Miyashita, K. 2000. Antioxidant activity of polar carotenoids including astaxanthin- $\beta$ -glucoside from marine bacterium on PC liposomes. *Fisheries Science*. 66: 980-985.
- McCord, J.M. y Fridovich, I. 1969. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocyprein). *J. Biol. Chem*. 244: 6049-6055.

McCord, J.M., Keele, B.B., Fridovich, I. 1971. An enzyme-based theory of obligate anaerobiosis: the physiological function of superoxide dismutase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 68: 1024-1027.

McGraw, K.J. y Ardia, D.R. (2004). Immunoregulatory activity of different dietary carotenoides in male zebra finches. *Chemoecology*. 14: 25-29 pp.

Merchie, G., Kontara, E., Lavens, P., Robles, R., Kurmaly, K., Soergeloos, 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.

Menasveta, P., Worawattanamateekul, W., Latscha, T., Clark, S.J. (1993). Correction of Black Tiger Prawn (*Penaeus monodon*, Fabricius) coloration by Astaxanthin. *Aquaculture Engineering* 12(4): 203-213.

Meyers, S.P. y Latscha, T. 1997. Carotenoids. Pages 164-193 in: D'Abramo, L.R., Conklin, D.E., Akiyama, D.E., Editors. *Crustacean nutrition. Advances in World Aquaculture*, volume 6. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA.

Montaño-Pérez, K., Yepiz-Plascencia, G., Higuera-Ciapara, I., Vargas-Alvares, F. 1999. Purification and characterization of the clotting protein from the white shrimp *Penaeus vannamei*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part b*. 122: 381-387.

Menasveta, P., Worawattanamateekul, W., Latscha, T., Clark, S.J. 1993. "Correction of Black Tiger Prawn (*Penaeus monodon*, Fabricius) coloration by Astaxanthin." *Aquaculture Engineering* 12(4): 203-213.

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

Nakano, H., Koube, H., Umeawa, S., Momoyama, K., Hiraoka, M., Inouye, K., Oseko, N. (1994). Mass mortalities of cultured Kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, in Japan in 1993: Epizootiological survey and infection trials. *Fish Pathology* 29: 135-139.

Nappi, A., Vass, E., Frey, F., Carton, Y. 2000. Nitric Oxide involvement in *Drosophila* immunity. *Nitric Oxide. Biology and Chemistry*. 4(4): 424-430.

Otta, S.K., Karunasagar, I., Karunasagar, I. 2001. Bacteriological study of shrimp, *Penaeus monodon* Fabricius, hatcheries in India. *J. Appl. Ichthyol.* 17: 59-63.

Páez-Osuna, F., Gracia, A., Flores-Verdugo, F., Lyle-Fritch, L.P., Alonso-Rodríguez, R., Roque, A., Ruiz-Fernández, A. 2003. Shrimp aquaculture development and the environment in the Gulf of California ecoregion. *Marine Pollution Bulletin*. 46: 806-815.

