

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

Camilo Pohlenz Castillo

Comité Tutorial y Evaluador.

Director de Tesis: Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle

Co-tutor: Dr. Ángel Isidro Campa Córdova

Co-tutor: Dr. Roberto Civera Cerecedo

Comisión Revisora.

Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle

Dr. Ángel Isidro Campa Córdova

Dr. Roberto Civera Cerecedo

Miembros del Jurado de Examen

Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle

Dr. Ángel Isidro Campa Córdova

Dr. Roberto Civera Cerecedo

Suplente: Dra. María Antonia Guzmán Murillo

DEDICATORIAS

A Dios creador y dador de vida, Rey y Señor de todo el universo.

A mi esposa, por ser el amor de mi vida.

A mi Padre, por apoyarme en todo momento y ser mi maestro en la vida.

A mi Madre, por velar y estar siempre pendiente de mí.

A mis hermanos, por formar parte de mi vida.

A mis cuñadas, por amar a mis hnos.

A mis sobrinas, por ser un rayo de luz en mi vida.

AGRADECIMIENTOS

Te agradezco Señor Dios por darme la oportunidad y la dicha de cumplir con una meta más en mi vida personal y profesional, porque sólo tú lo haz hecho posible y me has dado la capacidad de seguir adelante, siempre recordándome tu gran amor y que toda vida proviene de ti y es por ti, que sin ti no soy nada y que sólo por ti soy alguien en la vida. Gracias por abrir puertas y caminos, por derribar montañas y construir fortalezas, pero sobre todo por ser mi maestro eterno.

Te doy gracias Nora Idania, por amarme como sólo tú sabes hacerlo, por haber aceptado emprender esta maravillosa aventura y formar parte de este proyecto. Por haber aguantado noches de desvelo, días de escasez y días de frustración y de enojo. Gracias mi amor por estar ahí para mi y ser un gran apoyo, y por dar luz a aquellos días que parecieran ser noche. Gracias mi vida y mi ángel Te Amo.

Les doy gracias padres por siempre apoyarme y alentarme a superarme en la vida, porque de ustedes he aprendido lo más importante en la vida, el ser humilde y agradecido con Dios y la vida. Gracias por toda esa dedicación y amor para su hijo, son parte importante de esta meta y de mi vida entera.

Al Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle, por su apoyo y la supervisión de este trabajo, por tener siempre la puerta abierta y darse tiempo de formarme como un Maestro en Ciencias, por confiar en mi y enseñarme a confiar en mi mismo.

A los Dres. Ángel Isidro Campa Córdova y Roberto Civera Cerecedo, por la revisión, supervisión y siempre valiosos comentarios, por enseñarme y alentarme a dar lo mejor de mi.

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, por abrirme las puertas de la ciencia y adoptarme en su seno por más de dos años, por ser el instrumento de superación de mi vida.

Al CONACyT, por el apoyo económico mediante la beca 181819, y así hacer posible mi formación de posgrado.

A la dirección de Posgrado y Registro Escolar del Centro, por apoyarme siempre en todo momento, y hacer todos los papeleos más fáciles. Dra. Thelma, Lupita, Lety, Claudia, Osvelia y Betty, Muchas Gracias!.

Al Centro de Ciencias de Sinaloa, y de manera muy especial a la Dra. Martha Zarain Herzberg, y su equipo, por recibirnos con los brazos abiertos y darnos todas las facilidades de realizar parte de nuestro trabajo en su laboratorio.

A APSA S.A., y cooperativa pesquera el Tetuán, Navolato, por la donación de los organismos necesarios para mis experimentos en este proyecto de tesis.

A los Laboratorios de Nutrición experimental, Ecofisiología, Análisis Químicos Proximales, Histología, por el apoyo brindado en las diferentes etapas experimentales.

A Horacio Sandoval y Manuel Melero, por estar siempre al pendiente de que contara con lo necesario en el ámbito informático.

A María de Jesús Romero, por aguantarme y prestarme su laboratorio, y por todo el apoyo moral y logístico para la elaboración de esta investigación.

A Ernesto Goytortúa, por estar siempre disponible a tenderme la mano y facilitarme el camino de la nutrición.

A Leopoldo Flores, por el inmenso apoyo para realizar mis experimentos, por siempre estar dispuesto a ayudarme y sobre todo por siempre ser mi compa durante este tiempo, ah y por tratar de extinguir las chocolatas de la pa...

A Martha Reyes, omitiendo el significado de la C., por ser una gran amiga y compañera, por entenderme y escuchar todas mis quejas, por considerarme su amigo, por aquellas meriendas entre comidas, y por todos los favores a distancia para que esto saliera bien.

A mis amigos y compañeros, Polo, María, Tony, Alex “el chilango”, Yummy, Lanz, Carlos, Alex O., Nadia, Annie, Luis, Horacio, Gaby, Arminda, Rosario, Lupita, Edna, Aline, Wences, por estar y formar parte de esta generación de maestría y la empatía demostrada a lo largo de estos años.

A mi estimado amigo Antonio Díaz, por su excelente servicio, pero sobre todo, por sus palabras de aliento y de apoyo.

A mi colega Dr. Amaury Cordero, por comprender y entender la vida de un veterinario, y siempre estar dispuesto a ayudarme en lo que fuese.

A Norma, Lawrence, Oscar, Claudia, Mauricio, Carlos Eliud, por la guía, enseñanza y el préstamo de material y demás.

A mis maestros del programa de posgrado, por su enseñanza y disposición a formar nuevos y mejores M. en C.

A mis demás amigos, Yorch, Paola, Morro, Christian, Chío, Beto, *et al.* que de alguna manera alivianaron el viaje. Y a todos aquellos con voluntariamente e involuntariamente hicieron posible la realización y finalización de este trabajo de tesis, y por razones de *Lapsus mensus* se me ha pasado agradecerse los.

RESUMEN

La panzootia debida al Virus del Síndrome de la Mancha Blanca (WSSV) ha ocasionado miles de millones de dólares en pérdidas, y constituye hasta el momento el problema de sanidad acuícola más devastador y de mayor impacto para el camarón de cultivo, teniendo efectos socioeconómicos profundos en países donde esta actividad es significativa, por lo tanto la sustentabilidad de la misma, depende enormemente de la prevención y control de enfermedades. Ya que no existe un tratamiento específico para las enfermedades virales y los invertebrados son incapaces de generar memoria específica contra patógenos, se ha buscado desarrollar estrategias para prevenir la infección por parte de éstos. Investigaciones llevadas a cabo en los últimos años, han remarcado a un grupo de compuestos que se presume aumentan la inmunidad o la resistencia a las enfermedades denominándoseles inmunoestimulantes. El presente trabajo tuvo como propósito evaluar la eficacia de dos compuestos glucosídicos, β -glucano y polisacáridos sulfatados, administrados por medio del alimento y por un período de 14 días, en la prevención de la infección del WSSV en camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. Para ello, se analizaron actividades enzimáticas antioxidantes como SOD y catalasa en músculo, glándula digestiva y hemocitos, así como la generación de anión superóxido en los últimos, conteo total de hemocitos circulantes (CTH), proteínas plasmáticas, tiempo de coagulación (TC), y se desafiaron organismos contra el WSSV y la bacteria patógena *Vibrio harveyi*, para evaluar la mortalidad y el daño histopatológico causado por estas etiologías. La administración de β -glucano y polisacáridos sulfatados no representó una medida preventiva para la infección de WSSV, ya que los organismos desafiados con este virus presentaron una mortalidad acelerada, corroborándose con un CTH menor, TC mayor, proteínas plasmáticas disminuidas y daño histopatológico de mayor severidad, respecto a aquellos que no se expusieron a estos compuestos y sí fueron desafiados. Por lo contrario, la administración de dichos compuestos, representó una medida preventiva para la infección de *V. harveyi*, ya que la mortalidad obtenida fue menor, sobresaliendo en todos los puntos de muestreo un CTH mayor que los animales desafiados y no expuestos a los inmunoestimulantes, y de la misma forma, el daño histopatológico fue de menor severidad. Los resultados obtenidos sugieren que los mecanismos activados por medio de los dos compuestos no fueron los apropiados para la prevención de la infección viral a nivel celular, y más aún, se observó un proceso sinérgico entre los compuestos evaluados y el WSSV, provocando un menor tiempo para causar mortalidad, lo que sería catastrófico si se tratase de una producción comercial. Empero se sugiere que sí se estimularon los procesos de defensa para la prevención de la infección bacteriana, ocasionando un aumento en la supervivencia de los organismos.

Palabras clave: *Inmunoestimulantes, WSSV, Vibrio harveyi, enfermedades, medidas profilácticas, infección, camarón blanco, sistema inmune.*

ABSTRACT

The White Spot Syndrome Virus Panzootic has provoked billions of dollars in lost to the shrimp industry. So far, it is the most catastrophic disease in aquaculture and it has had a deep impact for shrimp culture, not only economically but socially, especially in those countries where this activity is important. Therefore, the future of the industry depends, mainly on disease prevention and control. Since there is no specific treatment for viral diseases, and invertebrates are not capable to generate specific memory against pathogens, it is important to develop strategies to prevent infection of these pathogens. On the past years, researches have remarked a group of compounds that presumably enhance immunity and resistance against diseases, and there are denominated immunostimulants. The present work had the objective to evaluate the efficiency of two glucosidic compounds, β -glucan and sulfated polysaccharides, on preventing WSSV infection in whiteleg Pacific shrimp *Litopenaeus vannamei*, fed for a 14 days on diets containing these immunostimulants. With this purpose, we evaluated antioxidant enzyme activity, Superoxide Dismutase and Catalase in muscle, digestive gland and haemocytes; in the same way, we determined superoxide anion generation by the last, total haemocytic count (THC), plasma proteins and clotting time (CT). We also defied shrimp against WSSV and the pathogenic bacteria *Vibrio harveyi* to assess the mortality and histopathological damage caused by these two etiologies. The administration of β -glucan and sulfated polysaccharides did not represent a preventive measure against WSSV infection, due to the defied organism presented an accelerated mortality (72 hrs. P.I.) and it was corroborated with a decreased THC and plasma protein, increased CT, and more severe histopathological damage, than those who was not exposed to the compounds but was infected with the virus. For the contrary, the administration of these compounds, do represent a preventive measure against *Vibrio harveyi*, because the mortality was decreased, the THC increased, and a lesser histopathological damage was found in those organism who was exposed to the compounds and was infected with the bacteria. These results suggest that the activated mechanisms by glucosides compounds were not appropriate for the prevention of the viral infection on a cellular level, even more, we observed a synergic behavior between evaluated compounds and WSSV, causing a much rapid mortality, which would be catastrophic if it presents on a commercial facilities. Nevertheless, there was an activation of the defence mechanisms for the prevention of bacterial infection, causing a higher survival rate of the defied shrimps.

Keywords: *immunostimulants, WSSV, Vibrio harveyi, diseases, prophylactic measures, infection, whiteleg Pacific Shrimp, immune system.*

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIAS	i
AGRADECIMIENTOS	ii
RESUMEN	v
ABSTRACT	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ÍNDICE DE TABLAS	xiv
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
2.1 Estado de la Acuicultura	3
2.2 Sanidad Acuícola	4
2.3 Síndrome de la Mancha Blanca	10
2.3.1 Etiología	11
2.3.2 Epizootiología	11
2.3.3 Prevención y Control	13
2.4 Repuesta de Defensa del Camarón	14
2.4.1 Componentes celulares	15
2.4.2 Componentes humorales	15
2.5 Inmunoestimulantes	17
2.5.1 β -Glucanos	17
2.5.2 Polisacáridos Sulfatados	18
III. JUSTIFICACIÓN	20
IV. HIPÓTESIS	22
V. OBJETIVOS	22
5.1 Objetivo General	22
5.2 Objetivos Específicos	22
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	23
6.1 Compuestos glucosídicos	23
6.1.1 Beta-glucano	23
6.1.2 Polisacáridos sulfatados	23

6.2	Fabricación de los alimentos problemas y control	23
6.2.1	Formulación de los alimentos	23
6.2.2	Elaboración de los alimentos	26
6.2.3	Análisis post-elaboración de los alimentos	27
6.2.3.1	Hidroestabilidad de los alimentos	27
6.2.3.2	Análisis químicos proximales	27
6.3	Primera etapa experimental: Evaluación de efectos de la administración de β -glucano y polisacáridos sulfatados por medio del alimento	28
6.3.1	Sitio Experimental	28
6.3.2	Organismos Experimentales	28
6.3.3	Sistema de cultivo	28
6.3.4	Diseño experimental	29
6.4	Segunda etapa experimental: Evaluación de la prevención de la infección del Virus del Síndrome de la Mancha Blanca (WSSV) en organismos expuestos a β -glucanos y polisacáridos sulfatados	31
6.4.1	Sitio Experimental	31
6.4.2	Organismos Experimentales	31
6.4.2.1	Diagnóstico previo de WSSV	31
6.4.3	Fuente de Agua	32
6.4.4	Sistemas de Cultivos	32
6.4.4.1	Sistema de Cultivo 1: fase A, administración de β -glucano y polisacáridos sulfatados	32
6.4.4.2	Sistema de Cultivo 2: fase B, inoculación de WSSV	33
6.4.5	Elaboración del inóculo viral	33
6.4.6	Determinación de la Dosis Letal Media (DL_{50})	34
6.4.7	Diseño experimental	34
6.4.7.1	Fase A: administración de β -glucano y polisacáridos sulfatados	35
6.4.7.2	Fase B: inoculación de WSSV	35

6.5	Tercera Etapa Experimental: Evaluación de respuestas del camarón ante el desafío con bacteria <i>Vibrio harveyi</i>	36
6.5.1	Sitio Experimental	36
6.5.2	Organismos Experimentales	36
6.5.3	Sistema de Cultivo	37
6.5.4	Elaboración del inóculo bacteriano	37
6.5.5	Determinación de la Dosis Subletal	38
6.5.6	Diseño experimental	39
6.5.6.1	Fase A: administración de β -glucano y polisacáridos sulfatados	39
6.5.6.2	Fase B: inoculación de <i>Vibrio harveyi</i>	40
6.6	Análisis de Laboratorio de Muestras Biológicas	41
6.6.1	Toma de Muestras	41
6.6.1.1	Extracción de Hemolinfa	41
6.6.1.2	Obtención de Tejidos	41
6.6.1.2.1	Tejido para Análisis Enzimáticos.....	41
6.6.1.2.2	Tejido para Histopatología	42
6.6.2	Análisis de Muestras	42
6.6.2.1	Tiempo de coagulación (TC)	42
6.6.2.2	Conteo Total de Hemocitos Circulantes (CTH).....	42
6.6.2.3	Cuantificación de Proteínas	42
6.6.2.4	Generación de Anión Superóxido	43
6.6.2.5	Actividad Superóxido Dismutasa (SOD)	43
6.6.2.6	Actividad Catalasa (CAT)	43
6.6.2.7	Determinación de Daño Histopatológico	43
VII.	RESULTADOS	45
7.1	Efecto de β -Glucano y de Polisacáridos Sulfatados en la promoción de indicadores de salud	45
7.1.1	Conteo Total de Hemocitos Circulantes	45
7.1.2	Actividad Superóxido Dismutasa en músculo y glándula digestiva	46
7.1.3	Actividad Catalasa en músculo y glándula digestiva	48

7.1.4	Actividad SOD en Hemocitos y Proteínas Plasmáticas	50
7.1.5	Tiempo de Coagulación	50
7.2	Efecto de β -Glucano y de Polisacáridos Sulfatados en la prevención de la infección del Virus del Síndrome de la Mancha Blanca (WSSV)	51
7.2.1	Reto Viral con WSSV	51
7.2.2	Daño histopatológico	53
7.2.3	Diagnóstico confirmativo de infección por WSSV	58
7.2.4	Conteo Total de Hemocitos Circulantes	58
7.2.5	Proteínas Plasmáticas	59
7.2.6	Tiempo de Coagulación y parámetros físicos de hemolinfa	60
7.3	Efecto de 1-6 β -Glucano y de Polisacáridos Sulfatados en la prevención de la infección de <i>Vibrio harveyi</i>	61
7.3.1	Reto bacteriano con <i>Vibrio harveyi</i>	61
7.3.2	Daño histopatológico	62
7.3.3	Conteo Total de Hemocitos Circulantes	75
7.3.4	Generación de Anión Superóxido	76
7.3.5	Actividad Superóxido Dismutasa	76
7.3.6	Proteínas Plasmáticas	77
7.3.7	Tiempo de Coagulación	78
7.4	Resumen de Resultados	79
VIII.	DISCUSIÓN	80
8.1	Potencial de 1-6 β -glucano y de polisacáridos sulfatados administrados por medio del alimento en la promoción de indicadores de estatus de salud en camarón blanco <i>Litopenaeus vannamei</i>	80
8.2	Potencial de 1-6 β -glucano y de polisacáridos sulfatados como medida profiláctica para la prevención de enfermedades en <i>L. vannamei</i>	84
IX.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	91
X.	LITERATURA CITADA	93

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Impacto de algunas enfermedades sobre la producción de camarón de cultivo en Asia	9
Figura 2.	Impacto de algunas enfermedades sobre la producción de camarón de cultivo en América	9
Figura 3.	Ciclo propuesto de un brote de WSS en un estanque de cultivo de zonas endémicas	13
Figura 4.	Esquema resumido de la respuesta inmune del camarón ante la presencia de un activador o antígeno	16
Figura 5.	Esquema general del diseño de la primera etapa experimental	30
Figura 6.	Esquema general del diseño de la segunda etapa experimental	36
Figura 7.	Esquema general del diseño de la tercera etapa experimental	40
Figura 8.	CTH al día 7 de administración	46
Figura 9.	CTH al día 14 de administración	46
Figura 10.	Actividad SOD en músculo a los 7 días de exposición	47
Figura 11.	Actividad SOD en G.D. a los 7 días de exposición	47
Figura 12.	Actividad SOD en músculo a los 14 días de exposición	48
Figura 13.	Actividad SOD en G.D. a los 14 días de exposición	48
Figura 14.	Actividad CAT en músculo después de 7 días de exposición	49
Figura 15.	Actividad CAT en G.D. después de 7 días de exposición	49
Figura 16.	Actividad CAT en músculo después de 14 días de exposición	49
Figura 17.	Actividad CAT en G.D. después de 14 días de exposición	49
Figura 18.	Actividad SOD en hemocitos a los 14 días de exposición	50
Figura 19.	Proteínas plasmáticas a los 14 días de exposición	50
Figura 20.	Sobrevivencia relativa en el tiempo transcurrido P.I. de WSSV	52
Figura 21.	Daño histopatológico en organismo Control (+) <i>A. Tejido hematopoyético; B. Órgano linfoide</i>	55
Figura 22.	Daño histopatológico en organismo BG-0.01. <i>A. Tejido hematopoyético; B. Órgano linfoide</i>	56
Figura 23.	Daño histopatológico en organismo PS-0.01. <i>A. Tejido hematopoyético; B. Órgano linfoide</i>	57

Figura 24.	Diagnóstico confirmativo de WSSV por medio de PCR	58
Figura 25.	Valores de CTH en los diferentes tratamientos del reto con el virus del síndrome de la mancha blanca	59
Figura 26.	Valores de CTH en los diferentes tratamientos durante el desarrollo de la infección del WSSV	59
Figura 27.	Niveles de proteínas plasmáticas en los diferentes tratamientos del reto con WSSV	60
Figura 28.	Niveles de proteínas plasmáticas en los diferentes tratamientos durante el desarrollo de la infección del WSSV	60
Figura 29.	Sobrevivencia relativa en el tiempo transcurrido P.I. de <i>Vibrio harveyi</i>	62
Figura 30.	Daño histopatológico en organismo control (+) a 48 hrs. P.I. Órgano linfoide (A y B)	67
Figura 31.	Daño histopatológico en organismo control (+) a 48 hrs. P.I. A. Glándula digestiva; B. Tejido conjuntivo	68
Figura 32.	Daño histopatológico en organismo Control (+) a 48 hrs. P.I. A. Corazón; B. Tejido nervioso	69
Figura 33.	Daño histopatológico en organismo Control (+) a 48 hrs. P.I. A. Tejido hematopoyético; B. Branquias	70
Figura 34.	Daño histopatológico en organismo BG-0.01 a 48 hrs. P.I. A. Órgano linfoide; B. Branquias	71
Figura 35.	Daño histopatológico en organismo PS-0.01 a 48 hrs. P.I. A. Órgano linfoide; B. Branquias	72
Figura 36.	Daño histopatológico en organismo PS-0.01 a 48 hrs. P.I. A. Corazón; B. Tejido conectivo	73
Figura 37.	Daño histopatológico en organismo Control (+) a 144 hrs. P.I. A. Órgano linfoide; B. Corazón	74
Figura 38.	CTH a las 48 hrs. P.I. <i>V. harveyi</i>	75
Figura 39.	CTH a las 144 hrs. P.I. <i>V. harveyi</i>	75
Figura 40.	Generación de anión superóxido en hemocitos a las 48 hrs. P.I. <i>V. harveyi</i>	76

Figura 41. Generación de anión superóxido en hemocitos a las 144 hrs. P.I. <i>V. harveyi</i>	76
Figura 42. Actividad SOD en hemocitos a las 48 hrs. P.I. <i>V. harveyi</i>	77
Figura 43. Actividad SOD en hemocitos a las 144 hrs. P.I. <i>V. harveyi</i>	77
Figura 44. Proteínas plasmáticas a las 48 hrs. P.I. <i>V. harveyi</i>	78
Figura 45. Proteínas plasmáticas a las 144 hrs. P.I. <i>V. harveyi</i>	78

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Pérdidas económicas estimadas de algunas enfermedades del camarón	7
Tabla 2.	Tratamientos según aditivo y nivel de inclusión	24
Tabla 3.	Composición de los alimentos experimentales	24
Tabla 4.	Composición de la premezcla de vitaminas	25
Tabla 5.	Composición de la premezcla de minerales	26
Tabla 6.	Inóculos elaborados para la determinación de la dosis a utilizar	38
Tabla 7.	Distribución y grado de daño histopatológico en los diferentes tratamientos retados a WSSV	53
Tabla 8.	Valores de Tiempo de Coagulación, así como diversos aspectos físicos de la hemolinfa en los diferentes tratamientos del reto con WSSV	61
Tabla 9.	Distribución y grado de daño histopatológico a las 48 hrs. P.I. en el reto con <i>V. harveyi</i>	63
Tabla 10.	Distribución y grado de daño histopatológico a las 144 hrs. P.I. en el reto con <i>V. harveyi</i>	64
Tabla 11	Tiempos de Coagulación observado en los tratamientos en diferentes momentos de la infección	78
Tabla 12.	Resumen global de los principales resultados	79

I. INTRODUCCIÓN.

La producción de crustáceos es una actividad de alto valor a nivel mundial. Estos tienden a tener un valor monetario mayor y una producción anual arriba de los 8 millones de toneladas métricas. De este estimado aproximadamente la mitad corresponde a los camarones peneidos, y la proporción de ésta producción que procede de granjas se ha incrementado rápidamente desde la década los 80's (Smith *et al.*, 2003). La rápida expansión de la industria de la camaronicultura ha sido plagada de enfermedades que afectan la supervivencia y el crecimiento de los organismos (Lightner & Redman, 1998; Aguirre & Ascencio, 2000). Tanto el cultivo extensivo como el cultivo intensivo, conllevan el riesgo de enfrentar pérdidas financieras a causa de enfermedades, ya sea por una elevada mortalidad, mermas en los parámetros productivos o bien por la disminución de la calidad del producto (Smith *et al.*, 2003).

Los brotes de enfermedades en la acuicultura están reconocidos como uno de los factores limitantes de mayor importancia para la producción. Las mortalidades representan una pérdida directa de la inversión en alimento, trabajo, organismos, y otros componentes del costo total de la misma (Plumb, 2001; Harper, 2002;). Esto representa uno de los mayores problemas para el desarrollo de la industria ya que el costo económico para la industria acuícola es considerable (Aguirre & Ascencio, 2000).

Parásitos, hongos, bacterias y virus son las causas generales de enfermedad, siendo los últimos, aquellos patógenos más importantes a los que se enfrenta la actividad acuícola. Se conocen alrededor de 22 virus que pueden infectar a los camarones (Lightner, 2001). En los últimos años, muchas granjas camaronícolas alrededor del mundo han sido golpeadas en forma severa particularmente por este tipo de etiologías tales como el Virus de la Cabeza Amarilla (YHV), el Virus del Síndrome de Taura (TSV) y el Virus del Síndrome de la Mancha Blanca (WSSV) (Durand *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 2003). Estas diversas epizootias han llevado casi al colapso de la industria en varios países, entre ellos, China, Tailandia, Indonesia, Taiwán y Ecuador (Aguirre & Ascencio, 2000).

No existe un tratamiento específico para algunas enfermedades, especialmente para las enfermedades virales del camarón. Por esta razón, recientemente se han desarrollado un número de estrategias para favorecer la salud de los organismos (Aguirre & Ascencio, 2000). Investigaciones llevadas a cabo en los últimos 15 años, han remarcado a un grupo de compuestos que pretenden aumentar la inmunidad o la resistencia a las enfermedades (Raa, 1996; Raa, 2000), denominándoseles inmunoestimulantes.

II. ANTECEDENTES

2.1 Estado de la Acuicultura.

La definición de *acuicultura* la señala como la actividad de producción o cultivo de organismos acuáticos, incluyendo peces, moluscos, crustáceos y plantas (GESAMP, 2001). Esta actividad ha sido y es el sistema de producción alimenticio de mayor crecimiento (Naylor et al., 2000; FAO, 2004) respecto al resto de los sectores productores de alimento en las últimas décadas. A nivel mundial este sector ha crecido 8.9% en promedio anual desde 1970, a diferencia de 1.2% de pesquerías y 2.8% para los sistemas de producción con animales de granja (FAO, 2004; GESAMP, 2001). Dentro del abastecimiento mundial de proteína de origen animal, la contribución de la proteína de animales acuáticos ha sido del 16% desde 1996 (FAO, 2004).

De acuerdo con las estadísticas de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (2004), la contribución de la acuicultura al abastecimiento mundial de peces, crustáceos y moluscos, continúa creciendo, y ha pasado de un 3.9% de la producción total mundial en 1979 a 29.9% para el año 2002. En este mismo año la producción acuícola mundial fue de 51.4 millones de toneladas con un valor de \$60 mil millones de dólares. En éste panorama, México se encuentra en el lugar número 29, sin embargo, nuestro país es el séptimo lugar en crecimiento anual (FAO, 2004), y donde la producción de acuicultura para el 2003 representa el 13% del volumen total y 31% del valor de la generación pesquera nacional (SAGARPA, 2003).

Dentro de la misma actividad acuícola, el área de crecimiento superior a nivel mundial es la de los crustáceos, con 11% anual para el bienio 2000-2002 y dentro de ésta, la producción de camarones peneidos es el común denominador (FAO, 2004). Igual tendencia se observa en México, donde en el año 2003, el 30% del producto proveniente de acuicultura fue camarón, con 62,361 toneladas producidas y un valor aproximado de \$2.5 mil millones (M.N.). De este volumen el 85% se distribuyó sólo entre los estados de Sonora y Sinaloa, con 31,073 y 21,841 toneladas respectivamente (SAGARPA, 2003).

Con sus 30 años de antigüedad, la importancia de la industria de camarones peneidos, no sólo en México si no a nivel de la economía global, se ve reflejada por sus números de producción, aproximadamente 800,000 toneladas de camarón anualmente y además por los millones de personas empleadas directa o indirectamente por la misma (Lightner & Pantoja, 2001), obteniendo un enorme peso económico y social (Rodríguez & Le Moullac, 2000).

2.2 Sanidad Acuicola

La sustentabilidad y el desarrollo del cultivo de camarón a nivel mundial podrían estar en riesgo ya que los problemas ecológicos y sobre todo patológicos se han incrementado en la mayoría de los países productores (Bachere, 2000). No obstante los índices de crecimiento y expansión de la industria obtenidos en los últimos años, puede percibirse una desaceleración en la expansión de áreas de

cultivo y en el volumen de producción, debido principalmente a una degradación del medio ambiente, a un mal manejo de granjas, así como a pérdidas por enfermedades (Subasinghe *et al.*, 1998; Hernández-Rodríguez *et al.*, 2001). Éstas últimas han sido reconocidas por largo período como uno de los factores de restricción del desarrollo, expansión e intensificación del cultivo de camarón (Brock & LeaMaster, 1992; de Siqueira, 1997, Hernández-Rodríguez *et al.*, 2001) y en la actualidad están teniendo un efecto devastador en la productividad y rentabilidad de las granjas de camarón alrededor del mundo (Lotz *et al.*, 2001).

Las enfermedades más importantes del cultivo de camarones peneidos, en términos de impacto económico, en Asia, en el Indo-Pacífico, y en América, son de etiología infecciosa (Lightner & Pantoja, 2001). La industria del camarón ha sido afectada desde sus inicios por este tipo de enfermedades, causando grandes pérdidas de producción (Rodríguez & Le Moullac, 2000) El número de enfermedades infecciosas se ha incrementado significativamente en los últimos años (Brock & LeaMaster, 1992; de Siqueira, 1997). Por mencionar, en 1989 se tenían listados sólo 6 virus en todo el mundo, para 1996 se elevó por arriba de 20 los virus identificados como patógenos que afectan a los camarones peneidos silvestres y en producción (Hernández-Rodríguez *et al.* 2001; McClennen, 2004).

