

Research Article

Optimización de la supervivencia y respuesta inmune de *Litopenaeus vannamei* alimentado con dietas ricas en carotenos e infectado con el Síndrome de Mancha Blanca

José Antonio López-Elías¹, Diana Medina-Félix², Ángel Isidro Campa-Córdova²
Luis Rafael Martínez-Córdova¹, Jorge Hernández-López³
José Fernando Mendoza-Cano³ & Martha Elisa Rivas-Vega⁴

¹Universidad de Sonora, Hermosillo, Sonora, México

²CIBNOR, La Paz, Baja California, México

³CIBNOR, Hermosillo, Sonora, México

⁴Universidad Estatal de Sonora, Unidad Académica Navojoa, Hermosillo, México

Corresponding author: Diana Medina-Félix (dfelix@pg.cibnor.mx)

RESUMEN. El virus del síndrome de mancha blanca (WSSV) es un virus con capacidad de réplica muy rápida y es extremadamente virulento, produciendo un impacto negativo en los cultivos de *Litopenaeus vannamei* donde provoca mortalidades de 80 a 100%. La inmunoestimulación se proyecta como una alternativa para disminuir este impacto. Bajo condiciones de estrés *Dunaliella* sp. es capaz de producir altas cantidades de carotenos, que tienen actividad antioxidante, desactivando radicales libres en los organismos y mejorando la respuesta ante una infección. Se realizó un experimento para evaluar la actividad de lisozimas, aglutinina, α -2-macroglobulina (A2M), fenoloxidasa (FO) y profenoloxidasa (PFO) en el camarón blanco, alimentado con dietas con 1 y 2% de *Dunaliella* sp. e infectados con WSSV. Los resultados mostraron que algunos componentes de la respuesta inmune como la actividad de lisozima, aglutinina, fenoloxidasa y profenoloxidasa, así como la resistencia a infecciones experimentales con WSSV en juveniles de *L. vannamei* fueron mejoradas por la adición de carotenos.

Palabras clave: *Litopenaeus vannamei*, *Dunaliella* sp., antioxidantes, respuesta inmune, WSSV, acuicultura.

Improvement of survival and immune response in *Litopenaeus vannamei* infected with White Spot Syndrome Virus and fed diets enriched with carotene

ABSTRACT. The white spot syndrome virus (WSSV) has the capacity to replicate quickly and is extremely virulent, producing a great negative impact in the farming of *Litopenaeus vannamei*, because the massive mortalities (80 to 100%) it may provoke. The immune stimulation is considered a viable alternative to diminish that impact. Under stress conditions, *Dunaliella* sp. is capable to produce large amounts of carotenoids, these compounds have antioxidant activity by reducing the free radicals and improving the response of the consumers to face infections. An experimental study was conducted to evaluate the activity of lysozymes, agglutinins, α -2-macroglobulin (A2M), phenoloxidase (PO), pro-phenoloxidase (PPO) in white shrimp fed diets containing 1 and 2% of carotenoids from *Dunaliella* sp. and infected with WSSV. The results showed that some components of the immune response as lysozymes, agglutinins, phenoloxidase and pro-phenoloxidase, and the resistance of shrimp to experimental infections with *Vibrio parahaemolyticus*, were improved by the inclusion of the carotenoids.

Keywords: *Litopenaeus vannamei*, *Dunaliella* sp., antioxidants, immune response, WSSV, aquaculture.

INTRODUCCIÓN

El virus de mancha blanca o WSSV (por sus siglas en inglés) es el virus de mayor virulencia reportado en la

industria camaronícola (Wu *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2007; Jiang, 2011). Los organismos infectados presentan manchas blancas de 0,5-3 mm de diámetro en el exoesqueleto, letargo, coloración rojiza en urópodos,

telson, pereiópodos y pleópodos, con mortalidades masivas en los primeros 30 días de cultivo (Sánchez-Paz, 2010). WSSV fue reportado por primera vez en México en 1999, afectando al estado de Sonora, donde en 2010 se determinaron pérdidas económicas importantes y en el año 2013 con la llegada del síndrome de la muerte temprana (EMS) se perdió el 50% de la producción total de camarón (COAES, 2013). WSSV posee la capacidad para infectar al menos 93 especies, en su mayoría crustáceos decápodos (Andrade, 2011; Jiang, 2011; MaBadhul *et al.*, 2012). Además, es difícil de controlar ya que se transmite de manera horizontal y vertical (Liu *et al.*, 2007).