- Papagianni, M. 2003. Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties; biosíntesis, structure, function and applications. *Biotechnology Advances*. 21: 265-499.
- Pascual, C., Sánchez, A., Sánchez, A., Vargas-Albores, F., LeMoullac, G., Rosas, C. 2003. Haemolymph metabolic variables and immune response in *Litopenaeus setiferus* adult males: the effect of an extreme temperature. *Aquaculture*. 218: 637-650.
- Perazzollo, L., Gargioni, R., Ogliari, P., Barraco, M. 2002. Evaluation of some hemato-immunological parameters in the shrimp *Farfantepenaeus paulensis* submitted to environmental and physiological stress. *Aquaculture*. 214: 19-33.
- Poulos, B.T., Pantoja, C.R., Bradley-Dunlop, D. Aguilar, J., Lightner, D.V. 2001. Development and application of monoclonal antibodies for the detection of white spot syndrome virus of penaeid shrimp. *Dis Aquat Org*. 47:13-23.
- Prior, S., Browdy, L.C., Shepard, E.F., Laramore, R. and Parnell, P.G. 2003. Controlled bioassay systems for determination of lethal infective doses of tissue homogenates containing Taura syndrome or white spot syndrome virus. *Diseases of Aquatic Organisms*. 54: 89-96.
- Raa, J. (2000). "The use of immuno-stimulants in fish and shellfish feeds." In: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Zalazar, M., Olvera-Novoa, M.A. y Civera Cerecedo, R. (Eds). *Avances en Nutrición Acuicola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuicola*. 19-22 Noviembre, 2000. Mérida, Yucatán, México.
- Rendón, L. y Balcázar, J.L. (2003). "Inmunología de camarones: Conceptos básicos y recientes avances." *AquaTic*(19): 27-33.
- Rengpipat, S., Phianphak, W., Piyatitivorakul, S., Menasaveta, P. (1998). "Effects of a probiotic bacterium on black tiger shrimp *Penaeus monodon* survival and growth." *Aquaculture* 167: 301-313.
- Robertson, P.A.W., Calderon, J., Carrera, L., Stark, J.R., Zherdmant, M., Austin, B. (1998). Experimental *Vibrio harveyi* infections in *Penaeus vannamei* larvae. *Dis. Aquat. Org*. 32: 151-155.
- Robertson, L., Bray, W., Leung-Trujillo, J y A. Lawrence. (1987). Practical molt staging of *Penaeus setiferus* and *Penaeus stylirostris*. *J. World Aquacult. Soc*. 18: 180-185.
- Rosas, C., Cuzon, G., Gaxiola, G., Pascual, C., Tabeada, G., Arena, L., VanWormhoudt, A. 2002. An energetic and conceptual model of the physiological role of dietary carbohydrates and salinity on *Litopenaeus vannamei* juveniles. *Journal of Experimental Marine biology and Ecology*. 268:47-67.

Rosenberry, B. 1999. World Shrimp Farming 1999, Shrimp News Internacional, Scripps Ranch Boulevard, Suite # 4, San Diego Cal. USA.

SAGARPA, (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación). 2003. Anuario Estadístico de Pesca 2003.

Sagi, A., Rise, M., Isam, K., Arad, S. 1995. Carotenoids and their derivatives in organs of the maturing female crayfish *Cherax quadricarinatus*. Comp. Biochem. Physiol. Vol. 112B. No. 2. 309-313 pp.

Sánchez, A., Pascual, C., Sánchez, A., Vargas-Albores, F., LeMoullac, G., Rosas, C. 2001. Hemolymph metabolic variables and immune response in *Litopenaeus setiferus* adult males: the effect of acclimation. Aquaculture. 198: 13-28.

Saulnier, D., Avarre, J.C., LeMoullac, G., Ansquer, D., Levy, P., Vonau, V., 2000. Evidence that *Vibrio penaeicida* is a putative etiological agent of syndrome 93 in New Caledonia and development of a rapid and sensitive PCR assay for its detection in shrimp and sea water. Dis. Aquat. Org. 40: 109-115.

Schiedt, K., Leunenberger, F.J. Vecchi, M., Glinz, E. 1985. Absorption retention and metabolic transformations of carotenoides in rainbow trout salmon and chicken. Pure and applied Chemistry. 57: 685-692.

Smith, V. y Chisholm, R.S.. 1992. Non-cellular immunity in crustaceans. Fish and Shellfish Immunology. 2: 1-31.

Söderhäll, K. y Cerennius, L. 1992. Crustacean Immunity. Ann. Rev. Fish. Dis. 2: 3-23.  
Song, Y.L., Cheng, W., Wang, C.H. (1993). Isolation and characterization of *Vibrio damsela* infectious for cultured shrimp in Taiwan. Journal of Invertebrate Pathology. 1993. 61: 24-31.

Song, Y., Yu, Ch., Lien, T., Huang, Ch., Lin, M. 2003. Haemolymph parameters of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) infected with Taura Syndrome Virus. Fish and Shellfish Immunology. 14: 317-331.

Song, Y. L. y Huang, C.C. (2000). Application of Immunoetimulants to Prevent Shrimp Diseases. Recent Advances in MARINE BIOTECHNOLOGY, Science Publishers, Inc. IMMUNOBIOLOGY AND PATHOLOGY: 173-187.

Sritunyalucksana, K. y Söderhäll, K. (2000). "The proPO and clotting system in crustaceans." Aquaculture 191: 53-69.

Storebakken, T. y Austreng, E. (1987). "Ration level for salmonids. I. Growth, survival, body composition and feed conversion in Atlantic salmon fry and fingerlings." Aquaculture 60: 189-206.