Algunas enfermedades, como nematodosis, cestodosis, neoplasias, necrosis hialina, epicomensales, no constituyen mayor preocupación para los acuicultores (Johnson, 1990; de Siqueira, 1997), por otro lado, muchas de ellas

han proliferado para amenazar la industria acuícola del camarón (McClennen, 2004), por lo que representan una seria amenaza alrededor del mundo (de Siqueira, 1997). Las enfermedades de etiología bacteriana, parasítica y micótica son causas de mortalidad y pérdidas en producciones (Brock & LeaMaster, 1992). Sin embargo, de entre las enfermedades infecciosas, aquellas de etiología viral son, con mucho, las más importantes y constituyen una de las mayores preocupaciones para la industria (de Siqueira, 1997; Hernández-Rodríguez *et al.*, 2001; Lightner & Pantoja, 2001) ya que poseen un gran poder destructivo.

Las panzootias debido al Virus del Síndrome de la Mancha Blanca (WSSV) y el Virus del Síndrome de Taura (TSV), y en menor distribución el Virus de la Cabeza Amarilla (YHV) y el Virus de la Necrosis Hipodérmica y Hematopoyética Infecciosa (IHHNV), le han ocasionado a la industria camaronícola miles de millones de dólares en pérdidas de cultivo (Tabla 1), trabajos e ingresos por exportaciones (Fegan & Clifford, 2001; Lightner & Pantoja, 2001). Sin lugar a dudas, la característica epizootica de éstas enfermedades virales ha sido asociada con el virtual colapso de granjas alrededor del mundo (de Siqueira, 1997).

La siguiente tabla presenta el costo económico de las principales enfermedades virales en el mundo desde su descubrimiento hasta el año 2001.

Tabla 1. Pérdidas económicas estimadas de algunas enfermedades del camarón.

Virus	Año de Descubrimiento	Pérdidas estimadas al año 2001.
WSSV – Asia	1992	US\$4000-6000*
WSSV – América	1999	US\$>1000*
TSV	1991-92	US\$1000-2000*
YHV	1992	US\$100-500*
IHHNV	1981	US\$500-1000*

*Millones de dólares

(Adaptado de Lightner & Pantoja, 2001)

En algunos casos, los problemas sanitarios han contribuido sólo al cierre de algunas granjas y criaderos, pero en otros, han llevado casi al colapso la industria regional o nacional (Brock & LeaMaster, 1992). Las enfermedades causan pérdidas estimadas por arriba de los 3 mil millones de dólares cada año en la industria mundial (Fegan & Clifford, 2001; Hernández-Rodríguez *et al.*, 2001).

Algunas cifras reportadas por pérdidas debido a problemas sanitarios. En Asia (Fig. 1), específicamente en Japón se estiman pérdidas del 3.4% del total de la producción para 1984 (Brock & LeaMaster, 1992). En Taiwán enfermedades se han asociado a la caída de la industria de *Penaeus monodon* en 1987-1988, lo que causó la disminución de la producción anual en 70-80% para ese período y que continuó afectándola en los años siguientes (de Siqueira, 1997). China, el líder de la producción de camarones cultivados, sufrió en 1991 una dramática pérdida del 75% (200,000 TM) debido a WSSV (de Siqueira, 1997; Fegan & Clifford, 2001). YHV fue reportado por primera vez en Taiwán en 1992 causando

cerca de 70 millones de dólares en pérdidas directas. En ese continente TSV se relaciona con pérdidas por varios cientos de millones de dólares más recientemente. (Fegan & Clifford, 2001). Para 1995 fueron estimados alrededor de tres mil millones de dólares por diferentes enfermedades (Smith et al, 2003). En el hemisferio oeste (Fig. 2) tan sólo TSV ha sido asociado con mortalidades del 80-90% de granjas camaroneras de *Litopenaeus vannamei*, en Ecuador 1992-1994 y Honduras 1994 (de Siqueira, 1997) y ha causado pérdidas por 1000-1300 millones de dólares en la misma década (Fegan & Clifford, 2001; Hernández-Rodríguez et al., 2001). En Centro y Sudamérica se observó una caída de su producción de un 17% durante el período de 1998 y 1999 (Smith et al., 2003). En Ecuador las pérdidas debido a WSSV es estiman por encima de mil millones de dólares en 1999-2000 y la reducción en un 66% en la producción (Fegan & Clifford, 2001). Para el final del año 2002 Ecuador había perdido el 50% de sus granjas camaroneras, 74% de los laboratorio productores de post-larvas, 60% de las plantas procesadoras y 153 mil empleos directos (Perspectivas, 2005).

Aunque los brotes catastróficos de enfermedades son por mucho la mayor fuente obvia de pérdidas productivas, el impacto de enfermedades crónicas no catastróficas es importante, como ciertas presentaciones de IHHNV y de Vibriosis, pero la extensión de estas pérdidas es difícil de establecer, aunque algunos indicadores se pueden obtener de la tasa de supervivencia. Dicha tasa anda entre

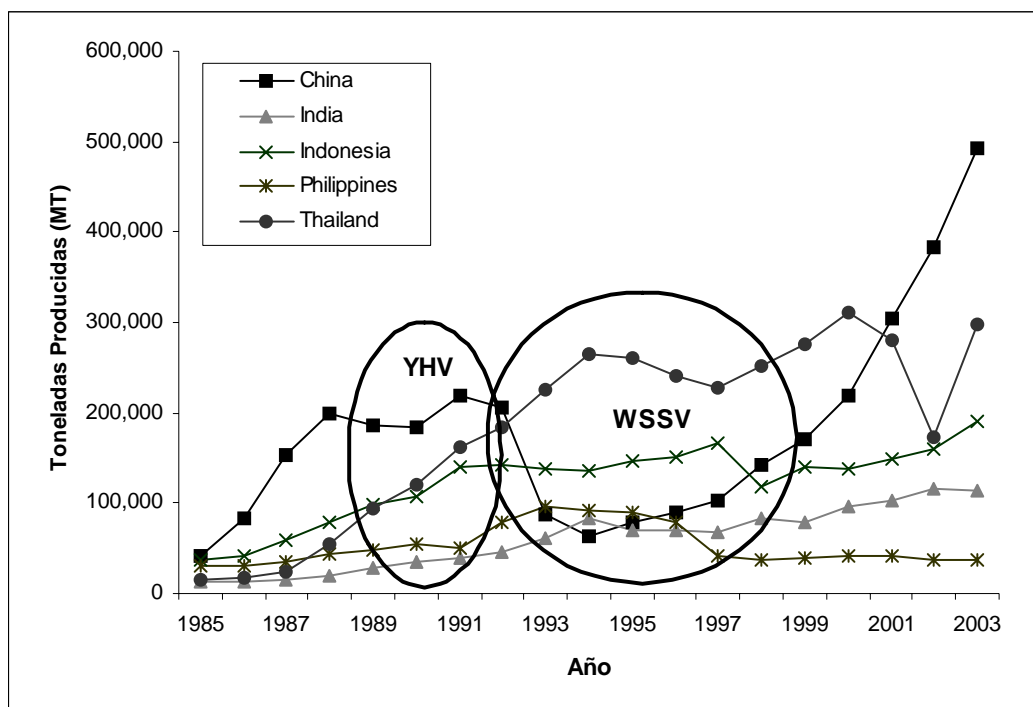


Fig. 1. Impacto de algunas enfermedades sobre la producción de camarón de cultivo en Asia. (Adaptado de McClennen, 2004).

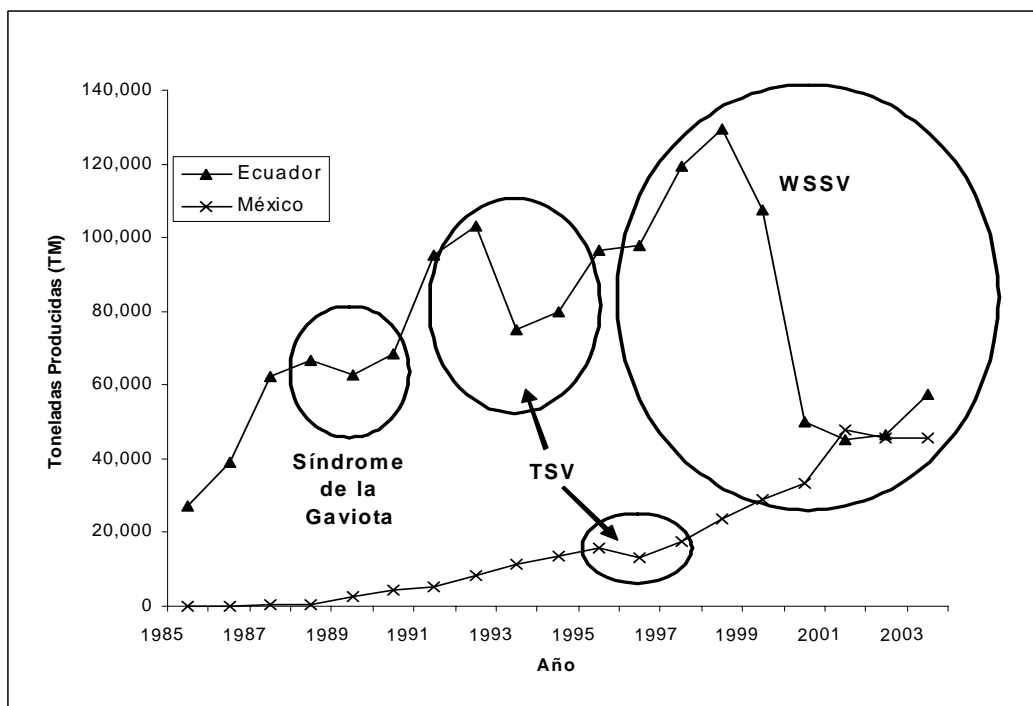


Fig. 2. Impacto de algunas enfermedades sobre la producción de camarón de cultivo en América. (Adaptado de McClennen, 2004).

el 40-60% en las granjas comerciales y una porción significativa se relaciona con enfermedades, las pérdidas pueden ser pequeñas pero son acumulativas, por lo que el costo de una producción ineficiente puede llegar a ser considerable y debería ser tomado en cuenta (Fegan & Clifford, 2001).

Es claro que el problema de las enfermedades para la industria del cultivo de camarón es severo, es un hecho que ha sido reconocido por el Grupo del Banco Mundial, dicho organismo ha recomendado que debiera hacerse una inversión aproximada de \$275 millones de dólares para la investigación de las enfermedades del camarón durante el período de 1996-2010 (Smith *et al.*, 2003).

La sustentabilidad de la industria del cultivo de camarón depende enormemente del control de enfermedades y del estado de salud de los organismos (Rodríguez & Le Moullac, 2000). En el corto plazo, el desarrollo de técnicas más apropiadas para el diagnóstico de enfermedades así como la evaluación de técnicas concernientes a la evaluación de la inmunidad del camarón, podría reducir el impacto de las enfermedades sobre la industria (Hernández-Rodríguez *et al.*, 2001).

2. 3. Síndrome de la Mancha Blanca

El síndrome de la mancha blanca (WSS) constituye hasta el momento el problema de sanidad acuícola más devastador y de mayor impacto para el camarón de cultivo (van de Braak, 2002; Wu *et al.* 2002; Maldonado *et al.*, 2004).

Ya que ha causado una reducción importante de la producción de camarón (Fig. 1 y Fig.2), grandes mortalidades y por lo tanto serias pérdidas económicas alrededor del mundo (Sangamaheswaran & Jeyaseelan, 2001; Venkateswara *et al.* 2003; Jiravanichpaisal, 2005), diezmando así la industria del camarón (Soto & Lotz, 2001). Por este motivo ha sido objeto de exhaustivo estudio en los últimos años por encima de otras afecciones de los crustáceos (Claydon *et al.*, 2004).

2.3.1 Etiología.

El agente etiológico del WSS o WSD es el virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV), el cual pertenece a la familia *Nimaviridae* del género *Whispovirus* (ICTV, 2005). Es un virus envuelto de doble cadena de DNA (*dsDNA*), posee forma elíptica o de bastón, con un apéndice en forma de cola o flagelo en un extremo del virión; sus medidas oscilan entre los 70-150nm de diámetro y de 275-380nm longitud. El tamaño de su genoma puede variar de 290 a 305 kpb (Tang & Lightner, 2000; van Hulten *et al.*, 2001; Huang *et al.*, 2002; OIE, 2003; Kim *et al.*, 2004; Jiravanichpaisal, 2005).

2.3.2 Epizootiología.

El virus del Síndrome de la Mancha Blanca fue identificado por primera vez en Asia al principio de la década de 1990, se señalan varios lugares como el lugar de hallazgo: Taiwan (Van Hulten *et al.*, 2001), Tailandia (You *et al.*, 2002), China (Kono *et al.*, 2004), Japón (Wu *et al.*, 2002). Lo importante es que el virus se propagó por diversos países Asiáticos, para 1995 fue identificado por primera vez

en el continente Americano, en el país de Estados Unidos (Rosenberry, 1996). Ya en 1999 se encontraba en granjas de Centroamérica, Sudamérica, y recientemente fue detectado en Europa y Australia (Rosenberry, 2000). En México se definió la presencia de WSSV en Julio de 1999; en granjas de cultivo de peneidos en las costas de Sonora y Sinaloa (Unzueta-Bustamante *et al.*, 2002).

Casi todas las especies de peneidos son susceptibles a este virus. Las principales especies infectadas reportadas son: *Penaeus monodon*, *P. chinensis*, *P. indicus*, *P. penicillatus* y *P. japonicus*, *Metapenaeus ensis*, *P. aztecus*, *P. duorarum*, *P. merguensis*, *P. semisulcatus*, *L. stylirostris*, *L. vannamei*, y *Trachypenaeus curvirostris* (Wang *et al.*, 2000).

Chapman *et al.* (2004) y Chakraborty *et al.* (2002) reportan la presencia del virus en poblaciones de camarones silvestres de la costa del atlántico occidental y en las costas de la India, respectivamente, y señalan la posibilidad de que estas poblaciones puedan causar infección en camarones de cultivo.

En la Figura 3 se propone un resumen del complejo ciclo multifactorial que pudiera resultar en un brote del síndrome en un estanque o granja de regiones endémicas.

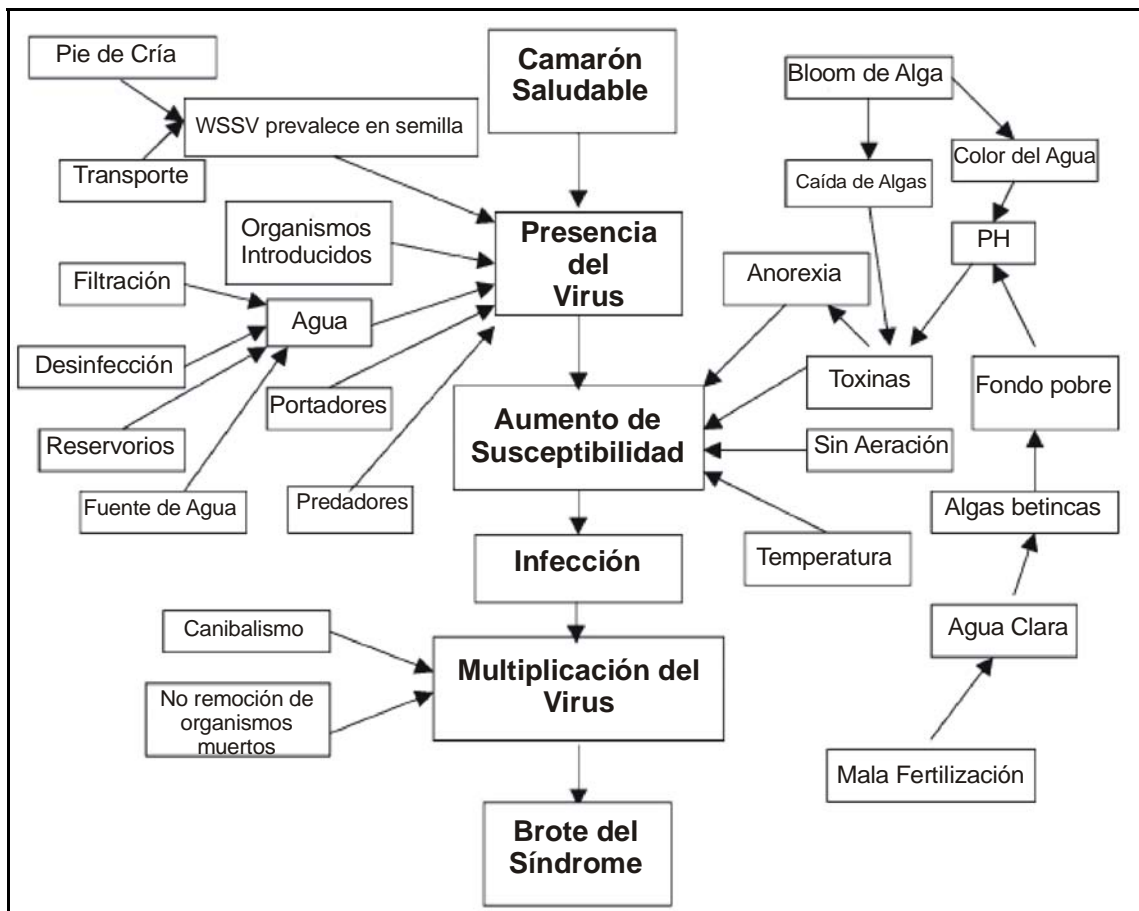


Fig. 3. Ciclo propuesto de un brote de WSS en un estanque de cultivo de zonas endémicas (Adaptado de MPEDA/NACA, 2003).

2.3.3 Prevención y Control.

Se han intentado numerosas estrategias para el control de las enfermedades virales en los camarones peneidos de cultivo. Estas estrategias van desde el mejoramiento de las prácticas de crianza hasta la creación de poblaciones “Libres de Patógenos Específicos (SPF) o “Resistentes a Patógenos Específicos (SPR) (Lightner, 2001), y últimamente líneas genéticamente resistentes.

El manejo y control de las enfermedades es el mayor impedimento para una industria sustentable, Newman (1999) señala tres grupos de herramientas esenciales para el control de las enfermedades: diagnóstico oportuno de los agentes patógenos, alimentos y suplementos alimenticios de alta calidad, y por último compuestos que ayuden al camarón con su propia defensa durante un brote de una determinada enfermedad, dichos compuestos son inmunoestimuladores no específicos. Bachère *et al.* (1995) señala la gran necesidad de maximizar la inmunocompetencia de los organismos. Existe un aumento en el interés en encontrar formas de proteger a los cultivos profilácticamente de manera equivalente al uso de vacunas de rutina en humanos, animales domésticos y más recientemente en cultivos de peces (Smith *et al.*, 2003) y ya que los camarones no pueden ser vacunados estos compuestos propondrían jugar un papel crítico para asegurar el bien de la industria (Newman, 1999).

2.4 Respuesta de Defensa del Camarón.

Los camarones Peneidos no poseen un sistema inmunológico específico ni capacidad de memoria, lo que impide la utilización de vacunas. En la respuesta inmunológica de los Peneidos, se distinguen los efectores celulares y los humorales, que actúan en conjunto para eliminar los agentes indeseables. Esta respuesta inmune se da en dos fases, una fase inmediata asociada a los efectores celulares y una segunda fase caracterizada por la síntesis de efectores humorales (Rodríguez, 1996, Berger, 2000).

2.4.1 Componentes Celulares.

La respuesta inmune celular es mediada por los hemocitos, quienes poseen funciones importantes como la coagulación, reconocimiento de lo no propio, fagocitosis, melanización, encapsulación, citotoxicidad, y comunicación intercelular (Rodríguez, 1996; Newman & Bullis, 2001).

Los hemocitos han sido clasificados en granulares, semigranulares y hialinos. Estos últimos son los responsables de la fagocitosis y el inicio de la coagulación; los semigranulocitos son importantes para la comunicación intercelular, encapsulación de partículas demasiado grandes para su fagocitosis, y como reservorio y liberación de químicos citotóxicos, así como enzimas de defensa como la proPO. Por último los granulocitos están primariamente involucrados en la degranulación de proPO y enzimas lisosomales (citotoxicidad) y péptidos antimicrobianos (Newman & Bullis, 2001; Smith *et al.*, 2003).

2.4.2 Componentes Humorales.

Los componentes humorales son originados o residen dentro de los hemocitos y son liberados mediante la degranulación en la respuesta inmune primaria. Estos compuestos son principalmente factores de reconocimiento de lo no propio y citotóxicos, e incluyen una variedad de enzimas defensivas, lectinas, lipoproteínas, péptidos antimicrobianos e intermediarios de especies reactivas de oxígeno (Newman & Bullis, 2001).

La respuesta inmune completa siempre se logra entonces, por medio de la cooperación e interacción entre los diferentes tipos de hemocitos y sus productos, siendo incorrecto pensar que la fase humoral empieza ya terminada la fase celular, pues ambas se ven relacionadas durante todo el proceso inmunológico, sin embargo debiera iniciar con la activación hemocítica (Fig. 4).

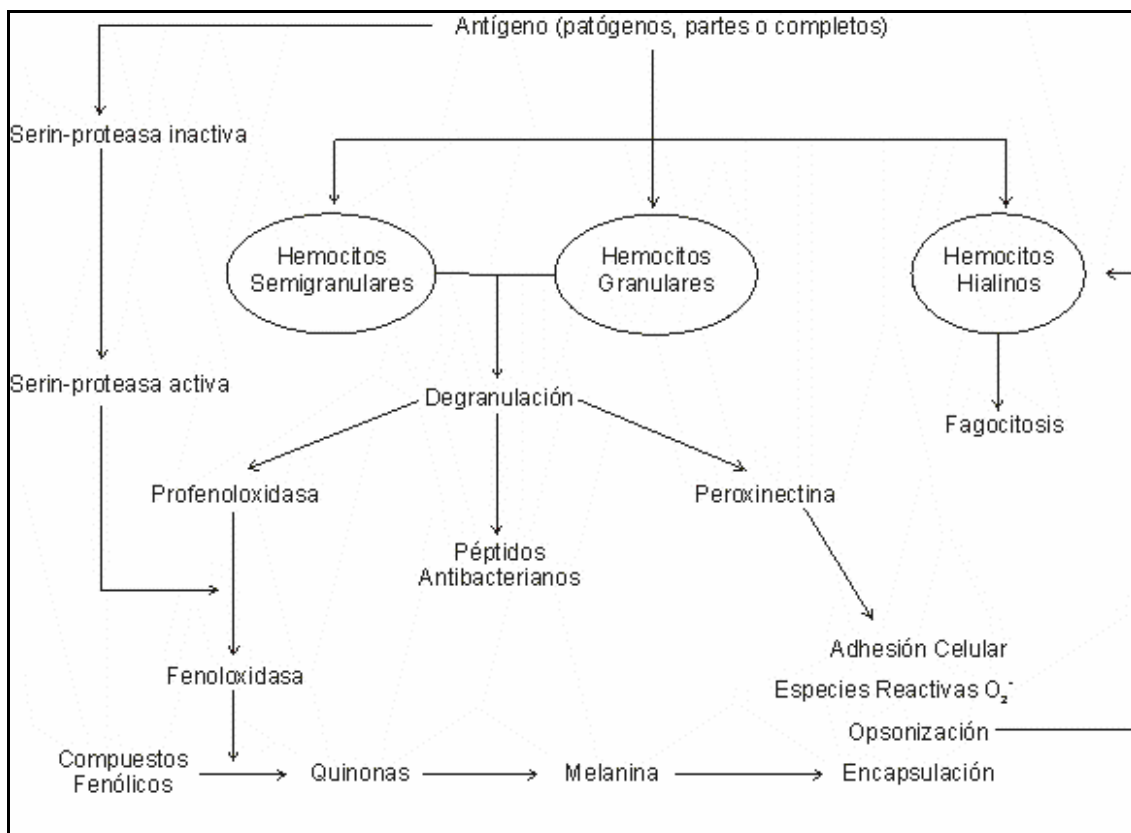


Fig. 4. Esquema resumido de la respuesta inmune del camarón ante la presencia de un activador o antígeno. (Adaptado de Smith, 2003)

2.5 Inmunoestimulantes.

La inmunidad innata entonces proporciona al huésped una importante y rápida primera línea de defensa que impide la invasión de los patógenos. El reconocimiento por el sistema inmune innato de algunas moléculas que no se encuentran en las células eucariotas, indica la presencia de una infección (Peñate & Peña, 2001). Por tanto, la administración de estas moléculas puede ser aprovechada para estimular inmunológicamente a un organismo (Berger, 2000), disparando la activación hemocítica y por lo tanto el inicio de la respuesta celular y humoral (ver Fig. 4). Se ha encontrado que diversos compuestos poseen propiedades inmunoestimulantes, la mayoría de estos son elementos estructurales de bacterias, hongos y levaduras (Raa, 2000). Más de una docena se han evaluado en peces y camarones (Raa, 1996), pero solo pocos se han evaluado para determinar el impacto sobre los virus que afectan a los camarones y menos aún, específicamente para WSSV. Se han reportado actividad-antiviral en camarones para lipopolisacáridos, peptidoglicanos, glucanos y polisacáridos sulfatados (Newman, 1999).

2.5.1 β -glucanos.

Los glucanos son un grupo heterogéneo de polímeros de glucosa con diferentes tipos de enlace entre ellos, están presentes como elementos estructurales de levaduras, hongos y algunas plantas (Cleary, 1999, Raa, 2000, Newman & Bullis, 2001). Los enlaces más comunes asociados a propiedades

inmunoestimulantes son β 1-3 y β 1-6 (Newman & Bullis, 2001). Varios reportes a lo largo de 30 años han descrito su rol como modificadores de respuestas biológicas y su uso potencial de inmunoterapéuticos. Las actividades biológicas asociadas con el uso *in vivo* de estas moléculas incluyen, inhibición tumoral, incremento de la defensa contra desafíos bacterianos, incremento de la actividad hematopoyética y mejoramiento de la reparación de lesiones. *In vitro*, se les ha atribuido influencia sobre la morfología de células de defensa, liberación de moléculas de comunicación intercelular y de inflamación, liberación de óxido nítrico, secreción de enzimas lisosomales, liberación de peróxido de hidrógeno, metabolismo del ácido araquidónico, y activación de la vía alternativa del complemento (Cleary, 1999).

2.4.2 Polisacáridos Sulfatados.

Los polisacáridos sulfatados existen en diversas especies de animales y de plantas, los cuales demuestran diversas funciones químicas y biológicas. Estos se encuentran en la cara externa de las membranas celulares. Algunas algas contienen polisacáridos sulfatados como el fucoidan y la carragenina; estos polisacáridos tienen diferentes roles estructurales y de defensa en las plantas. Están compuestos por homopolímeros o heteropolímeros de diversos sacáridos como L-fucosa y D-galactosa además de uno o varios grupos sulfato (Toida *et al.*, 2003). Sus funciones biológicas dependen en gran medida de la presencia y posición espacial de estos grupos. Dentro de sus funciones biológicas se

encuentran efectos anticoagulantes y antiproliferativas, avivación de células de defensa, actividad antiinflamatoria, inhibición de la angiogénesis, actividad antitumoral, actividad antibacteriana, antiparasitaria y antiviral (Guzmán-Murillo 1997; Toida *et al.*, 2003; Haneji *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2006). Su función en el aspecto defensivo es de prevenir la adhesión del patógeno y proteger al mismo organismo durante la respuesta inflamatoria (Laoumonier *et al.*, 2003; Hirayasu *et al.*, 2005).

Tanto los β -glucanos como los polisacáridos sulfatados vienen siendo incorporados a las dietas de organismos cultivados, siendo utilizados como *aditivos* de alta calidad, ya que presentan la facilidad de dosificación oral, siendo esta práctica también muy común en otras producciones animales (Newman, 1999). El potencial que muestran como estimuladores del sistema inmune de los camarones cultivados es grande por las ventajas que presentan como: ausencia de toxicidad ó residuidad, no generar resistencia, facilidad de dosificación y por no ocasionar un impacto negativo en el entorno ó el consumidor. Particularmente, la utilización de estas sustancias promete ayudar a reducir las oportunidades de ataque de patógenos, en los casos previsibles de estrés como manipulaciones, cosechas parciales, transferencias, así como variaciones ambientales por recambios, tratamientos químicos, u otros (Berger, 2000).

III. JUSTIFICACIÓN.

En materia sanitaria, desde 1999 el virus del síndrome de la mancha blanca ha causado estragos en la industria acuicultora de camarón, especialmente en Ecuador y otros países de Centro y Sudamérica. En México, en el año 2000, los virus de la mancha blanca y taura afectaron esta actividad, causando mortalidades por encima de lo habitual, originando cosechas tempranas y por ende de tallas pequeñas. No obstante, aún cuando el impacto negativo del síndrome de la mancha blanca en la camaronicultura nacional no ha alcanzado la dimensión que se ha registrado en Ecuador en años anteriores, si debemos de estar preparados para no exponer ésta industria mexicana a semejantes estragos.

La acuicultura de camarón en América Latina ha sido una de las actividades económicas de mayor crecimiento productivo y económico durante los últimos 15 años, a pesar de tener que enfrentar problemas de tipo sanitario y meteorológico. México ha logrado mantener el cultivo del camarón en un crecimiento anual de 15%. Con una producción en el año 2002 de 45,853 toneladas. La mayor parte de esta producción (90% aprox.) se concentra en los estados de Sonora y Sinaloa con 18,425 y 22, 500 toneladas respectivamente.

Por lo tanto, se convierte de vital importancia contar con las herramientas necesarias para prevenir y/o controlar las enfermedades del camarón, en especial el síndrome de la mancha blanca. Con ello se estaría asegurando la continuidad de esta actividad socioeconómica tan importante especialmente en el noroeste del

país. Tan solo en Sinaloa hay más de 200 granjas operando y da empleo directo e indirecto a más de 4100 personas.