Los camarones peneidos poseen un sistema inmune innato que los protege de microorganismos dañinos (Li & Xiang, 2013), presentar dos tipos de respuesta: celular y humoral, actuando en conjunto para eliminar agentes patógenos (Rendón & Balcázar, 2003). Este sistema inmune sin capacidad de memoria, está mediado por los hemocitos que poseen capacidad citotóxica y comunicación intercelular que le facilita las funciones de: reconocimiento, coagulación, fagocitosis, melanización, formación de nódulos y encapsulación, así mismo, los camarones cuentan también con la presencia de varios componentes plasmáticos, como un sistema profenoloxidasa y la cascada de coagulación que favorece la destrucción de agentes patógenos (Vargas-Albores *et al.*, 1998; Yeh *et al.*, 2009; Campa-Córdova *et al.*, 2010; Fagutao *et al.*, 2011). Actualmente, el interés en la prevención de enfermedades a través de la inmunoestimulación ha aumentado para hacer frente a los problemas virales, ya que los compuestos inmunoestimulantes alertan al sistema inmune innato de los organismos provocando una respuesta (Rendón & Balcázar, 2003). La ventaja de los inmunoestimulantes radica en que no generan resistencias ni habituación (Berger, 2000), por lo que no retardan el crecimiento y pueden usarse en forma continua, facilitando su dosificación en las dietas.

En crustáceos, los carotenoides actúan como antioxidantes y precursores de la vitamina A, además, incrementan la resistencia a enfermedades, mejoran su tasa de reproducción y aumentan la ganancia de peso (Tapia-Salazar *et al.*, 2008). Dentro de los carotenoides, los β -carotenos son los de mayor importancia, por encontrarse en mayor cantidad y son utilizados en la acuicultura como pigmentos, antioxidantes y fuente de vitamina A (Pisal & Lele, 2005; Del Campo *et al.*, 2007). Los β -carotenos son acumulados y almacenados dentro de los cloroplastos en *Dunaliella* sp. cuando es cultivada con deficiencia de nitrógeno y es el pigmento responsable de su coloración (Oren, 2005; Fimbres-Olivarría, 2011). El uso de β -carotenos en la dieta incrementan la resistencia del camarón blanco

Litopenaus vannamei (Boone, 1931) a infecciones experimentales con WSSV (Medina-Félix *et al.* 2014). Además, la adición de carotenos a la dieta mejora los parámetros de producción y la pigmentación de *L. vannamei* y de camarón azul *Litopenaeus stylirostris* (Stimpson, 1874) (Martínez-Córdova *et al.*, 2002). Por lo anterior, el objetivo del presente estudio fue evaluar la respuesta del sistema inmune de *Litopenaeus vannamei* alimentado con dietas ricas en *Dunaliella* sp. con altas concentraciones de β -caroteno frente a una infección con el Virus de Mancha Blanca.

MATERIALES Y MÉTODOS

Dunaliella sp. se obtuvo del cepario del Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora, donde se utilizó el medio F/8 para su cultivo (medio basado en el medio F/2 de Guillard & Ryther, 1962); que contiene una reducción en la cantidad de nitratos de 75%. *Dunaliella* sp. creció en un sistema escalonado, empezando con tubo de ensayo de 10 mL, pasando a matraz de 250 mL, posteriormente a matraz de 1 L y finalmente a recipientes de 20 L. Una vez obtenida la concentración celular por mililitro máxima se cosechó el cultivo para su floculación con 0,15 g L⁻¹ de sulfato de aluminio, obtenido el concentrado de *Dunaliella* sp. se ultracongeló a -80°C para su liofilización con el Telstar LyoQuest® y obtener la harina de *Dunaliella* sp.