Sung, H. G., Kou, G., Song, L. (1994). "Vibriosis resistance induced by glucan treatment in tiger shrimp (*Penaeus monodon*)." *Fish Pathology* 29(1): 11-17.

Sung, H. H., Chang, H.J., Her, C.H., Chang, J.C., Song, Y.L. (1998). "Phenoloxydase activity of hemocytes derived from *Penaeus monodon* and *Macrobrachium rosenbergii*." *Journal Invertebrates Pathology* 71: 26-33.

Tacon, A. (1990). *Standard Methods for the nutrition and Feeding of the Farmed Fish and Shrimp*. Washington: Argent Laboratories Press. 120 pp.

Tacón, A. 1989. *Nutrición y alimentación de peces y camarones cultivados. Manual de Capacitación. Programa Cooperativo Gubernamental. GCP/RLA/102/ITA. Proyecto Aquila II. Documento de Campo No. 4, FAO-Italia.*

Tafoya, A. y García Hernández, F. (1993). *Colorantes. Capítulo 15. En: García-Garibay, M., Quintero-Ramírez, R. y López-Munguía, A. BIOTECNOLOGÍA ALIMENTARIA. LIMUSA S.A. de C.V. México. 635 p.*

Tanaka, Y., Matsuguchi, H., Katayama, T., Simpson, K.I., Chichester, C.O. 1976. The biosíntesis of astaxanthin –XVIII. The metabolism of the carotenoids in the prawn *Penaeus japonicus* Bate. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 42:197-202.

Torreilles, V. y M.C. Guerin. 1999. Production of peroxinitrite by zymosan stimulation of *Mytilus galloprovincialis* haemocites in vitro. *Fish & Shellfish Immunology*. 9: 509-518.

Tian, L., Xiaobo, Z., Zongze, S., Xun, X. (2003.). PmAV, a novel gene envolved in virus resistance of shrimp *Penaeus monodon*. *FEBS Letters*. 551(1-3): 53-57.

Tseng, I. y Chen, J. 2004. The immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus* under nitrite stress. *Fish and Shellfish Immunology*. In Press.

Unzueta-Bustamante, M.L. 2001. *Distribución, incidencia y transmisión del virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV) en el cultivo de camarón blanco del pacífico (Litopenaeus vannamei) cultivado en el noroeste de México. Tesis de Doctorado. CICESE. 86 pp.*

Vargas-Albores, F. (1998). "En Busca de Evidencias del Sistema Inmune del Camarón." *Ciencia y Desarrollo*: 65-71.

Vargas-Albores, F. (2002). "Herramientas para Determinar Inmunoestimulación." on: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Zlazar, 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.*

Vargas-Albores, F., Jimenes-Vega, F., Söderhäll, K (1996). "A plasma protein isolated from brown shrimp (*Penaeus californiensis*) which enhances the activation of prophenoloxidase system by  $\beta$ 1,3 - glucan." *Developmental and Comparative Immunology* 20: 299-306.

Vargas-Albores, F. y Yepiz-Plascencia, G. (2000). "Beta glucan binding protein and its role in shrimp immune response." *Aquaculture* 191: 13-21.

Vidussi, F., Claustre, H., Bustillos-Guzmán, J., Cailiau, C., Marty, J.C. (1996). A rapid HPLC method for the determination of phytoplankton pigments in natural waters including the separation of chlorophyll a from divinyl-chlorophyll and zeaxanthin from lutein. *Journal of Plankton Research* 18: 2377-2382.

Wang, C.H., Lo, C.F., Jue, J.H., Chou, C.M., Yeh, P.Y., Tung, M.C., Chang, C.F., Su, M.S., Kou, G.H. 1995. Purification and genomic analysis of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) of *Penaeus monodon*. *Diseases of Aquatic Organisms*. 3: 239-242.

Weiske, J. y A. Weisner. 1999. Stimulation of NO synthase in the immunocompetent lepidopteran *Estigmene acraea* hemocyte line. *Nitric Oxide. Biology and Chemistry*. 3(2): 123-131.

Zar, J.H 1974. *biostatistical Analysis*, Prentice Hall, Englewood Cliff.

Zhang, Z.F., Ming, Y.S., Kyoung, H.K. 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: 674-681.

Zhang, X.H. y Austin, B. 2005. Haemolysins in *Vibrio* species. *Journal of Applied Microbiology*. 98: 1011-1019.