Existen diversas maneras para evitar la aparición de enfermedades o bien epizootias. Esto es abarcando tres áreas, el medio ambiente donde habita el posible hospedero, manteniendo nulo o bajo los niveles de patógenos y por último el mantenimiento de un estado de salud óptimo de los hospederos, lo cual requiere de una nutrición balanceada del organismo. En conjunto con las posibles medidas de manejo y bioseguridad que se pueden adoptar para tratar las primeras dos áreas, es conveniente la utilización de productos que permitan mejorar y mantener un estatus de salud adecuado en los organismos. Los inmunoestimulantes son hoy en día una de las opciones más prometedoras para satisfacer la necesidad antes mencionadas. Sin embargo, es necesaria una mayor investigación sobre estos compuestos para llenar vacíos de información a cerca de su efectividad como herramienta preventiva confiable para el acuicultor y que en muchas ocasiones son utilizados de manera empírica.

Por lo anterior la presente investigación esta encaminada a la evaluación de la capacidad que puedan tener inmunoestimulantes de origen glucosídico, sobre el sistema inmune del camarón para mejorar su estatus de salud, y por así, prevenir la enfermedad del síndrome de la mancha blanca y Vibriosis sistémica. Lo cual tiene aplicación directa en el cuidado sanitario de la camaronicultura en México así como las de otros países en desarrollo de la región.

IV. HIPÓTESIS.

La administración de β -glucanos y/o polisacáridos sulfatados por medio del alimento tendrá un efecto benéfico en el estatus de salud del camarón y por lo tanto en la prevención de la infección del Virus del Síndrome de la Mancha Blanca (WSSV) y de la bacteria *Vibrio harveyi* en juveniles de *Litopenaeus vannamei*.

V. OBJETIVOS.

5.1 Objetivo general.

Evaluación de dos inmunoestimulantes de origen glucosídico, β -glucanos y polisacáridos sulfatados, en la prevención de infección del virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV) y de la bacteria *Vibrio harveyi* en juveniles de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*.

5.2 Objetivos específicos.

- i)* Evaluación de β -glucanos y polisacáridos sulfatados incluidos en el alimento, en cuanto a su potencial para promover indicadores de estatus de salud.
- ii)* Evaluación de β -glucanos y polisacáridos sulfatados incluidos en el alimento, para determinar su potencial profiláctico para prevenir la infección del Virus del Síndrome de la Mancha Blanca (WSSV).
- iii)* Evaluación de β -glucanos y polisacáridos sulfatados incluidos en el alimento, para determinar su potencial profiláctico para prevenir la infección de *Vibrio harveyi*.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Compuestos glucosídicos.

6.1.1 Beta-glucano.

El β -glucano utilizado fue de la casa SALT Creek-Microfeast, comercializadora estadounidense. El componente principal es 1-6 β -glucano extraído de *Saccharomyces cerevisiae*.

6.1.2 Polisacáridos sulfatados.

Los polisacáridos sulfatados utilizados fueron producidos y donados por la Dra. Guzmán Murillo (2002), en el CIBNOR S.C., extraídos de microalga *Chaetoceros muelleri* (cepa de IFREMER), por el método de precipitación con cloruro de cetil pirimidio CPC.

6.2 Fabricación de los alimentos problemas y control.

6.2.1 Formulación de los alimentos.

Se formularon 7 alimentos balanceados para camarón por medio del paquete computacional MIX-IT-Win^{MR}. El alimento control formulado fue el reportado por Goytortúa-Bores (2000) modificado para un contenido de proteína de 35% y 8% de lípidos. Dicho alimento se tomó como base para el resto de los alimentos a los cuales se agregó el aditivo a probar. La formulación se modificó en base a la harina de trigo para manejar tres niveles de inclusión para cada uno de los compuestos, 0.01%, 0.1% y 0.5%. Los alimentos formulados (Tabla 3) fueron

Nutriente	Base seca	Base seca	Base seca	Base seca	Base seca	Base seca	Base seca
Proteínas	34.61	34.75	35.18	34.73	34.85	34.94	34.44
Extracto etéreo	8.14	7.70	7.86	7.87	8.16	8.03	8.12
Fibra cruda	0.89	0.83	0.51	0.77	0.54	0.82	0.79
Cenizas	7.56	4.73	7.62	7.68	7.57	4.65	7.93
Extracto libre de nitrógeno	48.81	51.99	48.83	48.88	48.88	51.55	48.71
Energía (cal/g)	4601.24	3942.21	4570.15	4579.16	4582.64	4068.11	4590.94

¹Harina Integral de Trigo HIT0312 (PIASA S.A.), ²Pasta de Soya PS0312 (PIASA S.A.), ³Harina de Pescado HP0312 (PIASA S.A.), ⁴Gluten de Trigo GT0107-1 (Gluten y Almidones Industriales S.A. de C.V.), ⁵Aceite de Hígado Bacalao AcHB0312-1 (Farmacia PARIS), ⁶Ácido algínico Sigma A-7128, ⁷Premezcla de Vitaminas VITCRU0409, ⁸Lecitina de Soya LS0303 (ODONAJI), ⁹Aceite de Girasol ACGir0410 (Aceites, grasas y derivados S.A., de C.V.), ¹⁰Fosfato dibásico de Sodio Sigma S-0876, ¹¹Colesterol Sigma, ¹²Premezcla de Minerales MINCRU0409, ¹³Cloruro de Colina <2004 Cloco62 (PIASA S.A.), ¹⁴Vitamina C (Stay-C 35% Agente activo) (Roche vitamins), ¹⁵ β -Glucano BGLu9801-SC (Salt-Creek-Microfeast), ¹⁶Poliscáridos Sulfatados PoliSulf0409 (CIBNOR, S.C.), ¹⁷BHT (butilato hidroxitolueno) <2004 ICN 101162.

Tabla 4. Composición de la premezcla de vitaminas.
(modificado de Davis and Arnold, 2000)

Vitamina	g/kg de premezcla	Número Catálogo ICN ¹ , SIGMA ²
Vitamina A (Retinol)	5.000	160079 ¹
Vitamina D ₃ (Colecalciferol)	0.001	160107 ¹
Vitamina E (Tocoferol)	8.000	100555 ¹
Vitamina K ₃ (Menadiona)	2.000	102259 ¹
Tiamina (B1)	0.500	T-4625 ²
Riboflavina (B ₂)	3.000	102813 ¹
Piridoxina (B ₆)	1.000	102777 ¹
Ácido D-Pantoténico	5.000	101228 ¹
Niacina (Ácido Nicotínico)	5.000	102446 ¹
Biotina	0.050	101023 ¹
Inositol	5.000	I-5125 ²
Cianocobalamina (B ₁₂)	0.002	103271 ¹
Ácido Fólico	0.180	101725 ¹
Celulosa (vehículo)	865.266	C-8002 ²

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

Tabla 5. Composición de la premezcla de minerales
(modificado de Davis and Arnold, 2000)

Mineral	g/500gr de premezcla	Número de Catálogo de SIGMA ¹
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.020	C-2644
CuSO ₄ · 5H ₂ O	1.250	C-7631
FeSO ₄ · 7H ₂ O	20.000	F-8048
MgSO ₄ · 7H ₂ O	141.990	M-1880
MnSO ₄ · H ₂ O	3.250	M-6528
KI	0.335	P-4286
Na ₂ SeO ₃	0.050	S-1382
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	65.965	Z-0501
Celulosa (vehículo)	267.140	C-8002

¹ Sigma Co. St. Louis. USA.

6.2.2 Elaboración de los alimentos.

Los alimentos se elaboraron en la planta de alimentos del Laboratorio de Nutrición Acuícola del CIBNOR-La Paz, siguiendo la metodología descrita por Civera y Guillaume (1989). Primeramente, se tamizaron los ingredientes sólidos a través de una malla de 250µm. Se hizo una premezcla de los macroingredientes secos (harina integral de trigo, pasta de soya, harina de pescado y gluten de trigo), por separado, se realizó una segunda premezcla con los microingredientes secos (ácido algínico, premezcla de vitaminas, fosfato dibásico de sodio, premezcla de minerales, cloruro de colina y vitamina C). A la par de estas dos premezclas se elaboró una emulsión con el aceite de hígado de bacalao, lecitina de soya, aceite de girasol, colesterol y BHT, tanto el β-glucano como los polisacáridos sulfatados, se incorporaron por medio de la emulsión según fuera el caso. El orden de mezclado final de los ingredientes fue de macroingredientes, posteriormente

microingredientes y por último la emulsión; todo ello con la ayuda de una mezcladora (KITCHEN AID^{MR}). Una vez homogenizados los ingredientes se agregó agua, a razón de aproximadamente 45% del peso de cada alimento. La masa resultante fue extruída en tres ocasiones en un molino de carne (TORREY^{MR}) para obtener pelets de 1/8" de diámetro, éstos últimos fueron cortados manualmente con espátula y posteriormente secados en horno eléctrico (VWR 1680, HAFO SERIES 1600^{TD}) a 40°C por un período de 12-18 hrs., hasta el momento en que se determinó que la humedad se aproximaba al 8% por medio de termobalanza (OHAUS MB200^{TD}). Los alimentos fueron empaquetados, etiquetados y almacenados en refrigeración (4°C) hasta el momento de su uso.

6.2.3 Análisis post-elaboración de los alimentos.

6.2.3.1 Hidroestabilidad de los alimentos.

A todos los alimentos se le realizó una prueba de estabilidad en el agua, según la metodología descrita por Goytortúa-Bores (2000).

6.2.3.2 Análisis químicos proximales.

Los alimentos fueron analizados en el Laboratorio de Análisis Químicos Proximales del CIBNOR, con el fin de obtener sus valores nutrimentales. Humedad (A.O.A.C., 1995, No. 930.15), proteína cruda (A.O.A.C., 1995, No. 976.05), extracto etéreo (A.O.A.C., 1995, No. 920.39), cenizas (A.O.A.C., 1995, No. 942.05) y energía (cal/g) por medio de calorímetro (Parr 1261).

6.3 Primera etapa experimental: Evaluación de efectos de la administración de β -glucano y polisacáridos sulfatados por medio del alimento.

6.3.1 Sitio Experimental.

El experimento se llevó a cabo en el Laboratorio de Nutrición Experimental del CIBNOR S.C., ubicado en el Km. 1 Carretera a San Juan de La Costa "EL COMITAN", a 20 Km. al norte de la ciudad de La Paz, B.C.S, México.

6.3.2 Organismos Experimentales.

Los organismos utilizados en el experimento fueron juveniles de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, los cuales fueron donados por la empresa Acuacultores de La Paz, S.A. de C.V. (APSA) ubicada en el Km. 10 de la carretera a Pichilingue B.C.S. Estos organismos se aclimataron colocándolos en tanques de plástico con capacidad de 600L, con una salinidad de 39ups, temperatura de $27^{\circ}\text{C} \pm 0.5$, y oxígeno >4 mg/L. Se utilizó alimento comercial con 35% de proteína, a una tasa de alimentación de 4% de la biomasa total en dos raciones, mañana y tarde.

6.3.3 Sistema de cultivo.

El sistema de cultivo utilizado para esta primera etapa experimental consistió en acuarios de fibra de vidrio con una capacidad de 60L. Cada acuario equipado con un exhaustor externo responsable de la aireación del agua, el cual permite mantener los niveles de O_2 disuelto >4 mg/L; de la misma forma cada uno

contiene un calentador sumergible de 250 ó 300W, el cual conserva la temperatura del agua en $27^{\circ}\text{C} \pm 0.5$. El sistema experimental posee iluminación artificial proporcionada por una línea de focos incandescentes de 60W, la cual es controlada por medio de un Timer con el fin de contar con un fotoperiodo programado en 12 hrs. luz (6 a 18 hrs.) – 12 hrs. oscuridad (18 a 6 hrs.). El agua utilizada es tratada por medio de un sistema de filtros, cuyo orden es el siguiente: filtro de arena de $70\ \mu\text{m}$, filtros de cartucho de $10\ \mu\text{m}$ y filtro de luz ultravioleta. Cada acuario está cubierto por una malla mosquitero para evitar la fuga de los organismos.

6.3.4 Diseño experimental.

Para el inicio del experimento, se realizó una biometría para elegir 175 organismos entre 11 – 13g de peso. Éstos fueron distribuidos aleatoriamente en los 35 acuarios hasta obtener una densidad de 5 camarones/acuario. A cada tratamiento se le asignaron 5 réplicas al azar, cuidando la no existencia de diferencias significativas ($p>0.05$) entre pesos de las réplicas de cada tratamiento y entre tratamientos.

El experimento tuvo una duración de 14 días, durante los cuales los organismos fueron alimentados con los alimentos experimentales que contenían los compuestos a evaluar. El control no tuvo ningún tipo de exposición a dichos compuestos. La tasa de alimentación manejada fue de 4% de la biomasa total del

acuario, dividida en dos raciones, una por la mañana y otra por la tarde (40 y 60% de la ración diaria respectivamente). Durante el experimento se monitorearon los parámetros fisicoquímicos señalados en el punto **6.3.3**. Todos los días se eliminaban los restos de alimento y heces por medio de sifoneo con manguera hidráulica de 1" de diámetro, y posteriormente se realizaba un recambio de agua equivalente al 70%. Una vez terminado el monitoreo y la limpieza de los acuarios se procedía a administrar la ración de alimento correspondiente.

El experimento fue programado para realizar tres muestreos (Fig. 5), los días 0, 7 y 14. En cada muestro se tomaron 3 camarones en estadio de muda C (intermuda) por tratamiento, a los cuales se les extrajo hemolinfa para conteo total de hemocitos circulantes (CTH), actividad SOD, proteínas plasmáticas y tiempo de coagulación, posteriormente se congelaron a -80°C , para análisis de actividad antioxidante (SOD y CAT).

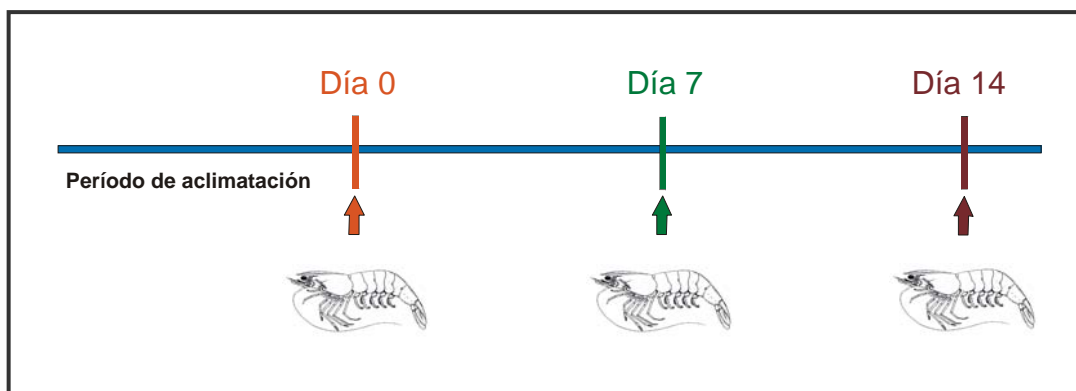


Fig. 5. Esquema general del diseño de la primera etapa experimental, las flechas indican muestreo.

6.4 Segunda etapa experimental: Evaluación de la prevención de la infección del Virus del Síndrome de la Mancha Blanca (WSSV) en organismos expuestos a β -glucanos y polisacáridos sulfatados.

6.4.1 Sitio Experimental.

El experimento se llevó a cabo en el Laboratorio de Sanidad Acuícola, dentro de las instalaciones del Centro de Ciencias de Sinaloa (CCS), Av. de las Américas 2771 Nte., Culiacán, Sinaloa, México.

6.4.2 Organismos Experimentales.

Los organismos necesarios para esta etapa experimental fueron juveniles de camarón blanco *L. vannamei* negativos al virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV), donados por la cooperativa pesquera el Tetuán, Navolato, Sinaloa. Estos organismos se aclimataron colocándolos en tanques de plástico con capacidad de 30L (5 organismos/tanque), con una salinidad de 40ups, temperatura de $26^{\circ}\text{C} \pm 1$, y Oxígeno >4 mg/L. Se utilizó alimento comercial con 35% de proteína, a una tasa de alimentación de 4% de la biomasa total en dos raciones, mañana y tarde.

6.4.2.1 Diagnóstico previo de WSSV.

Para este experimento fue necesario utilizar organismos libres (o negativos) al WSSV. Para esto, se tomó una muestra inicial ($n=3$) del total de los organismos para realizar un diagnóstico de dicho virus por medio de la prueba de Reacción en

Cadena de la Polimerasa (PCR) (IQ2000™ WSSV, Farming IntelliGene Technology Corporation).

6.4.3 Fuente de Agua.

Debido a que el CCS no cuenta con una fuente de agua marina, se optó por una fuente de agua marina externa a la ciudad, El agua necesaria para los experimentos fue donada por el Laboratorio larvario “Tres Amigos”, el cual se encuentra en la población Celestino Gazca, Sinaloa, aproximadamente a 145 Km. al sur de la ciudad de Culiacán. Dicha agua tenía calidad y todas las condiciones requeridas para la producción de post-larvas y por lo tanto adecuada para los experimentos. El líquido fue transportado en contenedores de plástico de 1000L de las instalaciones del laboratorio larvario al Laboratorio de Sanidad Acuícola en el CCS, donde se almacenó en contenedores de 120L de capacidad hasta su utilización.

6.4.4 Sistemas de Cultivos.

6.4.4.1 Sistema de Cultivo 1: fase A, administración de β -glucano y polisacáridos sulfatados.

El sistema consistió de tanques de plástico de 30L de capacidad, cada uno con aireación compartida por medio de bombas para acuario, que permitía contar con O_2 disuelto >4 mg/L. La temperatura del agua fue mantenida a temperatura ambiente, ésta última fue controlada por medio de aire acondicionado, permitiendo

contar con una temperatura de $26^{\circ}\text{C} \pm 1$. El fotoperíodo fue controlado por luz artificial (foco fluorescente) a nivel de cuarto (10 hrs. Luz – 14 hrs. oscuridad). Cada tanque estuvo cubierto por medio de una malla mosquitera para evitar la fuga de organismos.

6.4.4.2 Sistema de Cultivo 2: fase B, inoculación de WSSV.

La única diferencia con el sistema señalado en el punto **6.4.4.1**, fue que éste sistema, estuvo integrado por acuarios de vidrio de 20L de capacidad y tapaderas de vidrio. Estos se encuentran dentro de una unidad de bioensayos de patogenicidad del laboratorio, cuarto aislado al resto del laboratorio, cuyo fin es evitar la contaminación del resto del laboratorio con un patógeno potencial.

6.4.5 Elaboración del inóculo viral.

El inóculo viral de WSSV fue preparado a partir de extracciones acuosas de camarones infectados, provenientes de granjas de engorda y previamente diagnosticados como WSSV positivos. De dichos organismos se tomaron, y homogenizaron pleópodos, branquias y tejido cuticular en agua salina estéril a una proporción de 1:5. El homogenizado resultante se centrifugó a 12,000 rpm por 5 minutos, a 4°C , el sobrenadante se diluyó aún más, en proporciones de 1:10, 1:100 y 1:1000, cada dilución se consideró un inóculo (Prior *et al.*, 2003; Vanpatten *et al.*, 2004).

6.4.6 Determinación de la Dosis Letal Media (DL₅₀).

Se colocaron los organismos (5-7g de peso) en el sistema de cultivo 2, con una densidad de 5 camarones/tanque; el control y los inóculos tuvieron dos replicas. El inóculo se administró por medio de inyección intramuscular (IM), con jeringa de 1cc (Terumo™), en el 3er. segmento abdominal, a dosis de 20µl/g de peso (Prior *et al.*, 2003; Vanpatten *et al.*, 2004), con los controles se manejó la misma dosificación, sin embargo la inyección constó de agua salina estéril. La hora de la inoculación se tomó como la hora 0, contabilizándose las muertes cada 24 hrs. hasta llegar a una mortalidad acumulada del 100%. La DL₅₀ se consideró en el momento en que la mortalidad acumulada alcanzó el 50%, el objetivo fue encontrar una DL50 entre las 48 y 72hrs. Una vez alcanzada la totalidad en la mortalidad de los inóculos, se tomaron muestras de los organismos de cada inóculo y del control para confirmar la presencia y/o ausencia de WSSV mediante PCR. La dilución seleccionada fue 1:100.

6.4.7 Diseño experimental.

Para esta etapa experimental se eligió un tratamiento de cada compuesto, es decir, se descartaron dos niveles de inclusión para β-Glucano y polisacáridos sulfatados, siendo los tratamientos BG-0.01 y PS-0.01 los tratamientos a utilizar para la evaluación de la prevención de la infección de WSSV. Por tanto, el diseño experimental se dividió en dos fases, para una mejor descripción se comentan por separado (Fig. 6).

6.4.7.1 Fase A: administración de β -glucano y polisacáridos sulfatados.

Se eligieron 40 camarones de entre 5-7g, los cuales se distribuyeron en 8 tanques del sistema de cultivo 1 (**6.4.4.1**). Cada tratamiento se realizó por duplicado ($n=10$) y el control por cuadruplicado, lo último debido a que fue necesario contar con control (+) y control (-), camarones para inocular con virus y camarones sin inocular respectivamente. El período de exposición fue de 14 días siguiendo los lineamientos mencionados en el punto **6.3.4 (segundo párrafo)**.

6.4.7.2 Fase B: inoculación de WSSV.

Una vez concluida la fase A, los camarones fueron trasladados al sistema de cultivo 2. En donde fueron pesados individualmente para dosificar el inóculo (1:100) a inyectar. La metodología seguida para la administración del mismo fue la que se señala en el apartado **6.4.6**. En este punto se cambió a alimento control para todos los tratamientos, a una tasa de alimentación inicial de 4%, ajustándose según alimento consumido.

El momento de la inoculación se consideró la hora 0; los organismos eran revisados periódicamente para observar el establecimiento de los signos, como por ejemplo, cambios en el comportamiento, coloración y supervivencia. La mortalidad de cada tratamiento se registró en intervalos de 6 hrs. hasta alcanzar el 100%. Se tomaron muestras tanto antes como después del 50% acumulado, para

análisis de CTH, TC, Proteínas plasmáticas, aspectos físicos de la hemolinfa y daño histopatológico.

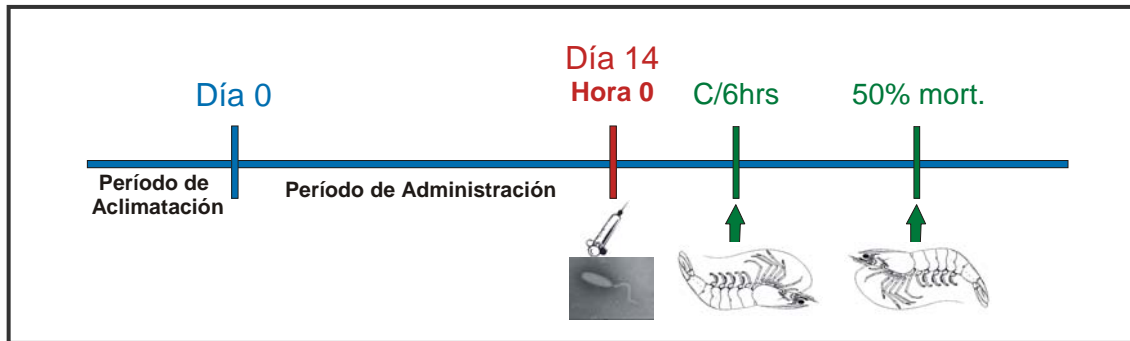


Fig. 6. Esquema general del diseño de la segunda etapa experimental, las flechas indican muestreo.

6.5 Tercera Etapa Experimental: Evaluación de respuestas del camarón ante el desafío con bacteria *Vibrio harveyi*.

6.5.1 Sitio Experimental.

El experimento se llevó a cabo en el Laboratorio de Ecofisiología de Organismos Marinos del CIBNOR S.C., con ubicación física en Km. 1 Carretera a San Juan de La Costa "EL COMITAN", a 20 Km. al norte de la ciudad de La Paz, B.C.S, México.

6.5.2 Organismos Experimentales.

Los organismos utilizados en el experimento fueron juveniles de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, los cuales fueron obtenidos de la empresa Acuacultores de La Paz, S.A. de C.V. (APSA) ubicada en el Km. 10 de la carretera

a Pichilingue. Estos organismos se aclimataron colocándolos en tanques de plástico con capacidad de 600L, con una salinidad de 39ups, temperatura de $27^{\circ}\text{C} \pm 0.5$, y Oxígeno >4 mg/L. Se utilizó alimento comercial con 35% de proteína, a una tasa de alimentación de 4% de la biomasa total en dos raciones, mañana y tarde.

6.5.3 Sistema de Cultivo.

El sistema de cultivo fue integrado por acuarios de vidrio de 30L de capacidad. Cada acuario equipado con una línea y piedra de aeración, conectados a un blower de 6 Hp, con el objetivo de sostener los niveles de oxígeno disuelto mayor a 4 mg/L; a su vez, equipado con calentador sumergible de 300W para contar con una temperatura del agua de $27^{\circ}\text{C} \pm 1$. Iluminación artificial proporcionada por focos fluorescentes a nivel de cámara. El agua de mar utilizada era pasada por filtro de arena de 20 μm . Cada acuario cubierto por una tapa de plástico para evitar la fuga de organismos.

6.5.4 Elaboración del inóculo bacteriano.

La cepa bacteriana de *Vibrio harveyi* necesaria para la elaboración del inóculo fue donada por el M.C. César Orozco, procedente del cepario del Laboratorio de Microbiología ambiental del CIBNOR, S.C. Para la utilización de la bacteria fue necesaria su reactivación, la cual se realizó por medio de siembra en caldo de cultivo de medio marino Difco™ 2216, incubándolo a temperatura

ambiente por 24 hrs.; para su obtención fue necesaria la separación del medio de cultivo, por lo cual se realizaron 2 lavados con agua marina estéril por medio de centrifugación 800 rpm por 15 minutos, decantando el sobrenadante cada vez. Acto seguido, los microorganismos se resuspendieron en agua marina estéril para obtener un stock, donde se contabilizó el número de bacterias/mL por medio de una cámara de conteo (Hausser Scientific™). Una vez obtenido el dato de la concentración bacteriana resultante, se procedió a elaborar las diluciones correspondientes para la preparación de los diferentes inóculos a evaluar (Tabla 6). Es importante señalar que los inóculos se prepararon en el momento de ser utilizados (Saulnier *et al.*, 2000b).

Tabla 6. Inóculos elaborados para la determinación de la dosis a utilizar.

No. de Inóculo	Concentración bacteriana
1	1×10^8 bacterias/mL
2	1×10^7 bacterias/mL
3	8×10^6 bacterias/mL
4	4×10^6 bacterias/mL
5	1×10^6 bacterias/mL
6	1×10^5 bacterias/mL

6.5.5 Determinación de la Dosis Subletal.

Se escogieron y repartieron camarones de 9-11g de peso en el sistema de cultivo, con una densidad de 5 organismos por acuario y 3 replicas por inóculo. La administración fue por vía IM en el tercer segmento abdominal a dosis de 20 μ l/g de peso. El momento de la inoculación se tomó como tiempo 0, registrándose

signos y mortalidad cada 24 hrs. hasta cumplir un período de 144 hrs. (Saulnier *et al.*, 2000a). Para el bioensayo final fue necesario utilizar un inóculo con concentración bacteriana incapaz de causar la totalidad de la mortalidad a los organismos por un período mínimo de 6 días. Por lo tanto, la dosis a escoger fue aquella inmediatamente menor a la que causó mortalidad, por lo tanto se le denominó Dosis Subletal (DSL).

6.5.6 Diseño experimental.

Se eligieron 60 organismos entre 5-7g de peso, distribuyéndolos aleatoriamente en 12 acuarios. Estos últimos fueron adjudicados a los 3 tratamientos, teniendo entonces 3 replicas para PS-0.01, BG-0.01 y 6 para control, que como se comentó anteriormente (**6.4.6.1**), los seis del control son necesarios para dividirlos en infectados y no infectados, teniendo igual de replicas para todos los tratamientos una vez inoculada la bacteria. Al igual que en el bioensayo de patogenicidad con el virus del síndrome de la mancha blanca, se dividió el experimento en dos fases (Fig. 7).

6.5.6.1 Fase A: administración de β -glucano y polisacáridos sulfatados.

El período de exposición fue de 14 días siguiendo los lineamientos mencionados en el punto **6.3.4 (segundo párrafo)**.

6.5.6.2 Fase B: inoculación de *Vibrio harveyi*.

Una vez concluida la fase A, los camarones fueron pesados individualmente para dosificar el inóculo a inyectar (1×10^6 bacterias/mL). La metodología seguida para la administración del mismo fue la que se señala en el apartado 6.5.5. En este punto se utilizó alimento control para todos los tratamientos, a una tasa de alimentación inicial de 4%, ajustándose según el alimento consumido.

El momento de la inoculación se consideró la hora 0; los organismos fueron revisados periódicamente para observar el establecimiento de signos. Se programaron dos puntos de muestreo 48 y 144 hrs. En cada punto se tomaron muestras de hemolinfa para análisis de TC, CTH, AS, SOD y Catalasa, además se fijaron los organismos para análisis histopatológicos. El experimento se dio por concluido a las 144 hrs. eliminando cualquier organismo restante y no muestreado.

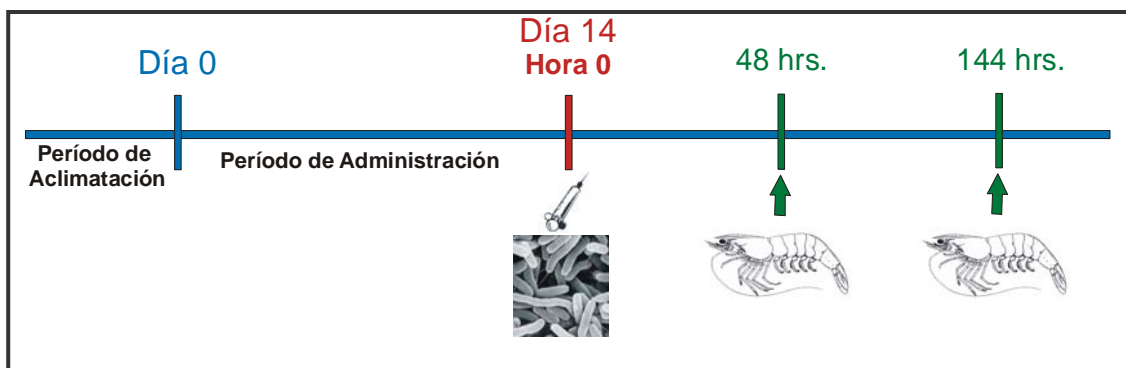


Fig. 7. Esquema general del diseño de la tercera etapa experimental, las flechas indican muestreo.

6.6 Análisis de Laboratorio de Muestras Biológicas.

6.6.1 Toma de Muestras.

6.6.1.1 Extracción de hemolinfa.

La hemolinfa fue colectada en el seno ventral localizado en la base del primer segmento abdominal. Se hicieron dos tipos de extracción, con anticoagulante o sin anticoagulante. En la primera se extrajeron mínimo 300 μ L utilizando una jeringa de 3 cc (Terumo™) conteniendo 500 μ l de una solución anticoagulante, según Vargas-Albores *et al.* (1993), preenfriada a 4°C. Inmediatamente después la hemolinfa se vertió en viales de plástico de 1.5mL estériles correctamente identificados, manteniéndolos en hielo durante su procesamiento. La extracción sin anticoagulante se efectuó con jeringa de 1 cc (Terumo™).

6.6.1.2 Obtención de Tejidos.

6.6.1.2.1 Tejido para Análisis Enzimáticos.

El camarón fue seccionado en cefalotórax y abdomen congelándolos posteriormente a -60°C (ultracongelador VWR), siendo glándula digestiva y músculo los tejidos blanco para análisis, los cuales se disectaron de las porciones ya mencionadas. Para los análisis enzimáticos se homogenizaron extractos crudos de estos tejidos en buffer fosfatos 50mM, ph 7.0 (Catalasa) y 7.8 (SOD).

6.6.1.2.2 Tejido para Histopatología.

Los organismos destinados a análisis histopatológicos fueron fijados en solución Davidson, y procesados para la obtención de laminillas histológicas (Bell y Lightner, 1998).

6.6.2 Análisis de Muestras.

6.6.2.1 Tiempo de Coagulación (TC).

El TC se obtuvo de hemolinfa sin anticoagulante; aproximadamente 100 μ L de la muestra se colocaron en un portaobjetos de vidrio limpio, se dejó reposar por 30 segundos y al término de este lapso se agitó vigorosamente con la punta de la aguja de la jeringa hasta obtener una masa amorfa gelatinizada (Jussila, 2001), señal de coagulación. El TC registrado fue el tiempo transcurrido desde el inicio de la agitación hasta la obtención del coágulo.

6.6.2.2 Cuento Total de Hemocitos Circulantes (CTH).

El CTH se determinó según Campa-Córdova *et al.* (2002) en hemolinfa con anticoagulante y formol al 4%, por medio de una cámara de Neubauer (Hausser Scientific LTD.), utilizando microscopio óptico (Nikon Optiphot-2).

6.6.2.3 Cuantificación de Proteína.

La concentración total de proteína soluble en todas las muestras fue determinada según Bradford (1976), utilizando el reactivo colorante de Bio Rad

Inc. y albúmina sérica de bovino (BSA, SIGMA^R) para la construcción de una curva estándar.

6.6.2.4 Generación de Anión Superóxido.

La generación de anión superóxido (O_2^-) intracelular en hemocitos, se determinó por medio de la reducción de nitroazul de tetrazolium (NBT, SIGMA^R N5514), (Song y Hsieh, 1994), siguiendo la metodología de Campa-Córdova *et al.* (2002).

6.6.2.5 Actividad Superóxido Dismutasa (SOD).

La actividad SOD se cuantificó por espectrofotometría, midiendo el cambio de absorbancia debido al efecto inhibitorio de la enzima sobre la reducción de Citocromo C por el anión superóxido. (McCord y Fridovich, 1969).

6.6.2.6 Actividad Catalasa (CAT).

La actividad catalasa se determinó por medio de espectrofotometría, cuantificando la disminución de la concentración de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) mediada por la enzima. (Aebi, 1985).

6.6.2.7 Determinación de Daño Histopatológico.

El grado de severidad de lesiones causadas por la infección de WSSV y *Vibrio harveyi* en camarón, fue un método semicuantitativo para documentar las

observaciones diagnósticas. Se estableció según Lightner (1996), en laminillas de secciones medial-sagital de cefalotórax por medio de microscopio óptico.

VII. RESULTADOS.

7.1 Efecto de β -Glucano y de Polisacáridos Sulfatados en la promoción de indicadores de salud.

Para conocer el efecto promotor de indicadores de salud en el camarón blanco (*L. vannamei*), ante la exposición a largo plazo por medio del alimento a 1-6 β -glucano y a polisacáridos sulfatados, se determinaron los siguientes parámetros: conteo total de hemocitos circulantes (CTH), actividad antioxidante (SOD y CAT) en músculo y glándula digestiva a los 0, 7 y 14 días, en todos los tratamientos; mientras que actividad SOD en hemocitos, proteínas plasmáticas y tiempo de coagulación fue a los 14 días y en tres tratamientos.

7.1.1 Conteo Total de Hemocitos Circulantes.

Los resultados muestran (Fig. 8) un aumento significativo ($p < 0.05$) en el número total de hemocitos circulantes en los tratamientos BG-0.01, BG-0.1 y PS-0.01 respecto al control en el día 7 de exposición; BG-0.01 obtuvo un incremento 3 veces mayor al del control, mientras que BG-0.01 y PS-0.01 fue el doble del valor. El resto de los tratamientos no muestran diferencia significativa. Este parámetro demostró su mayor influencia a la exposición de los compuestos evaluados en este punto, puesto que los resultados obtenidos al día 14, no arrojan diferencias entre tratamientos (Fig. 9), lo que indica que dicha influencia se vio demeritada según el tiempo de exposición, aunque al día 14 existe un patrón similar en CTH respecto al día 7, no existe diferencia significativa ($p > 0.05$).

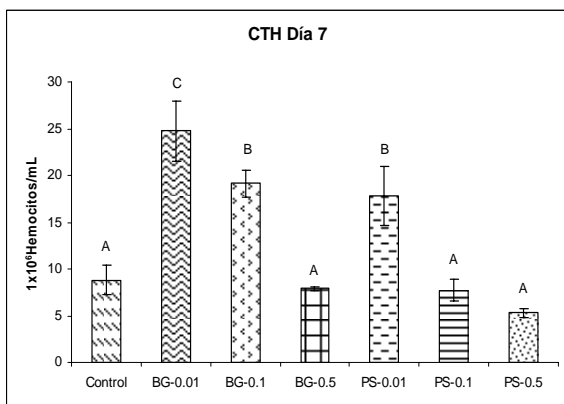


Fig. 8. Conteo total de hemocitos circulantes al día 7 de administración, letras sobre las barras señalan diferencia significativa ($p < 0.05$).

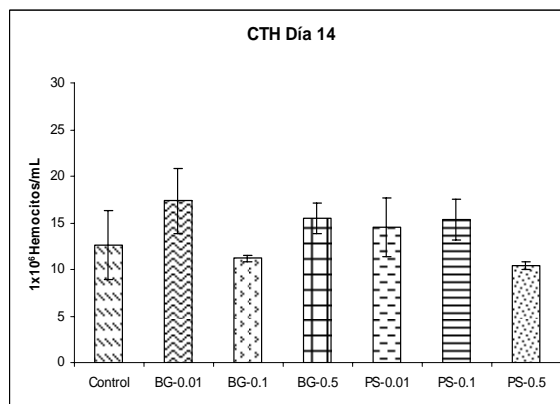


Fig. 9. Conteo total de hemocitos circulantes al día 14 de administración, se observa similitud respecto al patrón del día 7, sin embargo no existe diferencia significativa ($p < 0.05$).

7.1.2 Actividad Superóxido Dismutasa en músculo y glándula digestiva.

La actividad enzimática de SOD, tanto en tejido muscular, como en tejido glandular, aún cuando existe diferencia significativa ($p < 0.05$) entre algunos tratamientos, no presentó patrones específicos constantes que demostrasen estimulación bajo la influencia de BG y PS, por lo tanto no resultaron como fuente importante para determinar estatus de salud bajo estas condiciones. Sin embargo se puede destacar que la actividad en músculo tuvo mayor fluctuación entre tratamientos (Fig. 10 y 11) al séptimo día de exposición, siendo los grupos bajo la influencia de PS, específicamente los tratamientos PS-0.1 y PS-0.5, los que tuvieron diferencia significativa ($p < 0.05$) respecto al control y a las dosis más bajas de BG, donde BG-0.01 fue el más bajo y por lo tanto diferente al resto de los

mismos; en tanto que en glándula digestiva BG-0.1 mostró ser diferente a BG-0.01, BG-0.5 y PS-0.5, más no al resto.

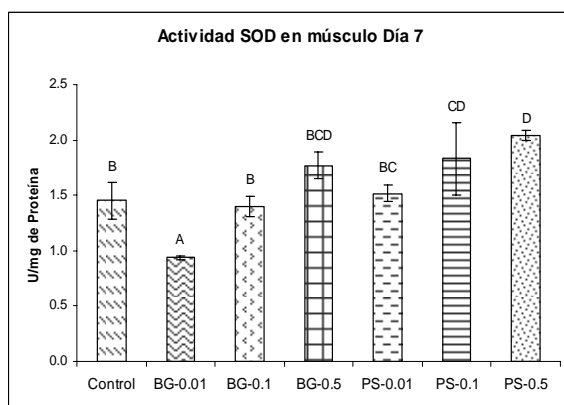


Fig. 10. Actividad SOD en músculo a los 7 días de exposición. Letras diferentes muestran significancia estadística ($p < 0.05$).

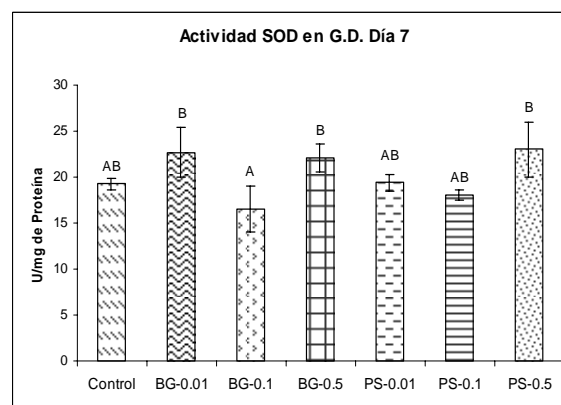


Fig. 11. Actividad SOD en glándula digestiva a los 7 días de exposición. Letras diferentes muestran significancia estadística ($p < 0.05$).

En el día 14 (Fig. 12 y 13), la actividad en músculo del tratamiento PS-0.1 mostró significancia ($p < 0.05$) a todos los tratamientos a excepción de PS-0.01, éste último a su vez fue diferente a BG-0.1 y BG0.5. En la actividad SOD en G.D. de nuevo se obtuvo discrepancia respecto al control, volviendo a ser el mismo PS-0.1 el que la demostró, empero, ninguno del resto de los tratamientos tiene diferencias contra los dos anteriormente mencionados. Es importante recalcar que aunque ninguno de los tratamientos demostró consistencia en su patrón de actividad SOD, ya sea entre ellos mismos o respecto al control, los organismos expuestos a polisacáridos sulfatados, mostraron estar por arriba de la media general, y que el músculo tiende a ser más susceptible a la estimulación por medio de los compuestos evaluados.

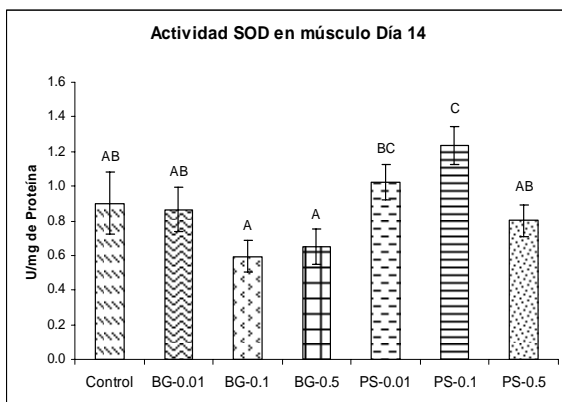


Fig. 12. Actividad SOD en músculo a los 14 días de exposición, Letras diferentes muestran significancia estadística ($p < 0.05$).

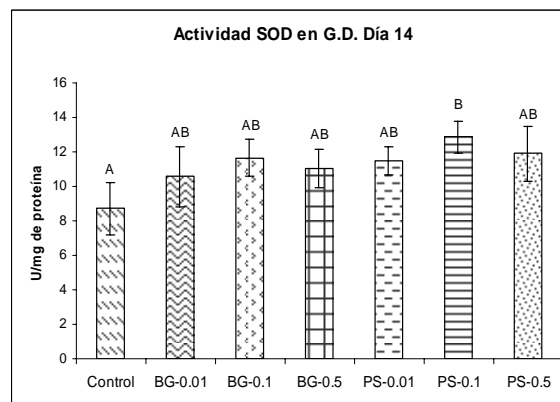


Fig. 13. Actividad SOD en glándula digestiva a los 14 días de exposición. Letras diferentes muestran significancia estadística ($p < 0.05$).

7.1.3 Actividad Catalasa en músculo y glándula digestiva.

Los resultados de la actividad CAT en músculo (Fig. 14 y 15) muestran dos tratamientos con significancia estadística ($p < 0.05$) respecto a la mayoría del resto de los tratamientos, BG-0.01 y PS-0.5; de igual forma el tratamiento PS-0.1 tiene diferencia pero sólo contra el control. Mientras que la actividad CAT en la glándula digestiva obtiene diferencias con PS-0.5 al resto de los tratamientos, PS-0.01 contra Control y BG-0.01, y éste último con el resto de los organismos expuestos a BG.

A los 14 días (Fig. 16 y 17) de experimento la actividad catalasa en músculo refleja sólo un tratamiento significativamente diferente ($p < 0.05$) de manera constante en ambos tejidos, BG-0.01, mientras que los tratamientos PS-0.1 y PS-0.5, con algún tipo de diferencia significativa superior a los 7 días,

muestran actividad CAT similar a la del control y al resto de los tratamientos. G.D. muestra mayor segregación estadística en actividad CAT con 4 grupos diferentes, donde los tratamientos bajo la influencia de BG son diferentes al Control y a las dos dosis mayores de PS. Sólo PS-0.01 es diferente ($p < 0.05$) al grupo control.

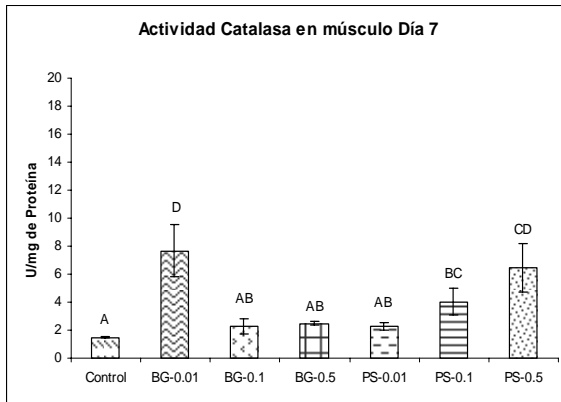


Fig. 14. Actividad CAT en músculo después de 7 días de exposición. Letras diferentes muestran significancia estadística ($p < 0.05$).

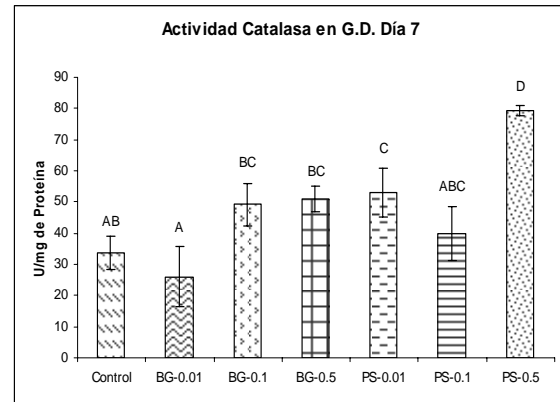


Fig. 15. Actividad CAT en glándula digestiva después de 7 días de exposición. Letras diferentes muestran significancia estadística ($p < 0.05$).

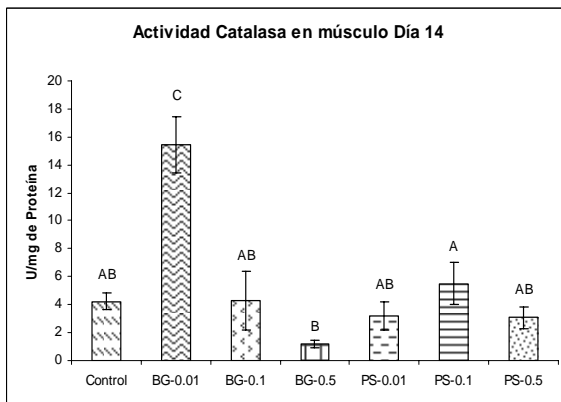


Fig. 16. Actividad CAT en músculo después de 14 días de exposición. Letras diferentes muestran significancia estadística ($p < 0.05$).

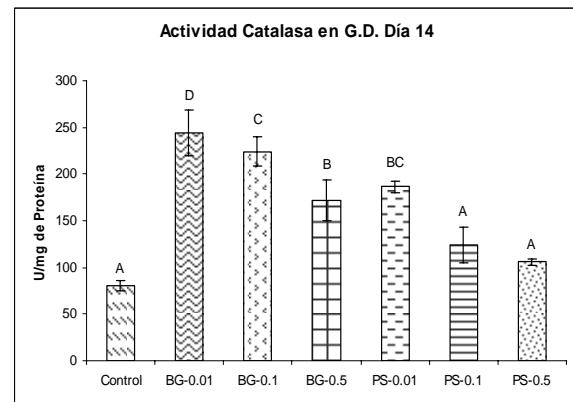


Fig. 17. Actividad CAT en glándula digestiva después de 14 días de exposición. Letras diferentes muestran significancia estadística ($p < 0.05$).

7.1.4 Actividad SOD en Hemocitos y Proteínas Plasmáticas.

De manera complementaria se evaluó la actividad de SOD en hemocitos (Fig. 18), pero sólo a los 14 días de experimento, y en 2 tratamientos más el control. Se escogieron aquellos que sugirieron mayor desempeño en la primera etapa, siendo en este caso los de nivel de inclusión 0.01. En este parámetro el tratamiento con β -glucano demostró diferencia significativa ($p < 0.05$) con un incremento del doble comparado con el control y del triple con el tratamiento de polisacáridos sulfatados. Aunque las proteínas plasmáticas resultaron más elevadas en el tratamiento con PS (Fig. 19), no existió significancia ($p > 0.05$) entre ningún tratamiento, por lo que este parámetro no demuestra valor como bioindicador de estatus de salud a los 14 días de exposición.

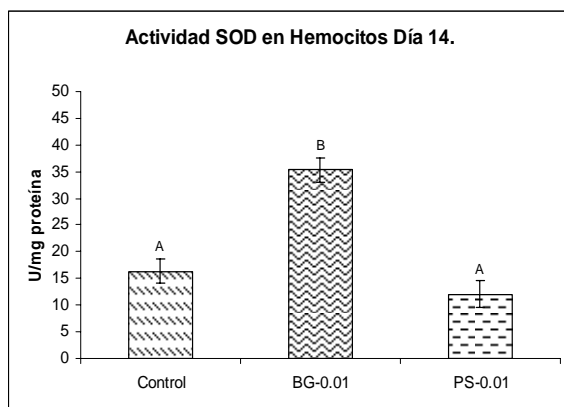


Fig. 18. Actividad SOD en hemocitos a los 14 días de exposición. Letras diferentes muestran significancia estadística ($p < 0.05$).

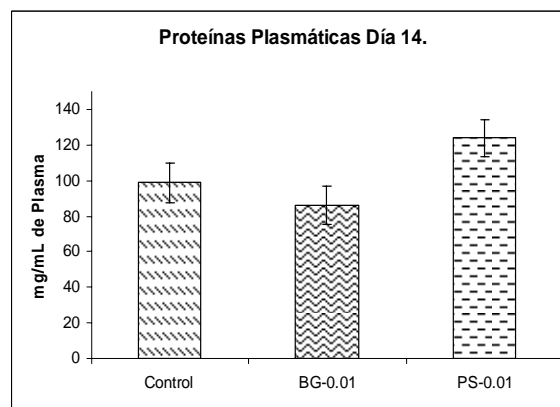


Fig. 19. Proteínas plasmáticas a los 14 días de exposición, no se obtuvo diferencias entre tratamientos ($p > 0.05$).

7.1.5 Tiempo de Coagulación.

El tiempo de coagulación mostró el mismo comportamiento entre ningún tratamiento, todos obtuvieron un valor menor a 10 segundos.

7.2 Efecto de β -Glucano y de Polisacáridos Sulfatados en la prevención de la infección del Virus del Síndrome de la Mancha Blanca (WSSV).

Para conocer el potencial para la prevención de la infección de WSSV en *L. vannamei*, ante la administración a largo plazo por medio del alimento de 1-6 β -glucano y polisacáridos sulfatados, se determinaron los siguientes parámetros: sobrevivencia del organismo estimulado ante el reto viral, daño histológico, CTH, proteínas plasmáticas, tiempo de coagulación y aspectos físicos de hemolinfa.

7.2.1 Reto Viral con WSSV.

Se presentan los resultados obtenidos en el bioensayo de patogenicidad ante el reto del virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV) desafiando organismos expuestos a compuestos glucosídicos, 1-6 β -glucano y polisacáridos sulfatados, administrados a través de alimento por un período de 14 días.

La gráfica (Fig. 20) presenta la sobrevivencia relativa obtenida hasta la hora 120 después de la inoculación del virus. El control (-) presenta el 100% de sobrevivencia, mientras que el control (+), BG-0.01 y PS-0.01 presentan el 0%. Sorprendentemente los compuestos evaluados alcanzaron dicha sobrevivencia a las 72 hrs. post-inoculación, en ese momento el control (+) se encontraba al 50%, y fue hasta las 114 hrs. cuando la sobrevivencia llegó al 0%.

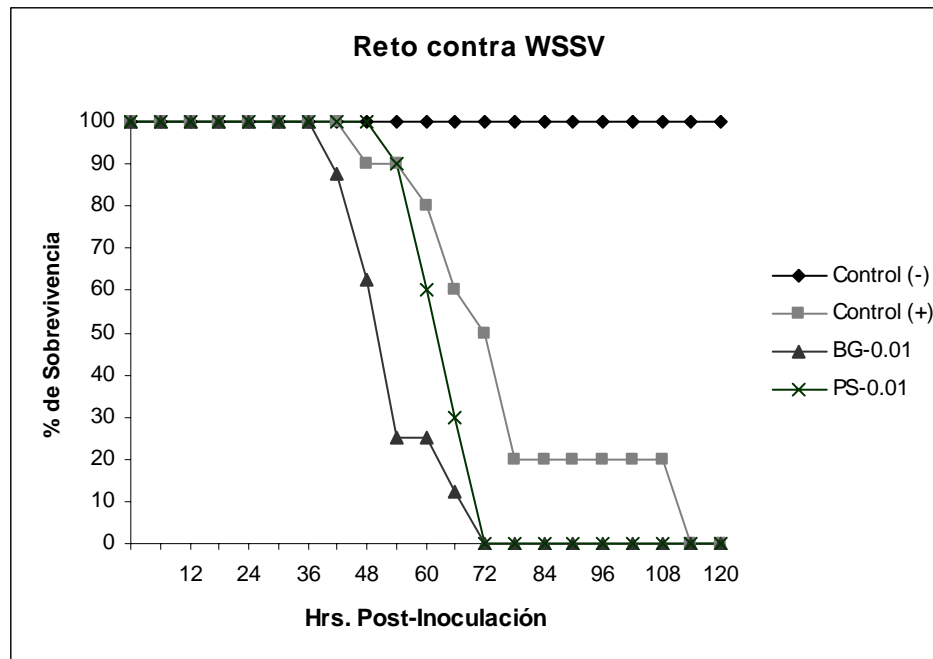


Fig. 20. Sobrevivencia relativa en el tiempo transcurrido post-inoculación de WSSV.

La signología del síndrome se empezó a presentar alrededor de las 36 hrs. siendo en el tratamiento BG-0.01 los primeros organismos en demostrarlo, posteriormente el PS-0.01 y por último el control (+). Dichos signos empezaron con un incremento en la muda, decremento en el consumo de alimento, así como en la actividad física, letargia, cambios en la coloración de los apéndices por expansión de cromatóforos, principalmente en urópodos, nado errático, después se continuó con éstasis, cambios en la coloración del organismo completo (rojo-pardo), postración cúbito lateral y por último resolviéndose en muerte. Las manchas blancas características del síndrome no se presentaron por tratarse de una infección aguda.

7.2.2 Daño histopatológico.

Tabla 7. Distribución y grado de daño histopatológico en los diferentes tratamientos retados a WSSV.

Órgano/Tejido	Cuerpos de Inclusión				Necrosis Difusa				
	Tratamiento	Control (-)	Control (+)	BG-0.01	PS-0.01	Control (-)	Control (+)	BG-0.01	PS-0.01
Órgano Linfoide	--	+++	++++	++++	++++	--	+++	++++	++++
Tejido Hematopoyético	--	+++	++++	++++	++++	--	--	++*	++*
Branquias	--	+++	+++	+++	+++	--	+	+++	+++
Epitelio Cuticular	--	++++	++++	++++	++++	--	--	--	--
Glándula Antenal	--	++	+++	+++	+++	--	--	--	--
Intestino Posterior	--	+++	++++	++++	++++	--	--	--	--

* Se encontró asociada a depleción severa

Los hallazgos microscópicos fueron principalmente dos lesiones (ver Tabla 7), hipertrofia nuclear con cuerpos de inclusión intranucleares basofílicos en células de origen ectodérmico y mesodérmico, que se pueden considerar patognomónicos del síndrome de la macha blanca; y una necrosis difusa multifocal caracterizada por cariopícnosis y cariorexis, primordialmente en tejidos con células de origen linfoide, y sin respuesta inflamatoria al proceso patológico (Fig. 21 – 23).

a. Cuerpos de inclusión.

Esta lesión fue la más generalizada en todos los tratamientos inoculados con el virus, aún así, se encontraron diferencias en el grado de presentación en algunos tejidos evaluados, y de ellos fueron en tejidos de importancia como tejido hematopoyético y órgano linfoide, donde los tratamientos con BG y PS mostraron un grado G4, y el control (+) G3. Lo mismo resultó en el epitelio del intestino posterior; en glándula antenal fue diferencia de G3 a G2 y en el resto de los tejidos la infección fue histopatológicamente semejante.

b. Necrosis difusa.

Esta patología resultó de mayor diferencia entre tratamientos y de la misma forma que la anterior fue en tejidos de importancia, el menos afectado fue el control (+), con un grado G3 en órgano linfoide, G0 en tejido hematopoyético y G1 en branquias, mientras que en BG-0.01 y PS-0.01 fue de G4, G2 y G3 respectivamente. En el caso de BG-0.01 se encontró una depleción celular severa en conjunto con la necrosis en el tejido hematopoyético.

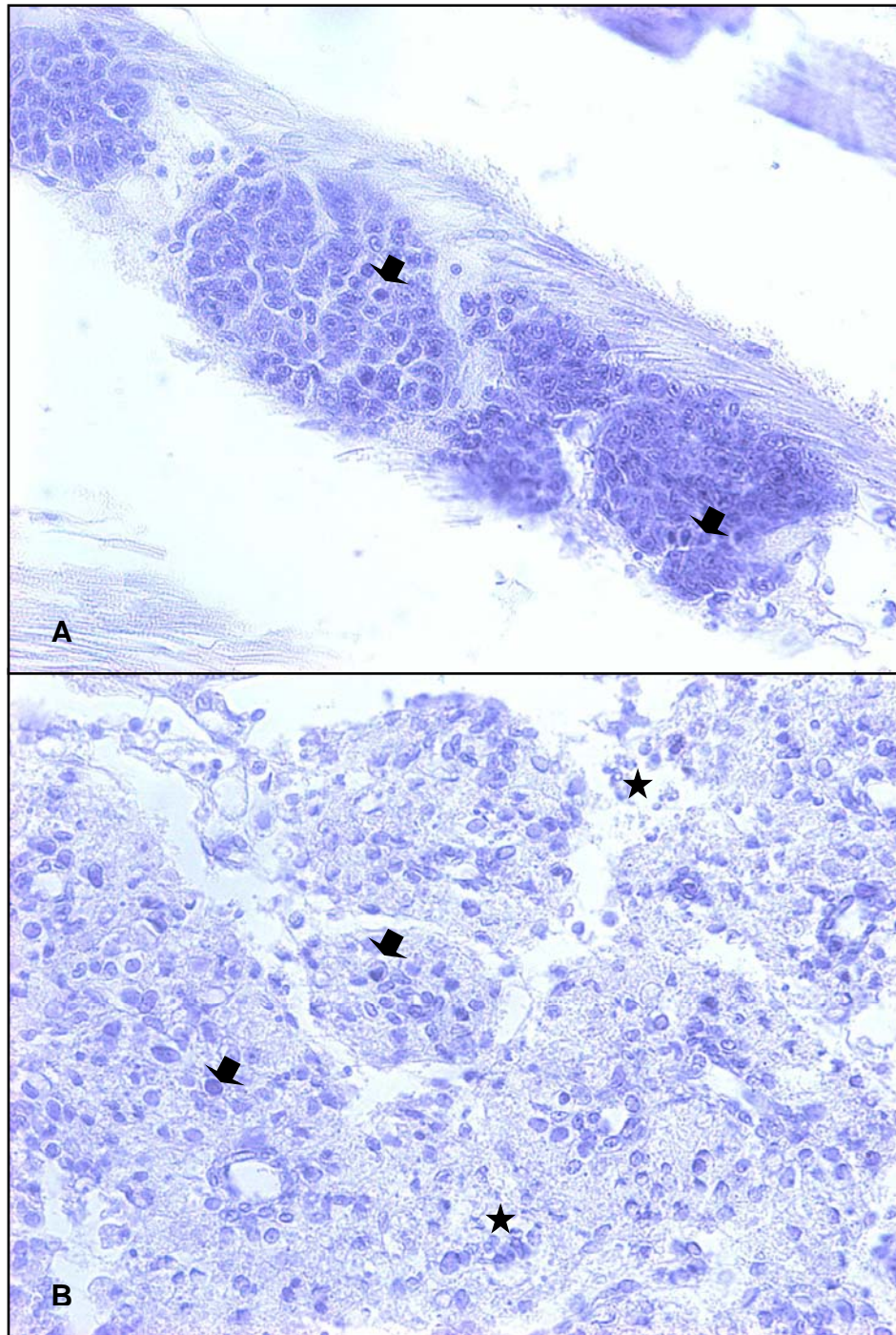


Fig. 21. Organismo control (+). *A.* Tejido hematopoyético (400X) con presencia discreta de cuerpos de inclusión (flechas) y sin existencia de necrosis difusa. *B.* Órgano linfoide (400X) de un organismo, nótese la presencia importante de cuerpos de inclusión (flechas) y zonas de necrosis difusa moderada (estrellas).

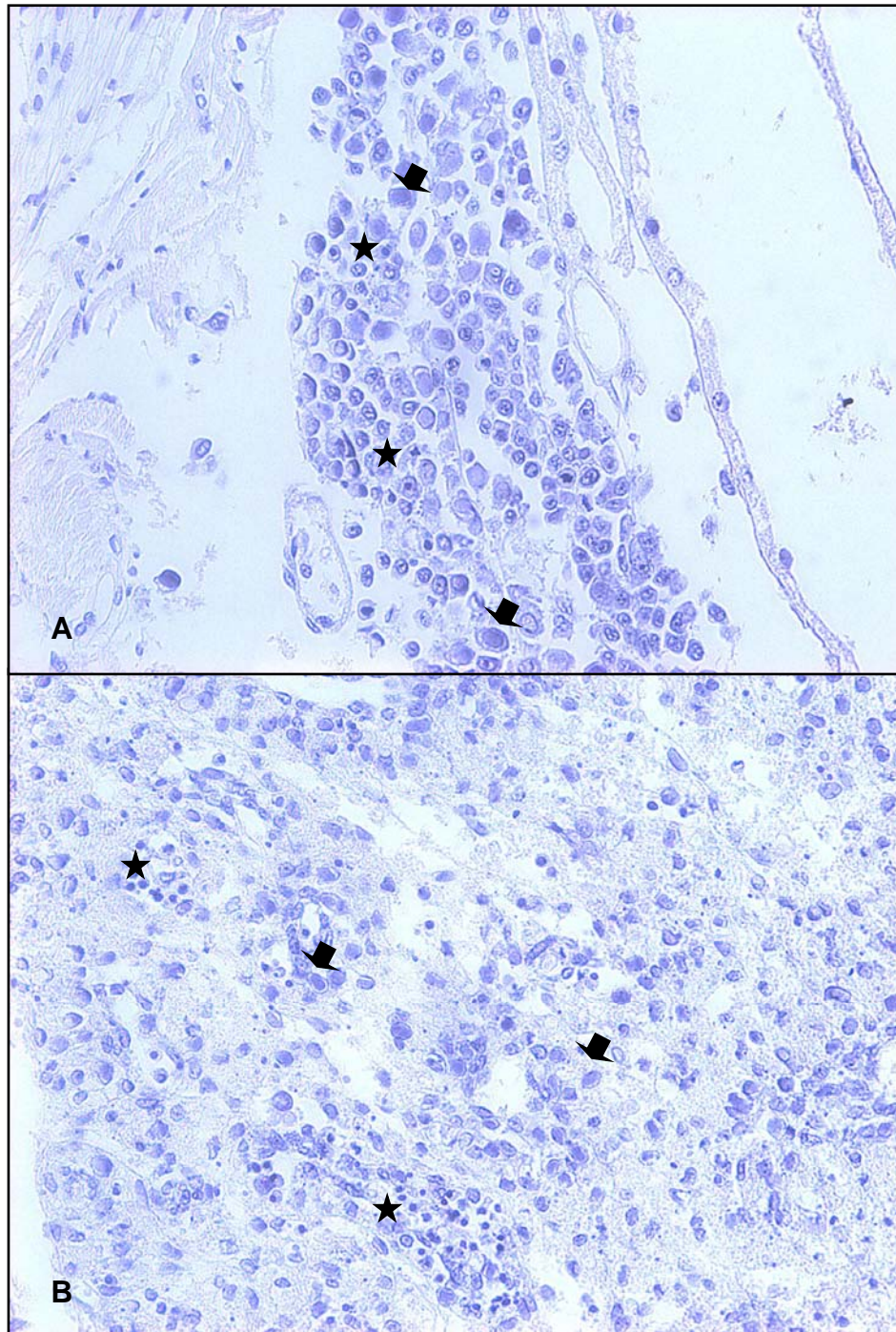


Fig. 22. Organismo BG-0.01. A. Tejido hematopoyético (400X) con presencia marcada de cuerpos de inclusión (flechas) y con necrosis difusa (estrellas) moderada. B. Órgano linfoide (400X) nótese la abundancia de cuerpos de inclusión (flechas), necrosis difusa severa (estrellas) y la disminución celular en el tejido.

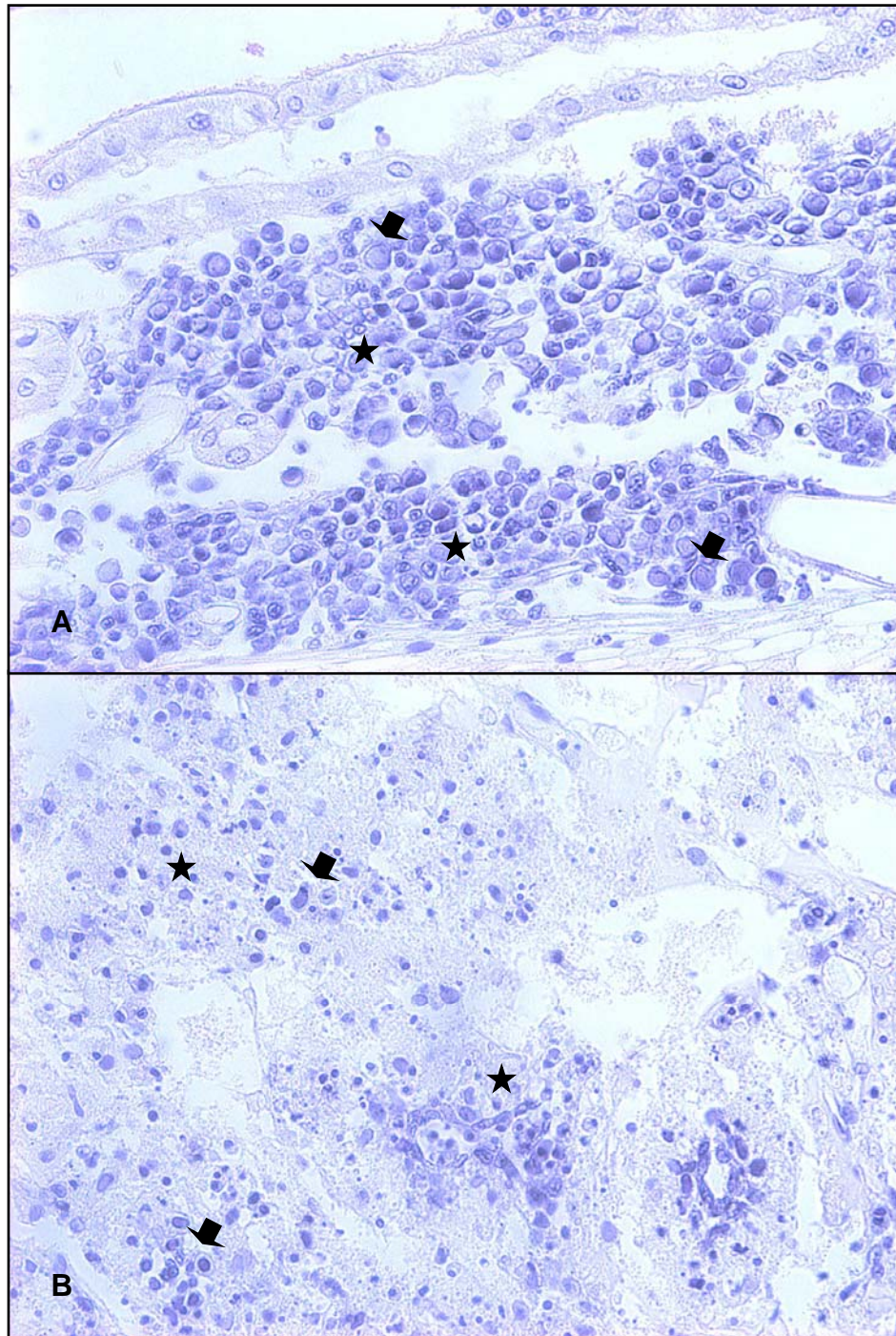


Fig. 23. Organismo PS-0.01. A. Tejido hematopoyético (400X) con presencia marcada de cuerpos de inclusión (flechas) y con necrosis difusa (estrellas) moderada. B. Órgano linfoide (400X) nótese la abundancia de cuerpos de inclusión (flechas), necrosis difusa severa (estrellas) y la disminución celular en el tejido.

7.2.3 Diagnóstico confirmativo de infección por WSSV.

Por medio de PCR se confirmó la presencia, y por lo tanto de la infección, del virus del síndrome de la mancha blanca (Fig. 24), en los tratamientos control (+), BG-0.01 y PS-0.01, de igual forma se determinó la ausencia del virus en el control (-). Cada tratamiento positivo muestra tres bandas o amplicones a diferente peso molecular, 333 pb, 630 pb y una arriba de 848 pb, lo que sugiere una infección severa por parte del virus en los organismos.

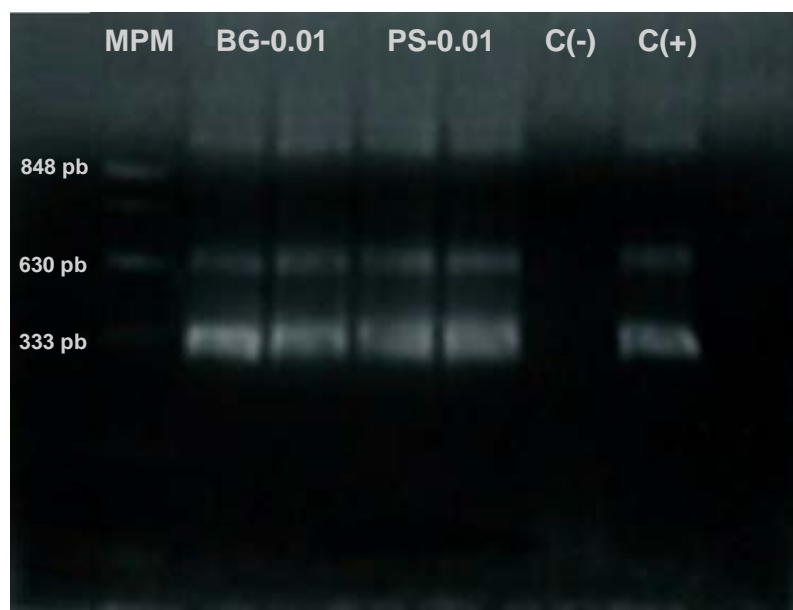


Fig. 24. Fotografía del gel para el diagnóstico confirmativo de WSSV por medio de PCR. Se muestran tres bandas o amplicones en cada tratamiento positivo.

7.2.4 conteo Total de Hemocitos Circulantes.

El CTH muestra una gran discrepancia en el número de hemocitos en los camarones infectados con el virus y el control (-) (Fig. 25), el cual superó por más del triple al resto de los tratamientos ($p < 0.05$). Al comparar los datos en los

tratamientos infectados no se obtuvo diferencias, sin embargo al trazar los valores en el transcurso de la infección (Fig. 26), se observa una drástica caída del conteo a niveles mínimos, en primer lugar BG-0.01, seguido de PS-0.01 y en última instancia del control (+), sin embargo es importante señalar que en el último, el número de hemocitos no alcanzaron a los de los otros dos tratamientos. Un aspecto interesante fue la observación de hemocitos con tendencia a necrosis durante el conteo, los cuales presentaban cariopiconosis y cariorexis, y sólo se observaron en los tratamientos BG-0.01 y PS-0.01 (ver Tabla 6).

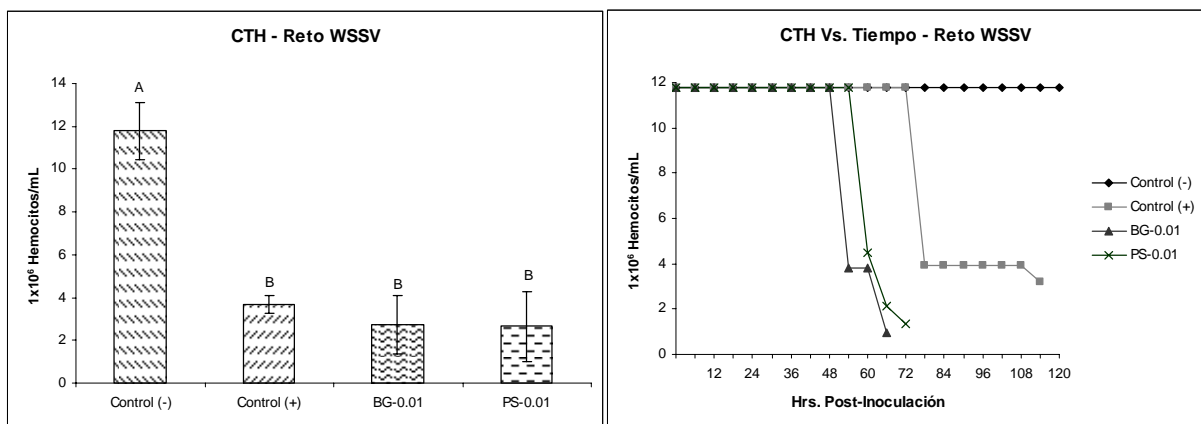


Fig. 25. Valores de CTH en los diferentes tratamientos del reto con el virus del síndrome de la mancha blanca. Letras diferentes señalan diferencia significativa ($p < 0.05$).

Fig. 26. Valores de CTH en los diferentes tratamientos durante el desarrollo de la infección del virus del síndrome de la mancha blanca.

7.2.5 Proteínas Plasmáticas.

Las proteínas plasmáticas presentaron un comportamiento similar al parámetro de CTH, ya que el control (-) obtuvo valores muy por encima del resto de los tratamientos (Fig. 27), en lo que respecta al control (+) muestra estar ligeramente arriba de BG-0.01 y PS0.01, sin embargo no existe diferencia entre

ellos. Empero, graficando estos valores a lo largo del tiempo de infección, se puede notar una importante diferencia, ya que las proteínas en plasma de control (+) descienden alrededor de 30 hrs. posteriores al descenso registrado para BG-0.01 y 24 hrs. posteriores al registrado para PS0.01 (Fig. 28).

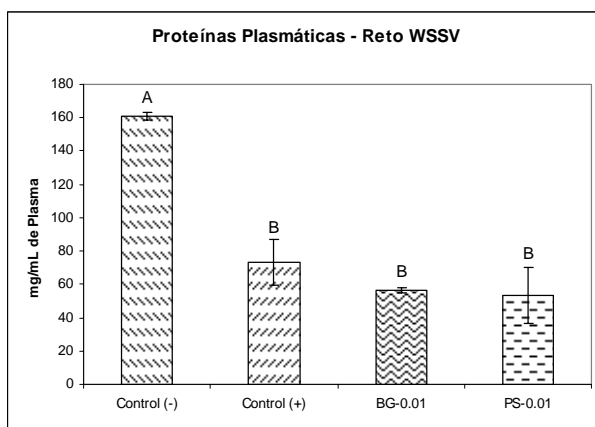


Fig. 27. Niveles de proteínas plasmáticas en los diferentes tratamientos del reto con el virus del síndrome de la mancha blanca. Letras diferentes señalan diferencia significativa ($p < 0.05$).

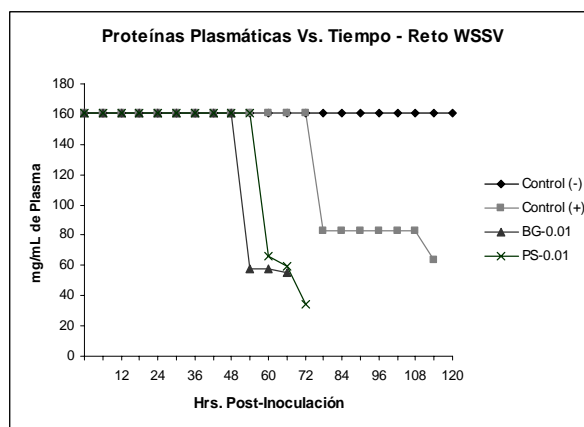


Fig. 28. Niveles de proteínas plasmáticas en los diferentes tratamientos durante el desarrollo de la infección del virus del síndrome de la mancha blanca.

7.2.6 Tiempo de Coagulación y parámetros físicos de hemolinfa.

El tiempo de coagulación de la hemolinfa se vio severamente afectado en los organismos infectados con el WSSV, entre ellos mismos aquellos expuestos a los compuestos evaluados no presentaron coagulación alguna, mientras que los camarones infectados y no expuestos si la alcanzaron, pero de forma retardada. De manera importante se observó que el color de la hemolinfa en los tratamientos de mayor afección turnó a tonalidad rojiza-parda, mientras que el control (+) no alcanzó esa tonalidad y se mantuvo en azul opaco (Tabla 8).

Tabla 8. Valores de tiempo de coagulación, así como diversos aspectos físicos de la hemolinfa en los diferentes tratamientos del reto con WSSV. Como dato complementario se señalan la hora post-infección de la toma de muestra.

Tratamiento	Hora	Aspecto Hemocitos	Aspecto Hemolinfa	Tiempo coagulación
Control (-)	120	Normales	Azul	2 – 10 seg.
Control (+)	78, 114	Normales	Azul opaco	60 – 90 seg.
BG-0.01	54, 66	Cariopcnosis, Cariorexis	Rojiza parda	No coaguló
PS-0.01	66, 72	Cariopcnosis, Cariorexis	Rojiza parda	No coaguló

7.3 Efecto de 1-6 β -Glucano y de Polisacáridos Sulfatados en la prevención de la infección de *Vibrio harveyi*.

Para conocer el potencial de la administración a largo plazo de 1-6 β -glucano y polisacáridos sulfatados para la prevención de la infección de *Vibrio harveyi* en *L. vannamei*, se determinaron los siguientes parámetros: sobrevivencia del organismo estimulado ante el reto bacteriano, daño histopatológico, CTH, generación de anión superóxido y actividad SOD en hemocitos, proteínas plasmáticas y tiempo de coagulación.

7.3.1 Reto bacteriano con *Vibrio harveyi*.

Se presentan los resultados obtenidos en el bioensayo de patogenicidad ante el reto de *V. harveyi*, desafiando organismos expuestos a compuestos glucosídicos, 1-6 β -glucano y polisacáridos sulfatados, administrados a través de alimento por un período de 14 días.

La gráfica (Fig. 29) presenta la sobrevivencia relativa durante un período de 144 hrs. P.I. con una dosis de 8×10^6 UFC de *V. harveyi*. Los organismos del control (-) obtuvieron la sobrevivencia más alta con 94%. Por el contrario, el control (+) mostró los valores más bajos llegando a 33% en sólo 36 hrs. P.I. En ese momento los tratamientos BG-0.01 y PS-0.01 poseían 83%, el primero mantuvo ese número a lo largo del experimento, mientras que el último bajo a 58% a las 48 hrs. para seguir así hasta las 144 hrs.

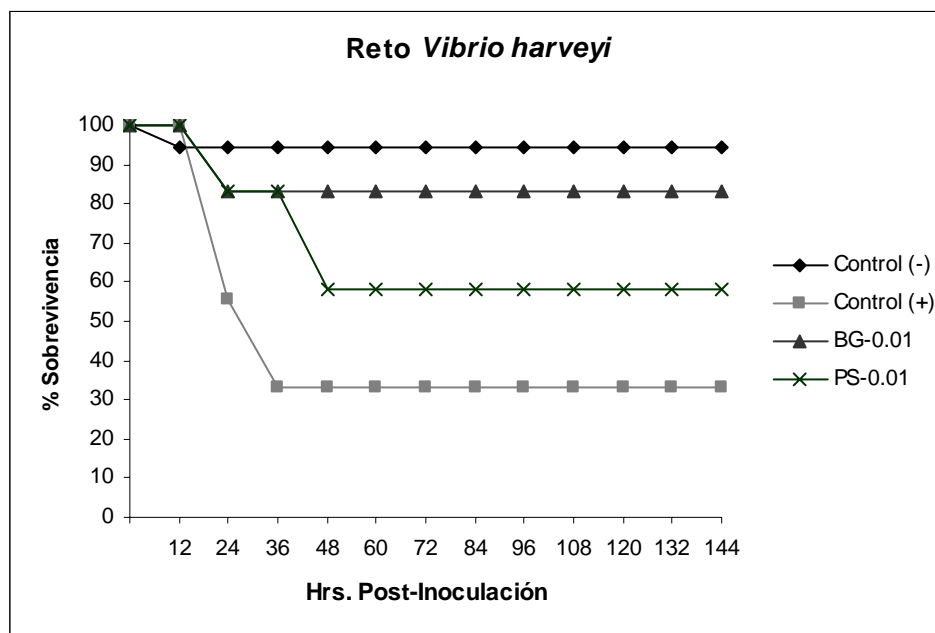


Fig. 29. Sobrevivencia relativa en el tiempo transcurrido post-inoculación de *V. harveyi*. Nótese que el grueso de la mortalidad ocurrió durante las primeras 48 hrs.

7.3.2 Daño histopatológico.

El daño histopatológico se reporta a las 48 y 144 hrs. P.I. para los tratamientos, y órganos y/o tejidos que presentaron lesiones (ver tablas 9 y 10).

Tabla 9. Distribución y grado de daño histopatológico a las 48 hrs. P.I. en el reto con *V. harveyi*.

Daño Histopatológico	Nódulos Hemocíticos		Necrosis Granulomatosa		Necrosis Difusa	
	Control (+)	BG-0.01	PS-0.01	Control (+)	BG-0.01	PS-0.01
Órgano/ Tejido						
Glándula Digestiva	--	--	--	++	--	--
Órgano Linfoide	++	--	+	++	--	+
Tejido Hematopoyético	--	--	--	--	++	--
Branquias	++	+	+	--	++	+
Corazón	++	--	+	--	+	--
Tejido Nervioso	++	--	+	--	--	--
Tejido Conjuntivo (gral.)	+++	+	++	++	--	--
3er. Segmento Abdominal	++	++	++	++++	+	--

Nota: El Control (-) no se reporta en la tabla por no haberse observado daños histopatológicos.

En el Control (+) se observó la presencia de edema de severidad moderada en Glándula Digestiva y Glándula Antenal

Tabla 10. Distribución y grado de daño histopatológico a las 144 hrs. P.I. en el reto con *V. harveyi*.

Daño Histopatológico	Nódulos Hemocíticos		Necrosis Granulomatosa		Necrosis Difusa	
	Control (+)	BG-0.01	PS-0.01	Control (+)	BG-0.01	PS-0.01
Órgano/ Tejido						
Órgano Linfoide	++	--	--	--	--	--
Branquias	+	--	+	--	--	--
Corazón	+	--	--	--	+	--
Tejido Conjuntivo (gral.)	+	--	--	--	--	--
3er. Segmento Abdominal	++	+	+	+++	+	--

Nota: El Control (-) y los órganos/tejidos: G.D., T.H y T.N. no se reportan en la tabla por no haberse observado daños histopatológicos.

Los hallazgos microscópicos fueron primordialmente 3 lesiones típicas de vibriosis sistémica. La primera fue la presencia de nódulos hemocíticos los cuales se conformaron de un agregado concéntrico de hemocitos con un núcleo necrótico con presencia bacteriana y restos celulares con o sin melanización, de entre 30-100µm de diámetro. La segunda lesión constó de focos de necrosis granulomatosa semejantes en composición a los nódulos hemocíticos pero de mayor tamaño y de forma irregular. La tercera lesión se trató de necrosis difusa constituida por la presencia de células que se encontraban en vías o en estado de necrosis con características como cariopcnosis, cariorexis y cariolisis. Cabe señalar que se observó una última lesión pero sólo en el control (+) y fue específico de tejido glandular, llámese glándula digestiva y glándula antenal, la cual se trató de un edema de severidad moderada, y se pudo observar como un exceso de líquido de afinidad eosinofílica y de origen proteináceo, compatible con hemolinfa, en espacios intersticiales de dichos órganos.

Los organismos del control (-) no presentaron lesiones histopatológicas, no así, el resto de los tratamientos. Los hallazgos encontrados en los cortes histológicos, señalan un daño en conjunto de mayor severidad a las 48 hrs. que a las 144 hrs. en todos los afectados, y entre estos mismos, el control (+) fue el de mayor afección en los dos momentos evaluados durante el desarrollo de la infección; el menor afectado fue BG-0.01, por lo tanto PS-0.01 quedó en un punto intermedio (Fig. 30–37).

a. Nódulos hemocíticos.

Este tipo de lesión fue evidente tanto a las 48 como a las 144 hrs. Para las primeras horas entre los órganos o tejidos afectados estuvieron, órgano linfoide, branquias, corazón, tejido nervioso y tejido conjuntivo general en los tratamientos control (+), en mayor grado, y PS-0.01 en menor grado, y sólo tejido conjuntivo general y branquias en BG-0.01. En las horas postreras para el control (+) fueron los mismos órganos a excepción de tejido nervioso, en PS-0.01 fue sólo en branquias y BG-0.01 no presentó lesión.

b. Necrosis granulomatosa.

La necrosis granulomatosa se hizo presente sólo a las 48 hrs. sistémicamente hablando. Siendo la glándula digestiva, el órgano linfoide y el tejido conjuntivo general los afectados en control (+), para PS-0.01 se observó sólo en el último tejido mencionado y en BG-0.1 no hubo hallazgos compatibles a la lesión.

c. Necrosis difusa.

Esta patología se observó mayormente a las 48 hrs. P.I.; en el control (+) reincide el órgano linfoide, branquias y corazón, y un nuevo órgano afectado, tejido hematopoyético. En PS-0.01 fueron los primeros dos además del tejido conjuntivo general, y BG-0.01 sólo en branquias. En forma incipiente se encontraron hallazgos compatibles a las 144 hrs. en corazón de organismos del control (+).

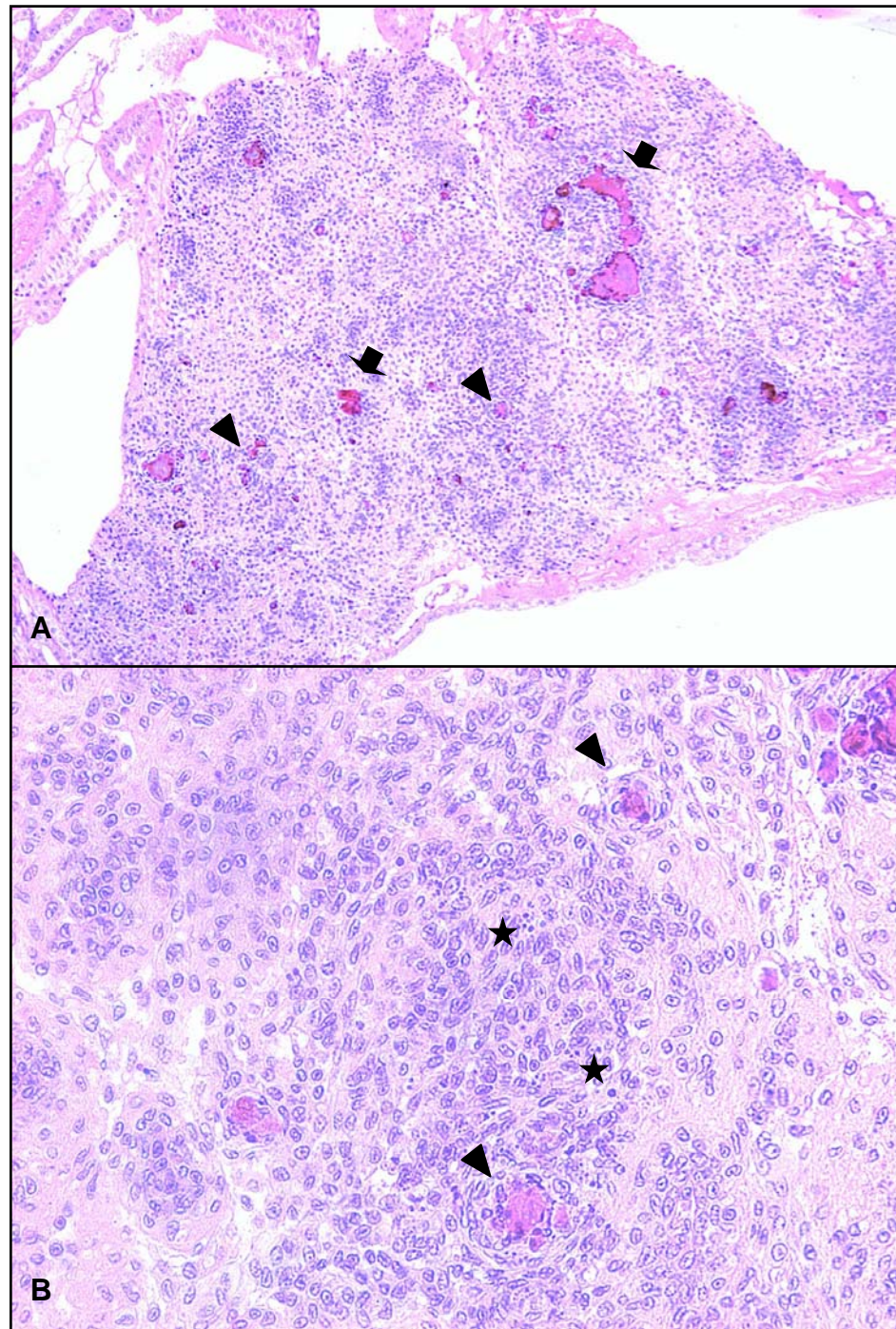


Fig. 30. Órgano linfoide de organismo del control (+) a 48 hrs. P.I. A. Nótese la presencia de granulomas (flechas) y nódulos hemocíticos (triángulos) multifocales de severidad moderada-severa (100X). B. En mayor aumento se observa necrosis difusa (estrellas) y una mejor definición de los nódulos hemocíticos, donde se observa el núcleo necrótico y la disposición concéntrica de hemocitos (400X).

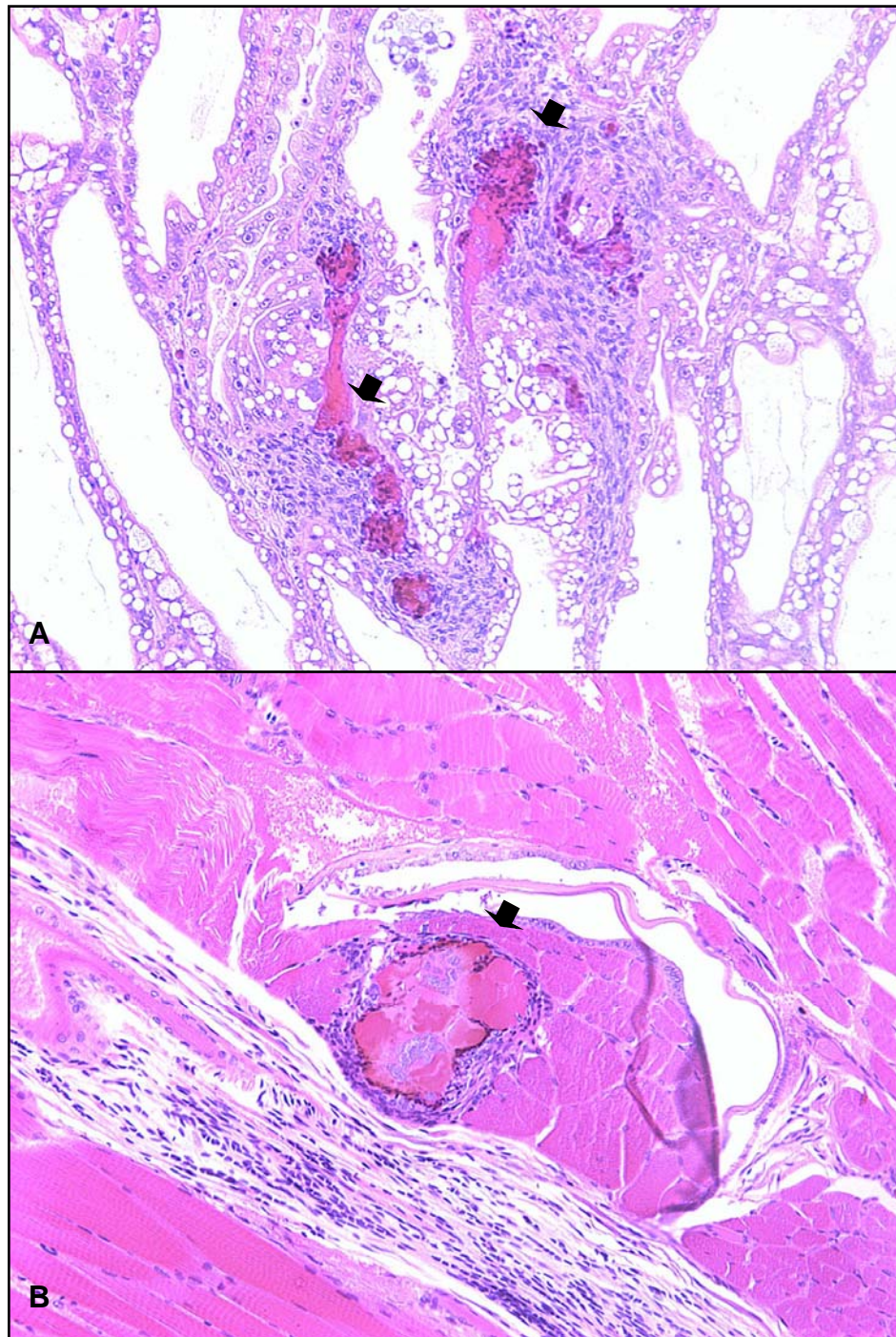


Fig. 31. Nótese la forma irregular de los granulomas (flechas), con un centro necrótico aumentado, limitado por zona de melanización y un gran número de hemocitos rodeándolo, dentro del centro necrótico se observan estructuras compatibles con colonias bacterianas (granulación basófila). A. Granuloma en glándula digestiva (200X). B. Granuloma en tejido conjuntivo (200X). Se trata de organismos del control (+) a 48 hrs. P.I.

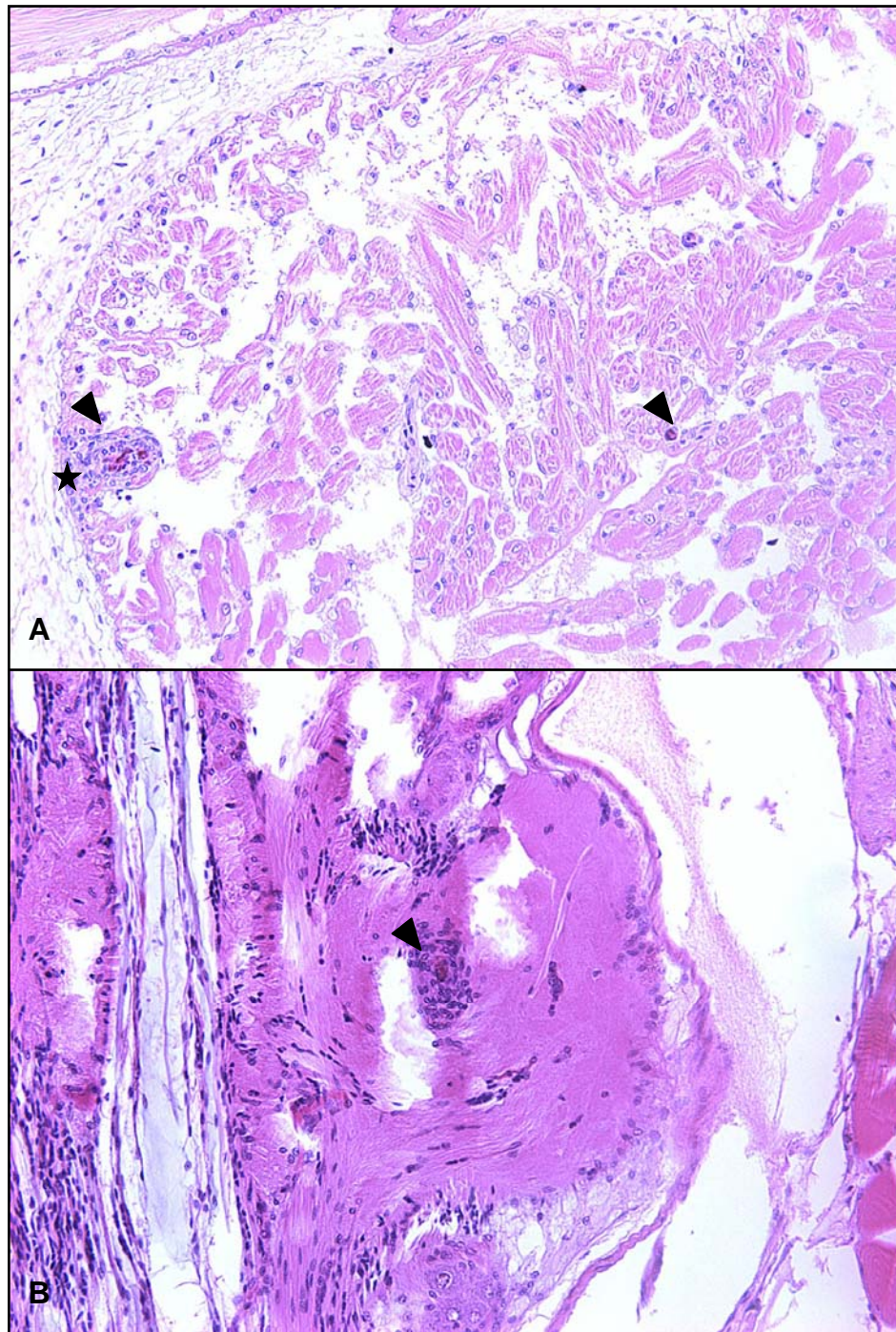


Fig.32. Organismo del control (+) a las 48 hrs. P.I. A. Múltiples nódulos hemocíticos (triángulos) en corazón con un foco de necrosis difusa (estrella) (200X). B. Nódulo hemocítico (triángulo) característico en ganglio del cordón nervioso ventral (200X).

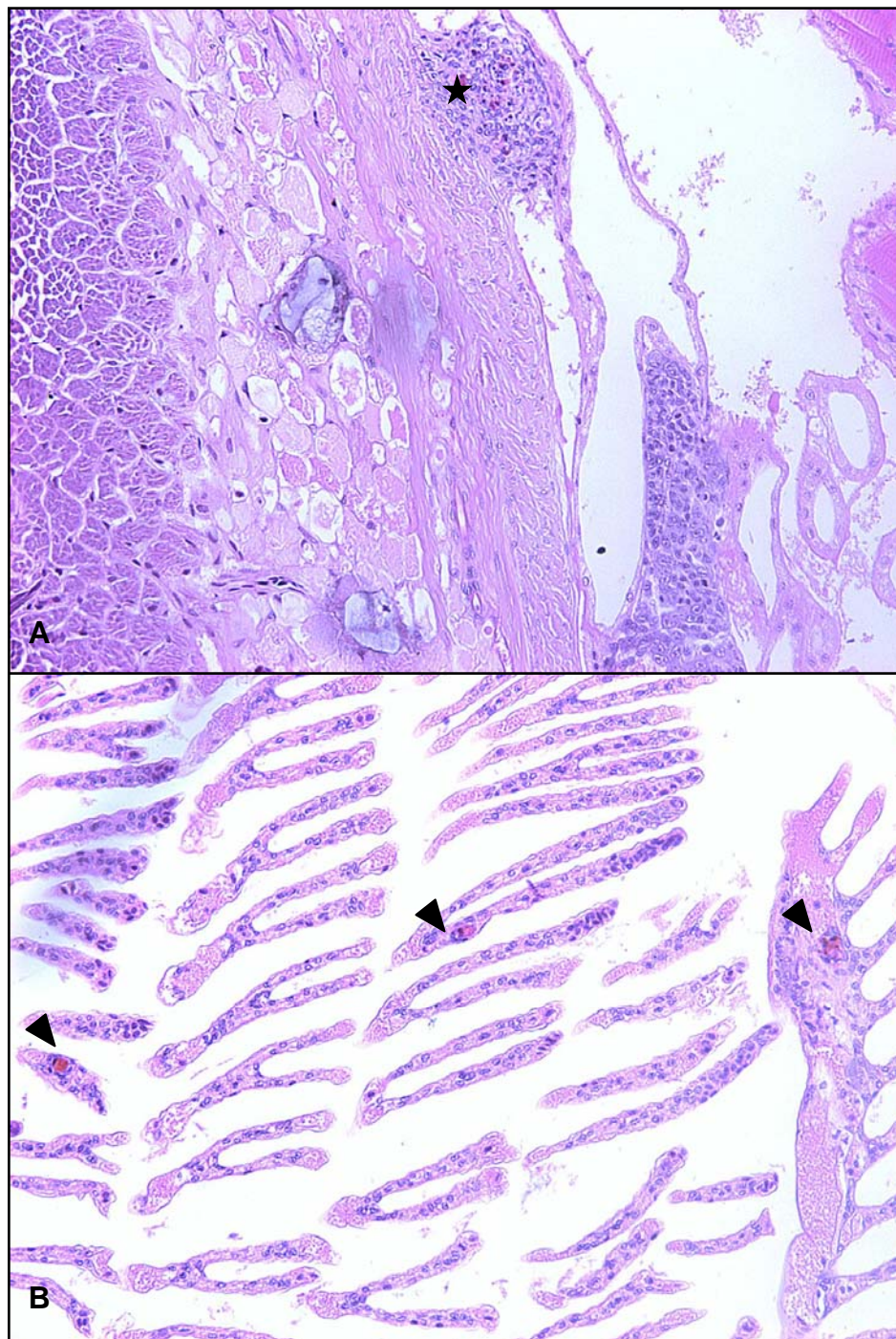


Fig. 33. Organismo control (+) a 48 hrs. P.I. A. Nótese la necrosis difusa (estrella) a mediano aumento (200X) en lóbulo de tejido hematopoyético. B. Presencia de múltiples nódulos hemocíticos (triángulos) en lamelas de branquia (200X).

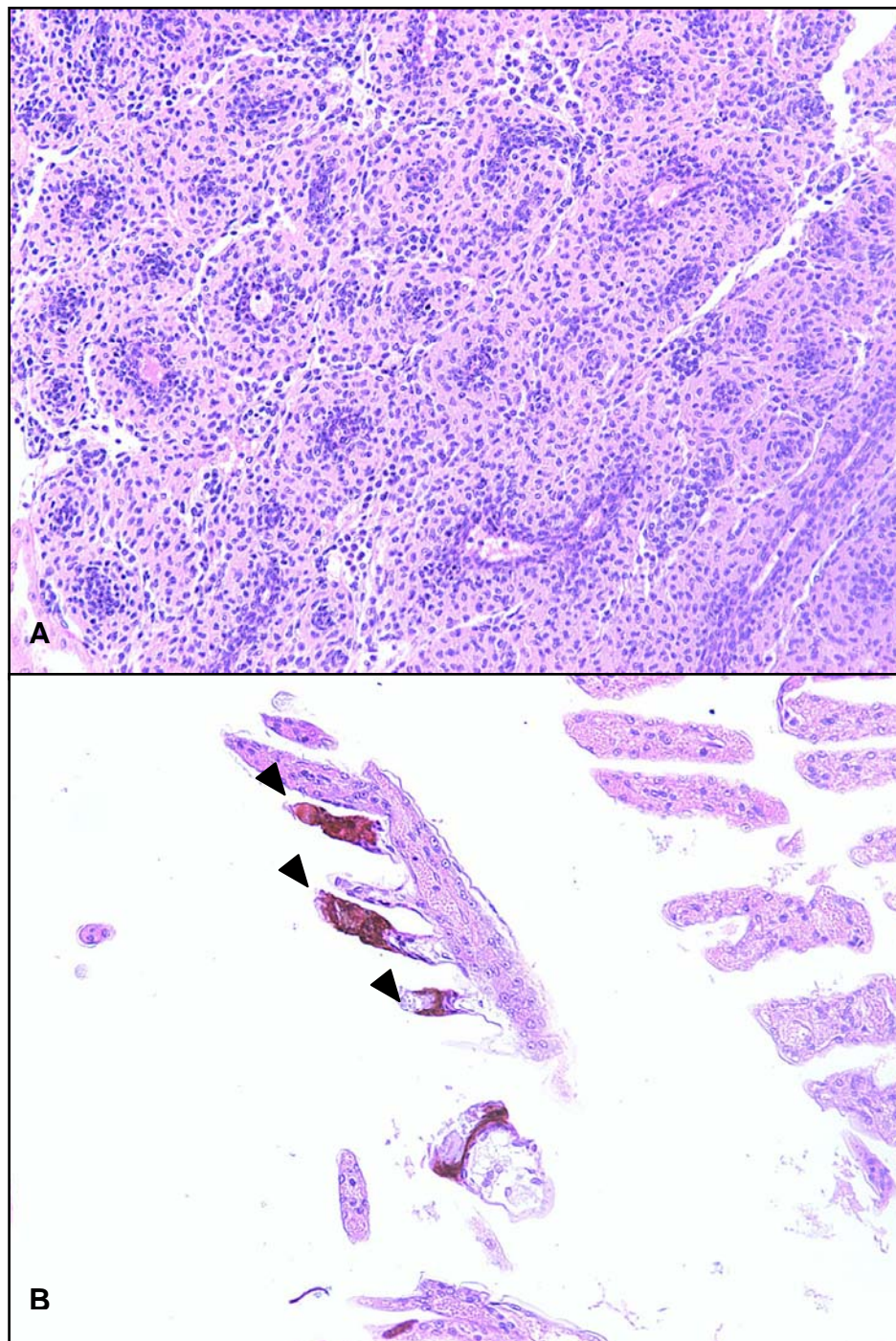


Fig. 34. Organismo BG-0.01 a 48 hrs. P.I. A. Órgano linfoide sin cambios patológicos visibles (200X). B. Presencia de nódulos hemocíticos melanizados (triángulos), en lamela de branquias nótese la sustancia de pigmentación café parda (200X).

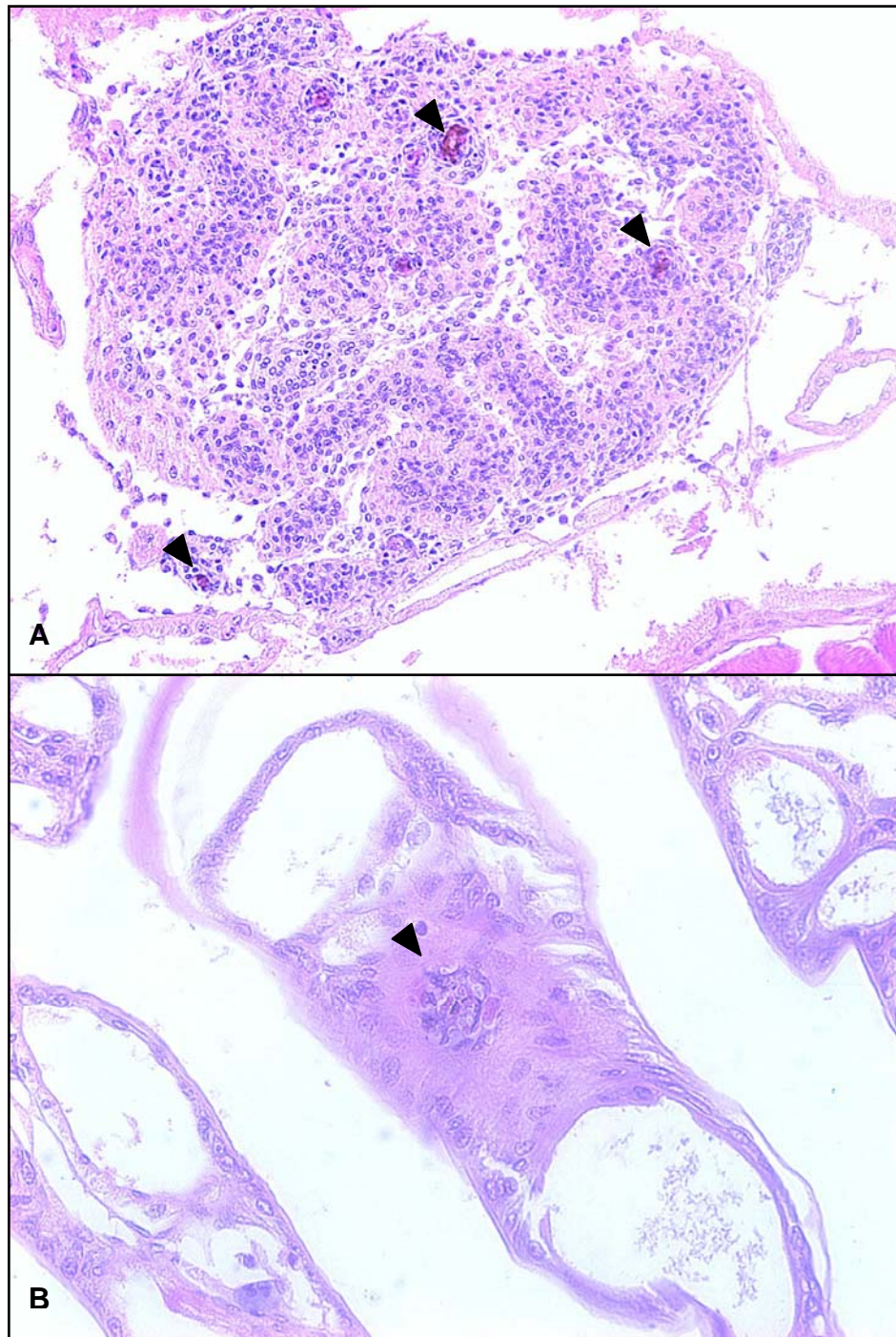


Fig. 35. Organismo PS-0.01 a 48 hrs. P.I. *A.* Órgano linfoide con presencia de múltiples nódulos hemocíticos (triángulos), algunos de ellos melanizados, de diferentes tamaños (200X). *B.* Nódulo hemocítico en septo branquial en proceso de resolución, nótese la ausencia de núcleo necrótico que es reemplazado por material de características homogéneas (400X).

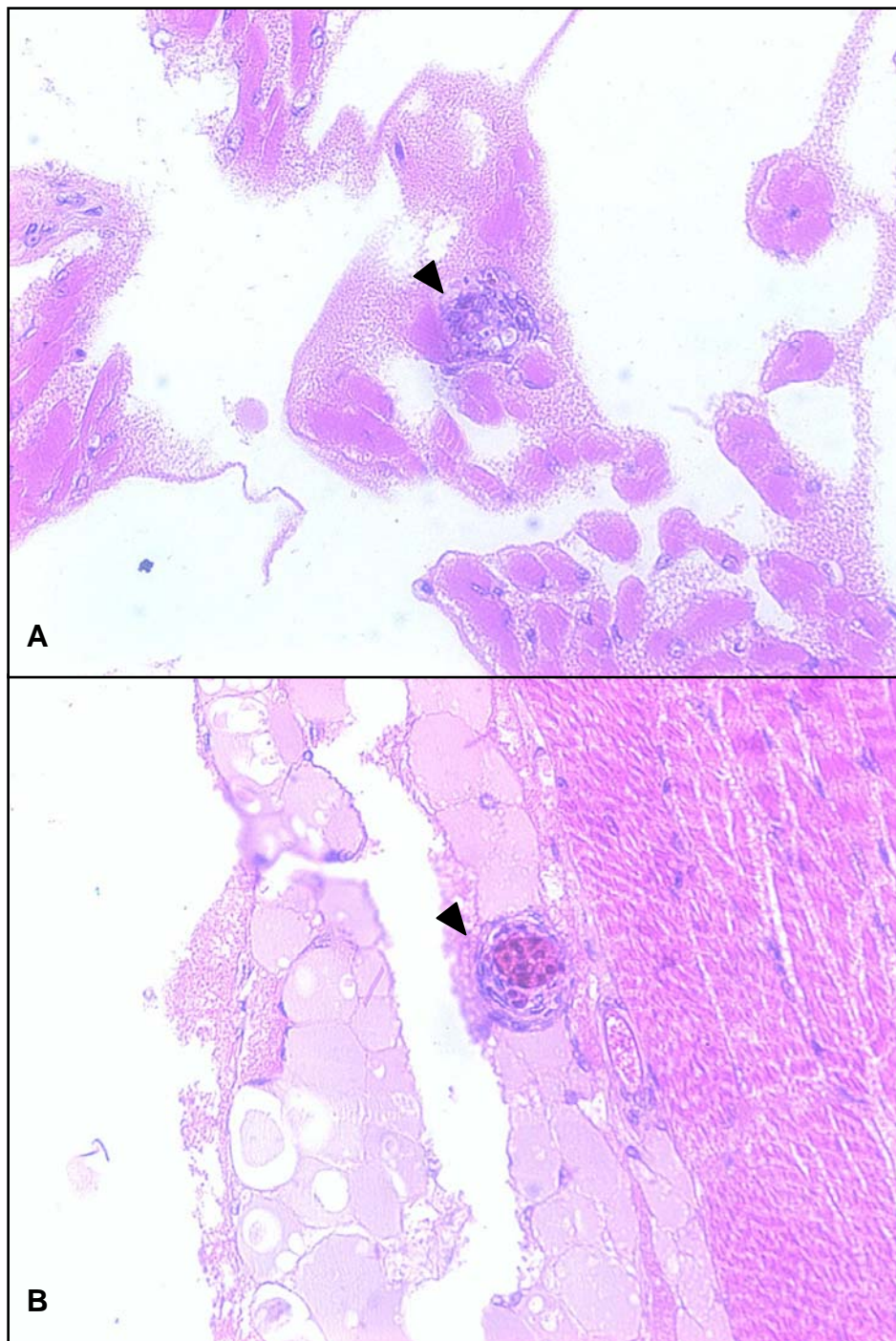


Fig. 36. Organismo PS-0.01 a 48 hrs. P.I., se observan nódulos hemocíticos (triángulos) de tamaño pequeño (400X), uno en proceso de resolución (A) en fibras musculares cardíacas. El segundo activo en tejido conectivo general (B).

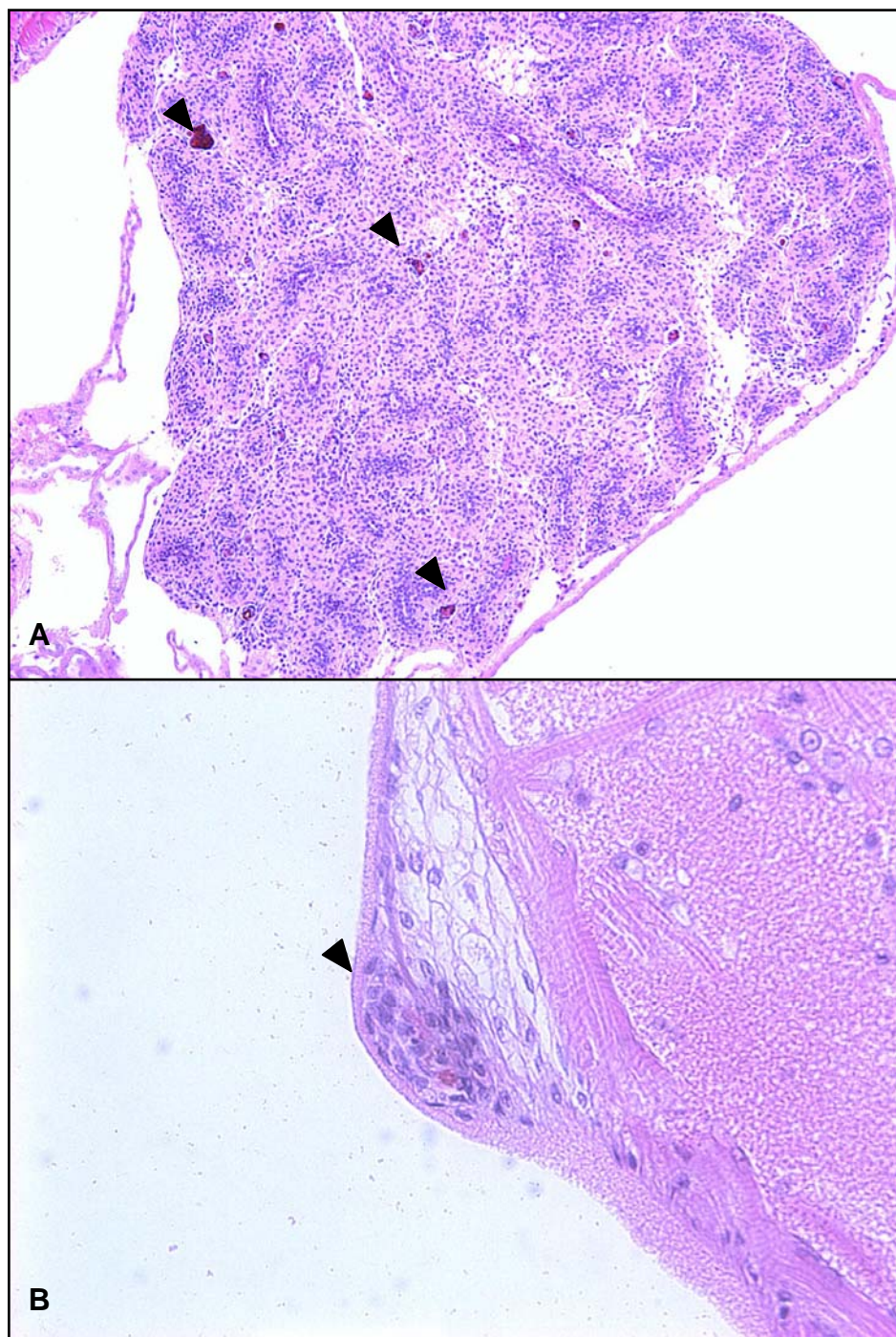


Fig. 37. Organismo control (+) a 144 hrs. P.I. A. El órgano linfoide aún presenta múltiples nódulos hemocíticos (triángulos) de diferentes tamaños y etapas (100X). B. Se señala un nódulo hemocítico pequeño en resolución temprana localizado en corazón (400X).

7.3.3 Conteo Total de Hemocitos Circulantes.

El CTH arrojó datos de importancia en los dos muestreos durante el desarrollo de la infección de *V. harveyi*. A las 48 hrs. P.I. el control (-) estuvo por arriba de los valores del resto de los tratamientos, y de forma relevante el control (+) fue el de más bajo conteo y el único con diferencia estadística respecto a los no inoculados ($p < 0.05$), tanto BG-0.01 y PS-0.01 no presentan diferencias, aunque el primero obtuvo los valores más altos entre la población infectada (Fig. 38). Ya avanzadas las horas P.I., 144 hrs. específicamente, BG-0.01 tiene un repunte en el CTH, siendo diferente estadísticamente al resto, en PS-0.01 se observa un comportamiento similar, sin embargo no obtuvo diferencia ante el control (-) pero sí ante el control (+), estos dos últimos son iguales ente sí (Fig. 39).

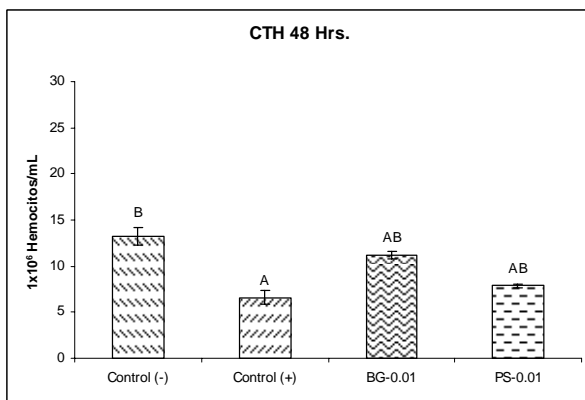


Fig. 38. CTH a las 48 hrs. post-inoculación. Letras diferentes señalan diferencia significativa ($p < 0.05$).

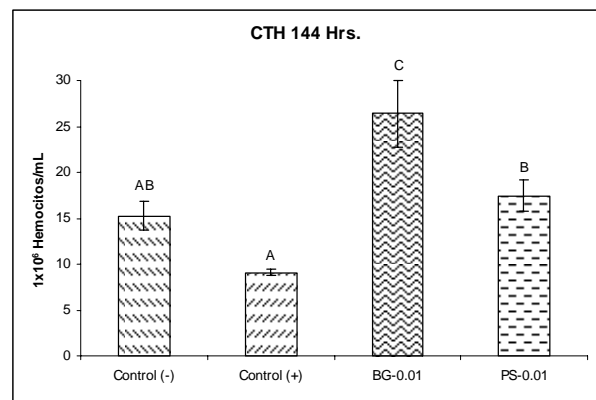


Fig. 39. CTH a las 144 hrs. post-inoculación. Letras diferentes señalan diferencia significativa ($p < 0.05$).

7.3.4 Generación de Anión Superóxido.

El parámetro de generación de O_2^- en hemocitos, demuestra diferencias sólo a las 48 hrs. P.I., ya que a las 144 hrs. todos los tratamientos son estadísticamente semejantes (Fig. 40). Cuando sí existió, PS-0.01 fue el de los valores más altos y estadísticamente desigual a los dos controles pero no a BG-0.01 ($p < 0.05$). El control (-) fue el de menor generación, empero no se encontró diferencias entre el control (+) y entre el BG-0.01 (Fig. 41).

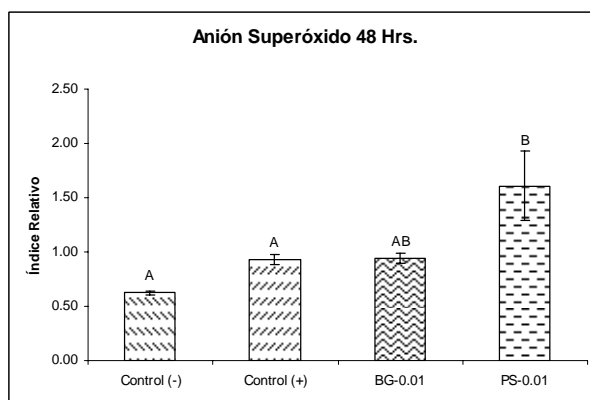


Fig. 40. Generación de anión superóxido en hemocitos a las 48 hrs. post-inoculación. Letras diferentes señalan diferencia significativa ($p < 0.05$).

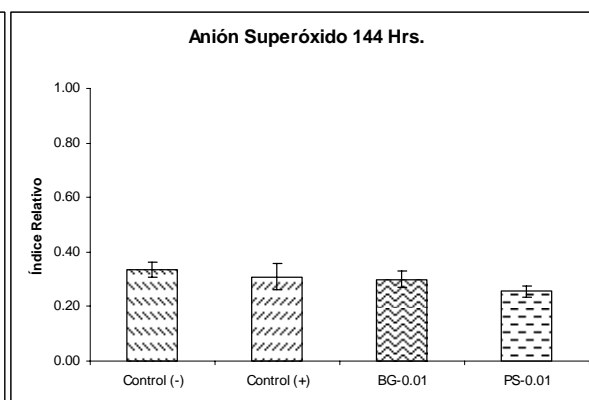


Fig. 41. Generación de anión superóxido en hemocitos a las 144 hrs. post-inoculación. No existe diferencia significativa entre tratamientos.

7.3.5 Actividad Superóxido Dismutasa.

Los hemocitos demuestran un patrón de actividad SOD similar en ambos puntos P.I., tanto a las 48hrs. como a las 144 hrs. (Fig. 42 y 43), BG-0.01 y PS-0.01 tuvieron una actividad más elevada que los tratamientos control y fueron estadísticamente diferentes ($p < 0.05$). Entre los primeros no existe dicha diferencia,

aún cuando BG-0.01 muestre un mayor número de unidades por mg de proteína en ambos casos.

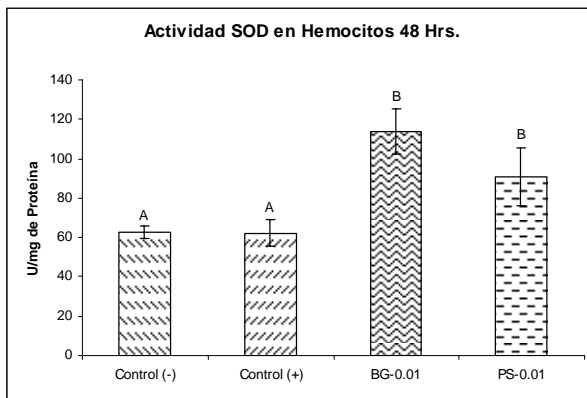


Fig. 42. Actividad SOD en hemocitos a las 48 hrs. post-inoculación. Letras diferentes señalan diferencia significativa ($p < 0.05$).

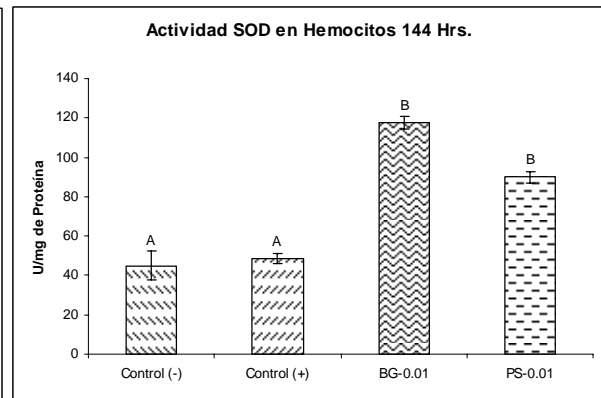


Fig.43. Actividad SOD en hemocitos a las 144 hrs. post-inoculación. Letras diferentes señalan diferencia significativa ($p < 0.05$).

7.3.6 Proteínas Plasmáticas.

Se encontró diferencia entre PS-0.01 y BG-0.01 ($p < 0.05$) en cuanto a los mg de proteína por mililitro de plasma a las primeras 48 hrs., siendo el primer tratamiento el de más alto valor y el segundo el de menor entre todos; ninguno posee diferencias respecto a los controles (Fig. 44). A las 144 hrs. P.I. el de mayor cantidad de proteínas plasmáticas fue BG-0.01, siendo diferentes a todos los demás ($p < 0.05$); PS-0.01 le siguió, pero nada más obtuvo diferencia contra control (+), el último fue el de menor cantidad de proteína pero aún así es igual estadísticamente ($p > 0.05$) al Control (-) (Fig. 45).

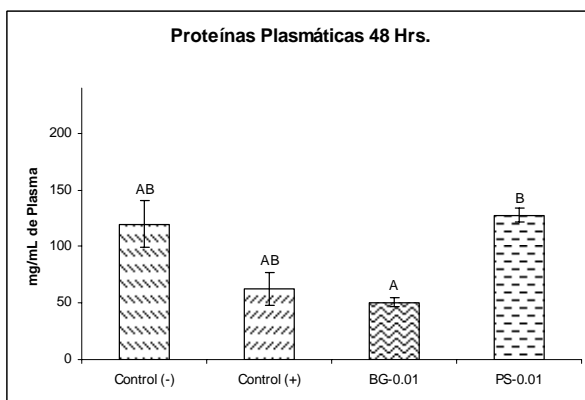


Fig. 44. Proteínas plasmáticas a las 48 hrs. post-inoculación. Letras diferentes señalan diferencia significativa ($p < 0.05$).

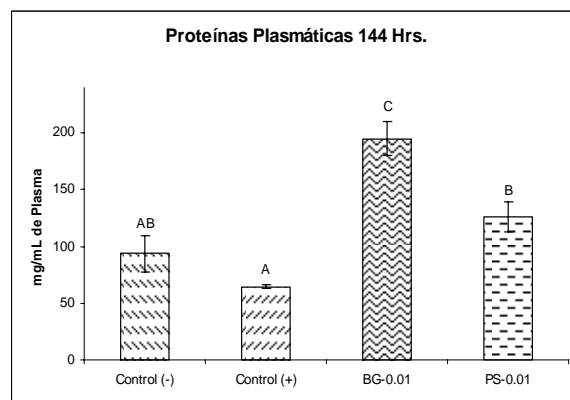


Fig. 45. Proteínas plasmáticas a las 144 hrs. post-inoculación. Letras diferentes señalan diferencia significativa ($p < 0.05$).

7.3.7 Tiempo de Coagulación.

A la 48 hrs. post-inoculación fue el único momento en donde se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los tiempos de coagulación, siendo control (-) y BG0.01 estadísticamente desiguales al control (+) y PS-0.01. Éstos tardaron 6 veces más en obtener la coagulación respecto al control (-) y el doble de tiempo que BG-0.01. Tanto al inicio como al final todos obtuvieron el mismo T.C. (ver Tabla 11).

Tabla 11. Tiempos de coagulación observado en los tratamientos en diferentes momentos de la infección.

Hrs. Post-Infección	0 Hrs.	48 Hrs.	144 Hrs.
Tratamiento			
Control (-)	<10seg	<10seg	<10seg
Control (+)	<10seg	<60seg	<10seg
BG-0.01	<10seg	<30seg	<10seg
PS-0.01	<10seg	<60seg	<10seg

7.4 Resumen de Resultados.

Tabla 12. Resumen global de los principales resultados.

Tratamiento	Control (-)	Control (+)	BG	PS
Respuesta Inmune basal	- TCH y TC dentro de los parámetros. - Actividad oxidativa y antioxidante no refleja estrés oxidativo		- THC aumenta notablemente a los 7 días y mantiene semejanza a las 14. - TC dentro de los parámetros. - Mayor actividad antioxidante.	- THC aumenta, pero no al grado de BG. - TC dentro de los parámetros. - Mayor actividad antioxidante en algunos tejidos. - Mayor cantidad de proteínas plasmáticas circulantes
Respuesta Inmune ante WSSV	No infectado	- 100% Mortalidad a las 144 hrs. - TC se retarda a 90Seg. - THC y PP caen por debajo del Control (-) pero arriba de BG y PS	- 100% mortalidad a las 72 hrs. - No existe coagulación. - THC y PP caen en menor tiempo que C(+).	- 100% mortalidad a las 72 hrs. - No existe coagulación. - THC y PP caen en menor tiempo que C(+).
Respuesta Inmune ante <i>Vibrio harveyi</i>	No infectado	- 67% de mortalidad a las 36 hrs. - THC menor a todos los tratamientos, durante todo el bioensayo. - Mayor TC.	- 17% de mortalidad. - THC no diferente al C(-) y superior al final. - Mayor actividad antioxidante.	- 42% de mortalidad. - THC no diferente al C(-). - Mayor actividad oxidante a las 48 hrs. - Mayor actividad antioxidante.
Alteraciones Histopatológicas	Ninguna	- G3 de daño general en WSSV. - G2-3 de daño general en Vibriosis	- G4 de daño general en WSSV. - G1 de daño general en Vibriosis.	- G4 de daño general en WSSV. - G1-2 de daño general en Vibriosis.

VIII. DISCUSIÓN.

8.1 Potencial de 1-6 β -glucano y de Polisacáridos Sulfatados administrados por medio del alimento en la promoción de indicadores de estatus de salud en camarón blanco *Litopenaeus vannamei*.

Diversos autores. (Koike, 1976; Glovsky *et al.* 1983; Williams *et al.* 1988; Maheshwari & Siddiqui, 1989; Williams *et al.*, 1989; Pedroso, 1994; Hetland *et al.*, 1998; Tzianabos *et al.*, 1998; Hetland, 2000; Morris-Quevedo *et al.*, 2000; Ohata *et al.*, 2003; Jung *et al.*, 2004) han señalado el potencial de compuestos glucosídicos de origen biológico, especialmente de microorganismos, para estimular la respuesta inmune de los seres vivos. Estos han sido evaluados principalmente en vertebrados, siendo en mamíferos terrestres los primeros y posteriormente en peces, los cuales poseen una respuesta específica a patógenos invasores. Sin embargo, en los últimos años se han estudiado (Song & Hsieh, 1994; Boonyaratpalin *et al.*, 1995; Sung *et al.*, 1996; Song *et al.*, 1997; Scholz *et al.*, 1999; Vici, 2000; Chang *et al.*, 2000; Campa-Córdova *et al.*, 2002; Chang *et al.*, 2003; Burgents *et al.*, 2004; Sritunyalucksana *et al.*, 2005) algunos de estos compuestos en invertebrados, especialmente en camarones peneidos, donde toman importancia dada la carencia de la rama específica del sistema inmune, y así, evaluar su utilización con fines profilácticos. La administración de compuestos glucosídicos, específicamente, 1-6 β -glucano y polisacáridos sulfatados, para estimular el sistema inmune, y por lo tanto bioindicadores de estatus de salud en el camarón blanco *L. vannamei*, no fue determinante en este estudio. Los

parámetros analizados no arrojaron datos contundentes para poder establecer que los compuestos utilizados tienen efecto estimulante directo general a los 14 días de administración. El análisis de actividad SOD y CAT en músculo y glándula digestiva no ofrece valor indicativo para establecer dicho estatus de salud, ya que no existió un patrón definitivo en las actividades detectadas ni para cada tejido ni para cada tratamiento en ningún punto de muestreo, lo cual puede tener concordancia con lo encontrado por Campa-Córdova *et al.*, (2002), donde la actividad SOD en músculo de organismos expuestos a β -glucano y polisacáridos sulfatados, notaron un incremento en dicha actividad sólo en las primeras horas post-exposición, para volver a los valores basales pasadas las 72hrs, la principal diferencia es que el presente experimento tuvo una duración de 336 hrs. en las cuales los organismos estuvieron en contacto con los compuestos evaluados. Para catalasa no existen experimentos previos que hayan tratado de determinar la relación enzima-inmunoestimulante. Por lo contrario la respuesta de la actividad SOD en los hemocitos a la administración de BG al 0.01% a los 14 días remarcó una relación directa enzima-inmunoestimulante en éstas células, al obtener el triple de actividad que el control, lo cual pudiera diferir con los resultados obtenidos por el autor anterior, pues pasadas las 72 hrs. encontró una disminución de la actividad respecto a su control, y de igual forma con la actividad SOD propuesta por Chang *et al.* (2003) donde un nivel de inclusión de 0.1% empató a la actividad del control a los 20 días de administración y porcentaje de inclusión superiores sobrepasaron ligeramente al control. El parámetro que se pudiera

considerar con mayor valor para este experimento fue el conteo total de hemocitos circulantes, siendo la cúspide en el número de células a los 7 días y obteniendo un patrón similar para los 14 días, pero en menor grado y sin denotar diferencias entre tratamiento, Campa-Córdova *et al.* (2002), encontró una disminución marcada en el CTH en las primeras horas post-exposición y entre mayor la dosis de beta-glucano los organismos tardaron más en recuperar o aumentar el número de células circulantes; Chang *et al.* (2003), señalan que a los 20 días de administración de β -glucano entre mayor el nivel de inclusión (hasta 2%) menor es el CTH y aún más, sólo el de menor inclusión (1%) sobresalió al control, lo cual empata de cierta manera a los resultados obtenidos para ese compuesto en el presente experimento. Espinosa *et al.* (2002) evaluaron LPS donde encontraron un aumento exponencial del número de hemocitos en circulación a las 10 hrs. post-exposición. Por el contrario ciertos autores citan la inexistencia de diferencia en este parámetro entre camarones expuestos a hipoxia y niveles tóxicos de amoníaco hasta 7 días consecutivos (Cheng *et al.*, 2002; Liu & Chen, 2004); Coutteau (2000) hace notar una disminución del CTH de hasta el 26% en organismos tratados con un inmunoestimulante comercial en comparación a los organismos control. Las proteínas plasmáticas no demostraron ser indicativas a los 14 días al denotar valores semejantes al control, aún cuando según Rodríguez y Le Moullac (2000) señalen interés inmunológico, en cierta discrepancia en el experimento de Molina *et al.* (2002) se observó un ligero decremento de las PP en *L. vannamei* al exponer a β -glucano, Jussila *et al.* (2001) reportan la disminución

de PP por estrés en otro crustáceo. El tiempo de coagulación encontrado era de esperarse ya que para organismos normales por lo regular es menor a 30 segundos, pero sí es importante señalar entonces que ninguno de los compuestos demerita la capacidad de coagulación de la hemolinfa, como lo señalan Lee *et al.* (1999); Fotedar *et al.* (2001); Jussila *et al.* (2001), observando diferencias en el tiempo de coagulación debido a diferentes factores estresantes.

Todo lo anterior sugiere que la inmunoestimulación o bien la promoción de estatus de salud en camarones expuestos a 1-6 β -glucano y polisacáridos sulfatados no pudo ser del todo elucidada en este experimento, empero, si se detectaron indicativos de que existe activación hemocítica, respecto al incremento del número celular y a la actividad SOD que presentan los tratamientos con BG, así como la no depreciación de los valores de proteínas plasmáticas y tiempo de coagulación. Toma importancia la casi inexistencia de evaluación de los polisacáridos sulfatados bajo este mismo parámetro, ya que a éstos se le han atribuido propiedades antiadhesivas más que estimulantes (Baba *et al.*, 1998; Guzmán-Murillo, 1997; Guzmán-Murilo & Ascencio, 2000; Guzmán-Murillo, 2002). Uno de los pocos trabajos reporta un incremento de células inflamatorias en ratones en el sitio de inoculación de una fracción polisacárida de microalga marina (Morris-Quevedo *et al.*, 2000), que puede entenderse en este experimento al observar un aumento en el número de CTH tanto a los 7 ($p < 0.05$) como a los 14

días ($p>0.05$) de experimento. El siguiente paso fue entonces, conocer el potencial como uso profiláctico ante el desafío patogénico por virus y bacterias.

8.2 Potencial de 1-6 β -glucano y de Polisacáridos Sulfatados como medida profiláctica para la prevención de enfermedades en *L. vannamei*.

Así como se empezó a estudiar la característica inmunoestimulante de estos compuestos, de la misma forma, se ha investigado su potencial para prevenir la infección de microorganismos patógenos, que en sí, es la finalidad que interesa a la industria. Por lo tanto diversos autores señalan el beneficio de su administración para disminuir la mortalidad, incidencia y prevalencia de múltiples enfermedades no sólo de camarones, si no de demás animales acuáticos y terrestres (Baba *et al.*, 1988; Pedroso, 1994; Song *et al.*, 1997; Hetland *et al.*, 1998; Kemodle, *et al.*, 1998; Crumlish & Inglis 1999; Berger, 2000; Ortuño *et al.*, 2002; Burgents *et al.*, 2004; Jung *et al.*, 2004, Breivik *et al.*, 2005). Este estudio arroja información de mucho interés, para dos tipos de patógenos. Primero se demuestra que la administración de estos dos compuestos reduce la mortalidad provocada por *V. harveyi* en juveniles de *L. vannamei* comparándolo con organismos no expuestos a estos compuestos, y segundo, la sinergia que existió entre los “inmunoestimulantes” con el WSSV para alcanzar la totalidad de la mortalidad con mayor rapidez, es decir, la infección de WSSV pasó de ser aguda a hiperaguda.

Esta infección hiperaguda de WSSV concuerda con la de Molina *et al.* (2002), quienes encontraron un incremento en la mortalidad de camarones juveniles ante el desafío de WSSV administrando alimentos con 0.0075% de nivel de inclusión de β -glucano en combinación con Vitamina E (0.15%) y C (0.5%). De igual forma observaron un decremento en el CTH de estos organismos así como de proteínas plasmáticas, lo que sucedió también en este experimento, de igual forma Roux *et al.* (2002) reporta una dramática reducción en el número de hemocitos a las 32 hrs. P.I. con WSSV. El bajo CTH en ambos tratamientos con BG y PS, se entiende al revisar los hallazgos histopatológicos, donde se revela una destrucción masiva de hemocitos en el órgano linfoide y de células progenitoras en el tejido hematopoyético, y es donde toma importancia el gran número de hemocitos con características compatibles a necrosis, pues estos últimos eran los que estaban en circulación, es decir, los organismos no contaban con células de reemplazo y el órgano principal de defensa se encontraba destruido por la acción del virus. Las observaciones anteriores no se notaron en el control (+), lo que sugiere un rol sinérgico tanto de β -glucano, así como de los polisacáridos sulfatados en el accionar del virus para producir un mayor daño durante la infección, y por lo tanto una mortalidad acelerada de los organismos. Contradictoriamente, Berger (2000) reporta un incremento en el 54% de la sobrevivencia en estanques de producción utilizando un producto comercial (SP 604), y este autor se le une a Song *et al.* (1997), que fue el primero en reportar sobrevivencia ante WSSV por utilización de BG, observando 59% a 40% del

control en PL 66 y 54% a 0% en PL113 de *Penaeus monodon*. Lo interesante del trabajo de Song *et al.* (1997), es que su calendario de administración de BG fue una inmersión primaria para después alimentar con BG cada 2 semanas por 4 meses y medio. De igual forma Chang *et al.* (2003) obtuvo una mejor sobrevivencia en organismos expuestos a alimento con 0.1% de BG por 20 días, atribuyéndoselos a la mejora de los parámetros inmunitarios. Los autores señalan que el hallazgo fue debido a que todos los organismos con alimentos <0.1% llegaron al 100% de la mortalidad antes del día 12; en ese experimento se vio un descenso en los parámetros pero días después se estabilizaron, la dosis inyectada fue un stock de 20X a 0.01mL/camarón, pero no se conoce la carga viral, al igual que en el presente trabajo experimental. El uso en conjunto con LPS también demostró un 55% de sobrevivencia más que los no alimentados (Newman, 1999), pero por sí solo señalan que no ha proveído ningún beneficio a productores en regiones con intensa presencia de WSSV en estanques y es un hecho reconocido por algunos fabricantes. Por último Takahasi *et al.*, (1998), utilizó polisacáridos sulfatados (Fucoidán) a 60 y 100 mg/kg/peso por 15 días encontrando un sorprendente 80% de sobrevivencia contra un 0% del control. Se señala un posible papel de inhibición de la adhesión del virus a la célula, tal como se ha comentado anteriormente. Sin embargo, el uso de estas dosis en el experimento hace prácticamente imposible el uso comercial por su alto costo.

En otros estudios con diferentes virus, dígame el virus del síndrome de taura (TSV), se reporta la misma tendencia de los parámetros físicos de la hemolinfa

encontrados en el desafío con WSSV en esta tesis (Song, et al 2003). Ahí se observó el mismo patrón de color reportado en la tabla 7.1x, así como a los tiempos de coagulación, y el CTH bajo. Lo que sugiere un patrón patogénico similar en ambos virus. Una diferencia primordial sería que WSSV activa la expresión de un inhibidor de proteasa que bloquea la actividad de la serin-proteasa que activa la proPO, por lo tanto disminuye la actividad de PO y sería una forma de evadir a los mecanismos de defensa del huésped (Roux *et al.*, 2002), de la misma forma estimula la síntesis de LGBP en hemocitos, ello sugiere una implicación de la LGBP en el desarrollo de la infección, podría ser por un aumento sensibilización hemocítica para una postrera degranulación de hemocitos sin llegar a producir PO y así disminuir la población de hemocitos circulantes, y por lo tanto la administración de polisacáridos para tratar de prevenir la infección es inútil puesto que de la misma forma que el virus estimula la síntesis de LGBP y se estaría adelantando a la infección viral es decir actuaría en forma sinérgica a destiempo. Algo que refuerza la idea es la falta de una reacción inflamatoria ante la presencia de un virus, y la propuesta de un acomodo proactivo donde el huésped desarrolla un sistema de tolerancia para prevenir la muerte celular por apoptosis (Flegel, 2001). Un ejemplo sería lo reportado por Venegas *et al.* (2000) donde camarones *Penaeus japonicus* sobrevivientes de un brote natural de WSSV fueron de nuevo desafiados a WSSV y existió una sorprendente sobrevivencia del 94%. Ésta última parte no puede ser concluyente dado que en los análisis realizados no se incluían los necesarios para determinar una naturaleza de este tipo, sin embargo, en un principio se manejaba la propuesta de un “desgaste

inmunológico” (Smith *et al.*, 2003) o de defensa del camarón ante la exposición crónica a inmunoestimulantes, lo que se descarta por los resultados obtenidos del desafío con la bacteria *V. harveyi*.

Resultados contrarios se obtuvieron del reto con la bacteria *V. harveyi*. Frente a este patógeno los organismos expuestos a BG y PS demostraron mayor capacidad de resistir la infección y por lo tanto disminuir la mortalidad causada por la misma. Un estudio muy similar con observaciones semejantes fue el de Burgents *et al.* (2004), donde en camarones de la misma especie fueron retados ante *Vibrio sp.* (4×10^7 UFC/mL) después de haber sido estimulados con un suplemento a base de *S. cerevisiae*, por 3 y 4 semanas obteniendo una sobrevivencia mayor a los camarones control, 75 % a 43 % a las 3 semanas y 63% 37% a las 4 semanas de exposición, lo interesante fue que las mortalidades empezaron alrededor de la 12 hrs. P.I. y cesaron a las 48 hrs., patrón casi idéntico al obtenido en el presente estudio. Berger (2000) también señala un aumento en la supervivencia, 100% contra 20% del control, en estanques de producción utilizando inmunoestimulantes comerciales (SP 604). Anteriormente (Dehasque *et al.*, 1998) reportó una mayor sobrevivencia (54% a 13%) ante el desafío de *V. harveyi* en larvas de camarón *P. indicus* alimentadas con mezcla de inmunoestimulantes (no definidos). Los valores de sobrevivencia de los organismos del control (+) están dentro del rango encontrado por Aguirre-Guzmán *et al.* (2001), para *V. harveyi* a concentración de 1×10^7 pero en etapas larvarias. En este sentido se sugiere que los mecanismos activados por los compuestos

fueron los adecuados para poder poner en “alerta” al organismo y enfrentar una invasión bacteriana, este punto de vista se ve fortalecido por los resultados del CTH, así lo reportan recientemente Sritunyalucksana *et al.* (2005), donde se describe un notable incremento en este parámetro en animales *P. monodon* retados a *V. harveyi* e inmunoestimulados con extracto de levadura, además, Montero & Austin (1999) señalan una actividad citotóxica en hemocitos de productos extracelulares de *V. harveyi*, lo que causa una baja en el CTH durante una infección por la bacteria (Goarant *et al.*, 2000), afectan la actividad SOD en hemocitos y tiempo de coagulación, Lee *et al.* (1999) relatan la falta de coagulación de hemolinfa en el estudio de la pérdida de la homeostasis hemolinfática en *P. monodon*; así como a los valores de proteínas plasmáticas. Si bien la generación de anión superóxido por hemocitos no resultó elevada en organismos tratados con β -glucano, se debe recordar que en estos camarones existía un mayor número de hemocitos y por lo tanto en conjunto podría haber una mayor generación de este radical para eliminar el patógeno, y aún más, estos hemocitos contaron con una mayor actividad SOD, lo que indica mayor protección ante este radical. Un patrón semejante sería limitado para los juveniles tratados con polisacáridos sulfatados, en estos, se ha comprobado la inhibición de la adhesión del género *Vibrio* a células animales por Guzmán-Murillo (1997, 2002), lo que puede explicar el aumento en la supervivencia de los camarones, pero en menor grado que con BG. Todo lo anterior se ve de igual manera reflejado en los resultados histopatológicos, donde los organismos del control (+) muestran mayor

extensión y severidad de daño a tejidos tanto a las 48 como a las 144 hrs. post-infección, cabe señalar que la aparición de necrosis granulomatosa sugiere una mayor incapacidad de los hemocitos de limitar a la bacteria, lo que no sucedió en ningún camarón de los tratamientos con compuestos glucosídicos. En estos la afección principal fueron nódulos hemocíticos, y ello implica esa capacidad de los hemocitos por limitar la infección y se fortalece con los resultados de los demás parámetros ya mencionados, y aún más, con lo observado a nivel del sitio de inoculación (ver tabla 7.3 y 7.4). Aún cuando no sea en camarones, los siguientes estudios impactan una idea que sustente las aseveraciones anteriores. BG reduce el riesgo de la formación de abscesos por *Staphylococcus sp.* por activación de neutrófilos (Kemodle, *et al.*, 1998), estimulando la fagocitosis (Cleary *et al.*, 1999; Breivik *et al.* 2005). En el cangrejo *Limulus polyphemus* el Factor G es activado por medio del BG de paredes celulares de hongo, esta activación inicia la cascada de coagulación de la hemolinfa. (Takaki *et al.* 2002). Otros estudios que pudieran complementen los resultados anteriores son, en *P. monodon*, a consecuencia de exposición a hipoxia por 6 hrs. disminuye su capacidad de eliminación de *V. harveyi* en un 50% respecto al control, y del índice de fagocitosis (Direkbusarakom & Danayadol 1998). El efecto de condiciones hipóxicas por 24 hrs. redujo la resistencia de *L. stylirostris* al desafío experimental de *V. alginolyticus* (Le moullac *et al.*, 1998) *M. rosenbergii* aumento su susceptibilidad a *Enterococcus sp.* después de un período hipóxico y disminuyó en un 56% su capacidad de eliminación bacteriana, en 46% su índice fagocitario y reducción de NBT (Cheng *et al.*, 2002).

IX. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.

En vista de los resultados obtenidos la hipótesis planteada se rechaza, cumpliéndose los objetivos propuestos. Empero se concluye que la evaluación de los compuestos inmunoestimulantes de origen glucosídico, β -glucano y polisacáridos sulfatados, no fue contundente, pero sí arrojó resultados parciales de un posible rol en la activación de ciertos parámetros inmunitarios. De igual forma se pudo establecer el rol profiláctico que pudieran jugar estos compuestos ante la presencia de un patógeno.

1. El uso de 1-6 β -glucano y/o de polisacáridos sulfatados no promueve indicadores de estatus de salud generales, como es la actividad antioxidante en músculo y glándula digestiva. Pero si promueve ciertos parámetros específicos inmunitarios como el CTH y actividad SOD en hemocitos.
2. El uso de 1-6 β -glucano y/o de polisacáridos sulfatados no demostró ser una medida profiláctica para la prevención de la infección del virus del síndrome de la mancha blanca, por lo contrario se concluye que el uso de estos compuestos son perjudiciales y contraproducentes.
3. El uso de 1-6 β -glucano y/o de polisacáridos sulfatados demostró ser una medida profiláctica para la prevención de la infección de la bacteria *Vibrio harveyi*, disminuyendo la mortalidad provocada por una carga alta de UFC y promoviendo una recuperación de mayor rapidez en camarones infectados.

Conclusiones y Recomendaciones

De acuerdo a las anteriores conclusiones se postulan las siguientes recomendaciones.

1. No se recomienda el uso de 1-6 β -glucano y polisacáridos sulfatados a largo plazo como medida profiláctica para prevenir un potencial brote de WSSV.
2. Se recomienda el uso de estos compuestos para prevenir un posible brote de vibriosis, sin embargo sólo en zonas libres de WSSV, ya que la posible presencia del virus en la explotación podría tornarse a magnitudes catastróficas.
3. La evaluación de otros parámetros no sometidos a análisis en este experimento, como proPO y PO, péptidos antimicrobianos, diferencial de hemocitos, compuestos opsonizantes, óxido nítrico, índice de fagocitosis, etc.
4. El estudio de diferentes calendarios de administración de estos y otros compuestos dichos inmunoestimulantes para evaluar parámetros inmunitarios y resistencia a patógenos.
5. Profundizar en los mecanismos de activación o supresión directa y/o indirecta por β -glucanos y polisacáridos sulfatados en camarones *Litopenaeus vannamei*, por medio de estudios moleculares.
6. Estudiar a nivel de cultivo de células de camarones el mecanismo infectivo de WSSV-célula y posibles rutas de bloqueo de endocitosis, y así contribuir con el estudio de la respuesta de camarones ante infecciones virales.

X. LITERATURA CITADA.

- Aebi H.E. 1987. Catalase. In: Bergmeyer H.U. (ed.), *Methods of Enzymatic Analysis*, Vol. III. VCH. Germany.
- Aguirre G. & F. Ascencio. 2000. Infectious disease in shrimp species with aquaculture potential. *Recent Res Deve Microbiology*, 4(2000): 333-348.
- Aguirre-Guzmán G., R. Vázquez-Juárez, F. Ascencio. 2001. Differences in the Susceptibility of American White Shrimp Larval Substages (*Litopenaeus vannamei*) to Four *Vibrio* Species. *Journal of Invertebrate Pathology*. 78:215-219.
- A.O.A.C. (1995) *Official Methods of Analysis of the Association of Analytical Chemist*. 16th Edition. Arlington, Virginia, USA. 935p.
- Baba M., R. Snoeck, R. Pauwels, E. De Clercq. 1988. Sulfated Polysaccharides Are Potent and Selective Inhibitors of Various Enveloped Viruses, Including Herpes Simplex Virus, Cytomegalovirus, Vesicular Stomatitis Virus, and Human Immunodeficiency Virus. *Antimicrob Agents Chemother*, (1988):1742-1745
- Bachere, E. 2000. Shrimp immunity and disease control. *Aquaculture*, 191(1): 3-11.
- Bell T.A. & D.V. Lightner. 1998. *A Handbook of Normal Penaeid Shrimp Histology*. World Aquaculture Society. USA.
- Berger, C. 2000. Aportes de la Bio-Tecnología a la Alimentación y a la Inmuno-Estimulación de Camarones peneidos. In: Cruz -Suárez, L.E., Ricque-Marie,

- D., Tapia-Salazar, M., Olvera-Novoa, M.A. y Civera-Cerecedo, R., (Eds.). Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 19-22 Noviembre, 2000. Mérida, Yucatan, México.
- Boonyaratpalin S., M. Boonyaratpalin, K. Supamattaya, Y. Toride. 1995. Effects of peptidoglycan (PG) on growth, survival, immune response, and tolerance to stress in black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. In: Shariff M., Arthur J.R., Subasinghe P. (eds.) Diseases in Asian aquaculture II. Asian Fisheries Society, pp 469 – 477.
- Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein using the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- Breivik T., P.K. Opstad, R. Engstad, G. Gundersen, P. Gjermol, H. Preusl. 2005. Soluble β -1,3/1,6-glucan from yeast inhibits experimental periodontal disease in Wistar rats. *J Clin Periodontol*, 32: 347–352
- Brock J.A. & B. LeaMaster. 1992. A Look at the Principal Bacterial, Fungal and Parasitic Diseases of Farmed Shrimp. In: Wyban J. (ed.). Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming. World Aquaculture Society. USA. Pp. 212-226.
- Burgents J.E., K.G. Burnett, L.E. Burnett. 2004. Disease resistance of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, following the dietary administration of a yeast culture food supplement. *Aquaculture* 231 (2004): 1 –8.
- Campa-Córdova A.I., N.Y. Hernández-Saavedra, R. De Phillipis, F. Ascencio-Valle. 2002. Generation of superoxide anion and SOD activity in haemocytes and

- muscle of American white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) as a response to β -glucan and sulphated polysaccharide. *Fish Shellfish Immunol*, 12: 353-366.
- Chang C-F, H-Y Chen, M-S Su, I-C Liao. 2000. Immunomodulation by dietary β -1,3 glucan in the brooders of the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Fish Shellfish Immunol* 10: 505-14.
- Chang C-F., M-S. Su, H.-Y. Chen, I.-C- Liao. 2003. Dietary β -1,3-glucan effectively improves immunity and survival of *Penaeus monodon* challenged with white spot syndrome virus. *Fish Shellfish Immunol*, 15: 297-310.
- Cheng W., C.H. Liu, J.P. Hsu, J.C. Chen. 2002. Effect of hypoxia on the immune response of giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* and its susceptibility to pathogen *Enterococcus*. *Fish Shellfish Immunol*, 13: 351-365.
- Civera, R. and Guillaume, J.C. 1989. Effect of sodium phytate on growth and tissue mineralisation of *Penaeus japonicus* and *Penaeus vannamei* juveniles. *Aquaculture*, (77):145-156.
- Claydon K., B. Cullen, L. Owens. 2004. OIE white spot syndrome virus PCR gives false-positive results in *Cherax quadricarinatus*. *Dis Aquat Organ*, 62(3): 265-268.
- Cleary J.A., G.E Kelly, A.J. Husband. 1999. The effect of molecular weight and β -1,6-linkages on priming of macrophage function in mice by (1,3)- β -D-glucan. *Immunology and Cell Biology*, 77:395-403.
- Crumlish M. & V. Inglis. Improved disease resistance in *Rana rugulosa* (Daudin) after β -glucan administration. *Aquaculture Research*, 30: 431-435.

- de Siqueira S.L. 1997. Enfermedades de Camarones Peneidos: Una aproximación introductoria y bibliografía seleccionada. En: Jorge Calderón, Francisco Magallón, Edemar Andratta, Roselena Sánchez (ed.) Memorias del Taller “La Investigación Científica de Camarones Peneidos de Iberoamérica”. CYTED/Subprograma II-A: Acuicultura. CIBNOR. México. Pp. 23-32.
- Direkbunsarakom, S. & Y. Danayadol. 1998. Effect of oxygen depletion on some parameters of the immune system in black shrimp (*Penaeus monodon*). In *Advances in Shrimp Biotechnology* (T. W. Flegel, ed) pp. 147–149. Bangkok, Thailand: National Center for Genetic Engineering and Biotechnology.
- Durand S.V., K.F.J. Tang, D.V. Lightner. 2000. Frozen Commodity Shrimp: Potential Avenue for Introduction of White Spot Syndrome Virus and Yellow Head Virus. *Journal of Aquatic Animal Health*, 12:128-135.
- Espinosa G., T. Rodríguez-Ramos, J. Marrero, L. Ramos, Y. Borrell, U. Bécquer, F. Nodas, N.D. Hernández. 2002. Efectores inmunitarios como herramientas en la prevención de enfermedades en el Camarón Blanco *Litopenaeus schmitti*. I Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura. CIVA (<http://www.civa2002.org>), 765-777.
- FAO. 2003. Health management and biosecurity maintenance in white shrimp (*Penaeus vannamei*) hatcheries in Latin America. *FAO Fisheries Technical Paper*. No. 450. Rome, FAO. 64p.
- FAO. 2004. The State of World Fisheries and Aquaculture. FAO. Italy.
- Fegan D.F. & H.C. Clifford. 2001. Health Management for Viral Disease in Shrimp Farms. In: Craig L. Browdy, Daryl E. Jory (ed.), *The New Wave, Proceedings*

- of the Special Session on Sustainable Shrimp Farming. World Aquaculture Society. USA. Pp. 168-198.
- Flegel, TW. 2001. Shrimp Response to Viral Pathogens. In: Craig L. Browdy, Daryl E. Jory (ed.), *The New Wave, Proceedings of the Special Session on Sustainable Shrimp Farming*. World Aquaculture Society. USA. Pp. 254-278.
- Fotedar S., E. Tsvetnenko, L. Evans. 2001. Effect of air exposure on the immune system of the rock lobster *Panilurus cygnus*. *Mar Freshwater Res*, 52:1351-1355.
- GESAMP (IMO/FAO/UNESCO-IOC/WMO/WHO/IAEA/UN/UNEP Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Environmental Protection), 2001. Planning and management for sustainable coastal aquaculture development. Rep.Stud.GESAMP, (68): 90 p.
- Glovsky M.M., L. Cortes-Haendchen, L. Ghekiere, A. Alenty, D.L. Williams, R. Di Luzio. 1983. Effects of particulate beta-1,3 glucan on human, rat, and guinea pig complement activity. *J Reticuloendothel Soc*, 33(5):401-13.
- Goarant C., J. Herlin, R. Brizard, A.L. Marteau, C. Martin, B. Martin. 2000. Toxic factors of *Vibrio* strain pathogenic to shrimp. *Dis Aqua Organ*, 40(2):101-107.
- Goytortúa-Bores E. 2000. Evaluación del valor nutricional de un extracto lipídico y un concentrado proteínico de langostilla *Pleurocodes planipes* para el camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. Tesis de Maestría en Ciencias Pecuarias. Universidad de Colima. 88p.
- Guzmán-Murillo M.A. 1997. Efecto de Polisacáridos Sulfatados de Microalgas en Adhesión de Bacterias Patógenas a Líneas Celulares Humanas y de Peces.

- Tesis de Maestría en Ciencias en Manejo de Recursos Marinos. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas. 86p.
- Guzmán-Murillo M.A. & F. Ascencio. 2000. Anti-adhesive activity of sulphated exopolysaccharides of microalgae on attachment of red sore disease-associated bacteria and *Helicobacter pylori* to tissue culture cells. *Letters in Applied Microbiology*, 30:473-478.
- Guzmán-Murillo M.A. 2002. Estudio sobre la acción anti-adherente e inmunoestimulante de polisacáridos sulfatados de microalgas. Tesis de Doctorado en Ciencias en el uso, manejo y preservación de recursos naturales, orientación biotecnología. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. 62p.
- Harper C. 2002. Chemical Resistance of Pathogens of Aquaculture. *Aquaculture Magazine*. Jan/Feb 2002:1-2.
- Hernández-Rodríguez, A., C. Alceste-Oliviero, R. Sanchez, D. Jory, L. Vidal, L.F. Constain-Franco. 2001. Aquaculture development trends in Latin America and the Caribbean. In R.P. Subasinghe, P. Bueno, M.J. Phillips, C. Hough, S.E. McGladdery, J.R. Arthur (ed.) *Aquaculture in the Third Millennium. Technical Proceedings of the Conference on Aquaculture in the Third Millennium*. Bangkok, Thailand, 20-25 February 2000. NACA, Bangkok and FAO, Rome. Pp. 317-340.
- Hetland G, M. Lovik, H.G. Wiker. 1998. Protective effect of beta-glucan against *Mycobacterium bovis*, BCG infection in BALB/c mice. *Scand J Immunol*, 47(6):548-53.

- Hetland G., N. Ohno, I.S. Aaberge, M. Lovik. 2000. Protective effect of beta-glucan against systemic *Streptococcus pneumoniae* infection in mice. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 27(2):111-6.
- Huang C., X. Zhang, Q. Lin, X. Xu, C.L. Hew. 2002. Characterization of a novel envelope protein (VP281) of shrimp white spot syndrome virus by mass spectrometry. *Journal of General Virology*, 83: 2385-2392.
- ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses). 2005. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/index.htm>.
- Jiravanichpaisal, P. 2005. White Spot Syndrome Virus Interaction with Freshwater Crayfish. Thesis for the degree of Doctor of Philosophy. Uppsala University. 56p.
- Jung K., Y. Ha, S.-K. Ha, D.U. Han, D.-W. Kim, W.K. Moon, C. Chae. 2004. Antiviral Effect of *Sacharomyces cerevisiae* β -glucan to Swine Influenza Virus by Increased Production of Interferon- γ and Nitric Oxide. *J. Vet. Med.*, 51: 72-76.
- Jussila J., S. McBride, J. Jago, L.H. Evans. 2001. Hemolymph clotting time as an indicator of stress in western rock lobster (*Panulirus cygnus* George). *Aquaculture*, 199 (2001): 185-193.
- Kernodle DS, H. Gates, A.B. Kaiser. 1998. Prophylactic anti-infective activity of poly-[1-6]-beta-D-glucopyranosyl-[1-3]-beta-D-glucopyranose glucan in a guinea pig model of staphylococcal wound infection. *Antimicrob Agents Chemother*, 42(3):545-549.

- Kim D.K., I.K. Jang, H.C. Seo, S.O. Shin, S.Y. Yang, J.W. Kim. 2004. Shrimp protected from WSSV disease by treatment with egg yolk antibodies (IgY) against a truncated fusion protein derived from WSSV. *Aquaculture*, 237(1): 21-30.
- Koike K. 1976. Protective effect of *Schizophyllan* on *Pseudomonas aeruginosa* infection of mouse. *Jpn J Antibiot*, 29(12):1098-105.
- Lee K.-K., Y.-L. Chen, P.-C. Liu. 1999. Hemostasis of Tiger Prawn *Penaeus monodon* Affected by *Vibrio harveyi*, Extracellular Products and a Toxic Cysteine Protease. *Blood Cells, Molecules and Diseases*. 25(13):180-192.
- Le Moullac, G., Soyeux, C., Saulnier, D., Ansquer, D., Avarre, J. C. & Levy, P. 1998. Effect of hypoxia stress on the immune response and the resistance to vibriosis of the shrimp *Penaeus stylirostris*. *Fish Shellfish Immunol*, 8:621–629.
- Lightner D.V. 1996. A Handbook of Shrimp Pathology and Diagnostic Procedures for Disease of Penaeid Shrimp. World Aquaculture Society, Baton Rouge. Louisiana, USA.
- Lightner D.V. 2003. Exclusion of Specific Pathogens for Disease Prevention in a Penaeid Shrimp Biosecurity Program. In: Lee C.S., O'bryen P.J. (ed.) Biosecurity in Aquaculture Production Systems: Exclusion of Pathogens and Other Undesirables. World Aquaculture Society. USA. Pp. 81-116.
- Lightner D.V. & R.M. Redman. 1998. Shrimp diseases and current diagnostic methods. *Aquaculture*, 164(1998): 201-220.

- Lightner D.V. 2001. The Penaeid Shrimp Viruses TSV, IHHNV, WSSV, and YHV: Current Status in the Americas, Available Diagnostic Methods, and Management Strategies. In: Chhorn Lim, Carl D. Webster (ed.), Nutrition and Fish Health. Food Products Press. USA. Pp. 79-102.
- Lightner D.V & C. Pantoja. 2001. Biosecurity in Shrimp Farming. In: Maria C. Haws, Claude E. Boyd (ed.) Methods for improving shrimp farming in Central America. Central American University Press-UCA. Nicaragua. Pp. 123-168.
- Liu C.H. & J.C. Chen. 2004. Effect of ammonia on the immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus*. *Fish Shellfish Immunol*, 16: 321-334.
- Lotz J.M., J. Davidson, M.A. Soto. 2001. Two Approaches to Epidemiology in Shrimp Aquaculture Disease Control. In: Craig L. Browdy, Daryl E. Jory (ed.), The New Wave, Proceedings of the Special Session on Sustainable Shrimp Farming. World Aquaculture Society. USA. Pp. 219-225.
- Maldonado M., J. Rodríguez, I. de Blas. 2004. El camarón de cultivo frente al WSSV, su principal patógeno. *Revista AquaTIC* (21): 78-91.
- Maheshwari R. & M.U. Siddiqui. 1989. Immunoprotection by beta-1,3 glucan antigen combination in Plasmodium berghei infection in mice. *Indian J Med Res*, 89:396-403.
- McClennen C. 2004. White spot syndrome Virus: The economic, environmental and technical Implications on the development of Latin American shrimp farming. Master of Arts in Law and Diplomacy Thesis. The Fletcher School, TUFTS University. 106 p.

- McCord J.M. & I. Fridovich. 1969. Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocyte hemoglobin (hemocuprein). *J Biol Chem*, 244: 6049-6055.
- Molina C., J. Rodríguez, J.I. Arango, F. Echeverría, M. Sotomayor. 2002. Efectos combinados de las Vitaminas C y E dietéticas en la inmunorespuesta del juvenil *Litopenaeus vannamei* antes y después de la suplementación con glucanos. VI congreso ecuatoriano de acuicultura. Guayaquil, Ecuador.
- Montero A. B. & B. Austin. Characterization of extracellular products from an isolate of *Vibrio harveyi* recovered from diseased post-larval *Penaeus vannamei* (Bonne). *Journal of Fish Diseases*, 22:377-386.
- Morris-Quevedo H.J., C.E. Martínez-Manrique, R.T. Abdala-Díaz, G. Cobas-Pupo. 2000. Evidencias preliminares de la actividad inmunomoduladora de la fracción polisacárida de origen marino PC-1. *Rev Cubana Oncol*, 16(3):171-176.
- MPEDA/NACA. 2003. Shrimp Health Management Extension Manual. Prepared by the Network of Aquaculture Centres in Asia-Pacific (NACA) and Marine Products Export Development Authority (MPEDA), India, in cooperation with the Aquatic Animal Health Research Institute, Bangkok, Thailand; Siam Natural Resources Ltd., Bangkok, Thailand; and AusVet Animal Health Services, Australia. Published by the MPEDA, Cochin, India.
- Naylor R.L., R. J. Goldberg, J. H. Primavera, N. Kautsky, M.C. Beveridge, J. Clay, C. Folke, J. Lubchenco, H. Mooney, M. Troell. 2000. Effect of aquaculture on world fish supplies. *Nature*, 45: 1017-1024.

- Newman, S.G. 1999. A Review of the Use of Non Specific Immune-Stimulants to Reduce the Impact of the WSSV. Fifth Ecuadorian Aquaculture Conference. October 28-30, Ecuador.
- OIE (World Organization for Animal Health). 2003. Manual of Diagnostics Tests for Aquatic Animals. http://www.oie.int/esp/normes/fmanual/A_summry.htm.
- Ohata A., M. Usami, T. Horiuchi, K. Nagasawa, K. Kinoshita. 2003. Release of (1-3)- β -D-Glucan from Depth-type Membrane Filters and Their In Vitro Effects on Proinflammatory Cytokine Production. *Artificial Organs*. 27(8):728–735,
- Ortuño J., A. Cuesta, A. Rodríguez, M. Angeles Esteban, J. Meseguer. 2002. Oral administration of yeast. *Saccharomyces cerevisiae*, enhances the cellular innate immune response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 85:4150.
- Pedroso M. 1994. Application of beta-1,3-glucan to prevent shipping fever in imported heifers. *Arch Med Res*, 25(2):181.
- Perspectivas, 2005. The Return of a Giant: Ecuador recovers from the White Spot crisis. *Panorama Acuicola Magazine*, 10(5): 34-40.
- Plumb J.A. 2001. Overview of Warm – Water Fish Diseases. In: Chhorn Lim, Carl D. Webster (ed.), Nutrition and Fish Health. Food Products Press. USA. Pp. 1-10.
- Prior S., C.L. Browdy, E.F. Shepard, R. Laramore, P.G. Parnell. 2003. Controlled bioassay systems for determination of lethal infective doses of tissue homogenates containing Taura syndrome or white spot syndrome virus. *Dis Aquat Organ*, 54(2): 89-96.

- Raa, J. 1996. The Use of Immunostimulatory Substances in Fish and Shellfish Farming. *Reviews in Fishery Science* 4(3):229-288.
- Raa, J., 2000. The use of immune-stimulants in fish and shellfish feeds. In: Cruz - Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Olvera-Novoa, M.A. y Civera-Cerecedo, R., (Eds.). *Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. 19-22 Noviembre, 2000. Mérida, Yucatan, México.
- Rodríguez J. & G. Le Moullac. 2000. State of the art of immunological tools and health control of penaeid shrimp. *Aquaculture* 191(2000): 109-119.
- Roux M.M., A. Pain, K.R. Klimpel, A.K. Dhar. 2002. The Lipopolysaccharide and β -1,3-Glucan Binding Protein Gene Is Upregulated in White Spot Virus-Infected Shrimp (*Penaeus stylirostris*). *Journal of Virology*, (2002): 7140–7149.
- SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación). 2003. Anuario estadístico de Pesca 2003.
- Sangamaheswaran A.P. & M.J.P. Jeyaseelan. 2001. White Spot Viral Disease in Penaeid Shrimp – A Review. *Naga, The ICLARM Quarterly*, 24(3-4): 16-22.
- Saulnier D., J.C. Avarre, G. Le Mullac, D. Ansquer, P. Levy, V. Vonau. 2000a. Rapid and sensitive PCR detection of *Vibrio penaeicida*, the putative etiological agent of Syndrome 93 in New Caledonia. *Dis Aquat Organ*, 40(2): 109 – 115.

- Saulnier D., H. Phillipe, C. Goarant, P. Levy, D. Ansquer. 2000b. Experimental infection models for shrimp vibriosis studies: a review. *Aquaculture*, 191(2000): 133-144.
- Scholz U., G. García-Díaz, D. Ricque, L.E. Cruz-Suarez, F. Vargas-Albores, J. Latchford. 1999. Enhancement of Vibriosis resistance in juvenile *Penaeus vannamei* with supplementation of diets with different yeast products. *Aquaculture* 176(1999): 271 – 283.
- Smith V.J., J.H. Brown, C. Hauton. 2003. Immunostimulation in crustaceans: does it really protect against infection. *Fish Shellfish Immunol*, 15: 71-90.
- Song Y.L. & Y.T. Hsieh. 1994. Immunostimulation of tiger shrimp (*Penaeus monodon*) hemocytes for generation of microbial substances: analysis of reactive oxygen species. *Dev Comp Immunol*, 18 (3): 201-209.
- Song Y.L., J.J. Liu, L.C. Chan, H.H. Sung. 1997. Glucan-induced disease resistance in tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Dev Biol Stand*, 90:413-21.
- Song Y.L., C.I Yu, T.W. Lien, C.C. Huang, M.N. Lin. 2003. Haemolymph parameters of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) infected with Taura Syndrome Virus. *Fish Shellfish Immunol*, 14: 317-331.
- Soto M.A. & J. M. Lotz. 2001. Epidemiological Parameters of White Spot Syndrome Virus Infections in *Litopenaeus vannamei* and *L. setiferus*. *J Invertebr Pathol*, 78:9-15.
- Sritunyalucksana K., W. Gangnonngiw, S. Archakunakorn, D. Fegan, T.W. Flegel. 2005. Bacterial clearance rate and a new differential hemocyte staining method to assess immunostimulant activity in shrimp. *Dis Aquat Organ*, 63(1):89-94.

- Subasinghe R.P., D.M. Bartley, S. McGladdery, U. Barg. 1998. Sustainable shrimp culture development: Biotechnological uses and challenges. In: Flegel, T.W. (ed). *Advances in shrimp biotechnology*. BIOTEC. Thailand. Pp. 13-18.
- Sung H-H., Y.L. Yang, Y.L. Song. 1996. Enhancement of microbial activity in the tiger shrimp, *Penaeus monodon*, via immunostimulation. *Journal of Crustacean Biology*, 16:278-284.
- Tang K.F.J. & D.V. Lightner. 2000. Quantification of white spot syndrome virus DNA through a competitive polymerase chain reaction. *Aquaculture*, 189(1): 11-21.
- Takahasi, Y., Uehara, K., Watanabe, R., Okumura, T., Yamashita, T., Omura, H., Yomo, T., Kawano, T., Kanemitsu, A., Narasaka, H., Suzuki, N., and Itami, T. 1998. Efficacy of Oral Administration of Fucoidan, a Sulfated Polysaccharide, in Controlling White Spot Syndrome in Kumura Shrimp in Japan. In Flegel TW (ed) *Advances in Shrimp Biotechnology*. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology. Bangkok. p. 171-173.
- Takaki Y., N. Seki, S.-I. Kawabata, S. Iwanaga, T. Muta. 2002. Duplicated Binding Sites for (1-3)- β -D-Glucan in the Horseshoe Crab Coagulation Factor G. *The Journal of Biological Chemistry*, 277 (16):14281–14287.
- Tzianabos A.O., F.C. Gibson, R.L. Cisneros, D.L. Kasper. 1998. Protection against experimental intraabdominal sepsis by two polysaccharide immunomodulators. *J Infect Dis*, 178(1):200-6.
- van de Braak C.B.T. 2002. Haemocytic defence in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). Thesis for the degree of Doctor of Philosophy. Wageningen University. 159p.

- van Hulten M.C.W., J.Witteveldt, S. Peters, N. Kloosterboer, R. Tarchini, M. Fiers, H. Sandbrink, R.K. Lankhorst, J. M. Vlak. 2001. The White Spot Syndrome Virus DNA Genome Sequence. *Virology*, 286: 7-22.
- Vanpatten K.A., L.M. Nunan, D.V. Lightner. 2004. Seabirds as potential vectors of penaeid shrimp viruses and the development of a surrogate laboratory model utilizing domestic chickens. *Aquaculture*, 241(1): 31–46.
- Vargas-Albores F.D., M.A. Guzmán-Murillo, J.L. Ochoa-Ochoa. 1993. An anticoagulant solution for haemolymph collection and prophenoloxidase studies of penaeid shrimp (*Penaeus californiensis*). *Comp Biochem Phys*, 106A (2): 299-303.
- Venegas, C. A., L. Nonaka, K. Mushiake, T. Nishizawa, and K. Murog. 2000. Quasi-immune response of *Penaeus japonicus* to penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV). *Dis Aquat. Org*, 42(2):83–89.
- Venkateswara-Rao G., A. Ravi-Kumar, K.R.S. Sambasiva-Rao. 2003. Early diagnosis of white spot viral syndrome using rapid gill staining technique. *Current Science*, 85(6): 729-730.
- Vici V., B. Singh, S.G. Bhat. 2000. Application of bacterins and yeast *Acremonium dyosporii* to protect the larvae of *Macrobrachium rosenbergii* from Vibriosis. *Fish Shellfish Immunol*, 10:559-563.
- Williams D.L., E.R. Sherwood, I.W. Browder, R.B. McNamee, E.L. Jones, J. Rakinic, N.R. Di Luzio. 1988. Effect of glucan on neutrophil dynamics and immune function in *Escherichia coli* peritonitis. *J Surg Res*, 44(1):54-61.

Williams D.L., R.G. Yaeger, H.A. Pretus, I.W. Browder, R.B. McNamee, E.L. Jones. 1989. Immunization against *Trypanosoma cruzi*: adjuvant effect of glucan. *Int J Immunopharmacol*, 11(4):403- 10.

Wu J.L., T. Nishioka, K. Mori, T. Nichizawa, K. Muroga. 2002. A time-course study on the resistance of *Penaeus japonicus* induced by artificial infection with white spot syndrome virus. *Fish Shellfish Immunol*, 12(2002): 391-403.