Para conocer la concentración de β -carotenos en *Dunaliella* sp. se pesaron 0,03 g de harina y se añadieron 10 mL de acetona al 90%. Esta mezcla se mantuvo por 24 h en la oscuridad para medirla por espectrofotometría a 453 nm (CARY 100 BIO® espectrofotómetro UV-visible), utilizando una curva de β -caroteno como estándar (5,3 mg de β -caroteno en 25 mL). Con este procedimiento se ajustó una concentración de 0,42 mg mL⁻¹ de β -caroteno en la microalga.

La dieta control y las dietas con el 1 y 2% de *Dunaliella* sp. se elaboraron con los ingredientes indicados en la Tabla 1. Estos nutrimentos se mezclaron y pasaron en un extrusor de alimento (Torrey®, modelo JR), pasando por la criba Torrey® CI-12-1/8 para hacer el pellet, después se secó en el horno a 45°C por 24 h.

Diseño experimental

Se utilizaron juveniles de *Litopenaeus vannamei* con un peso promedio de 6 g provenientes de la granja acuícola Ojai, ubicada en Bahía de Kino, Sonora, México (27°53'59.58"N, 110°37'3.67"W). Se evaluaron los siguientes tratamientos incluidos en el alimento: a) 1% de biomasa de *Dunaliella* sp. (T1), b) 2% de *Dunaliella* sp. (T2), c) control (camarones sin alimentación con

Tabla 1. Ingredientes del alimento utilizado en los experimentos en g kg⁻¹ (Medina-Félix *et al.*, 2014).

Ingrediente	Control	1%	2%
Harina integral de trigo	423	423	423
Pasta de soya	199	194	189
Harina de sardina	260	255	250
Harina de microalga	0	10	20
Aceite de pescado	40	40	40
Lecitina de soya	15	15	15
Alginato de sodio	20	20	20
Premezcla de vitaminas	18	18	18
Fosfato bibásico de sodio	12	12	12
Colesterol	5	5	5
Premezcla de minerales	5	5	5
Cloruro de colina 62%	2	2	2
Vitamina C 35%	0,9	0,9	0,9
BHT (Butilhidroxitolueno)	0,04	0,04	0,04

Dunaliella sp. infectados con WSSV), d) blanco (camarones sin alimentaciones con *Dunaliella* sp. y sin infección con WSSV), cada uno de los tratamientos fue realizado por triplicado, usando acuarios de 40 L con 20 L de agua de mar (salinidad de 35) donde se colocaron 2 camarones/L, con temperatura controlada de 28-29°C., aireación continua y recambio del 60% de agua cada tres días. Los organismos se alimentaron con las dietas experimentales con base al 5% de su biomasa con dos raciones diarias durante 30 días previos a la infección con WSSV. Los organismos se infectaron por alimentación forzada utilizando una jeringa para insulina de 27 G x 37 mm y una sonda de venoclis de 22 G x 32 mm se administraron 100 µL de inóculo de WSSV. Las muestras de hemolinfa se recolectaron del quinto par de pereopodos con una jeringa para insulina (27 G x 37 mm) a las 0, 24, 48, 72, 120 y 144 h post-infección (hpi).

Para confirmar la ausencia del virus previo a la infección de *L. vannamei*, se efectuó un análisis por qPCR, utilizando la sonda VP28 del virus WSSV, según Moser *et al.* (2012), mediante el kit iQ™ SYBER® GREEN Supermix y el par de primers VP28F. 5'-CTGCTGTGATTGCTGTATTT y VP28R 5'-CAGT GCCAGAGTAGGTGAC. Las condiciones de amplificación y detección del gen de WSSV (Medina-Félix *et al.*, 2014).

El inóculo obtenido de camarones infectados con WSSV, tomando porciones de músculo y macerando en solución salina a una relación 1:6, el macerado se centrifugó a 9000 G/5 min y el sobrenadante se filtró con una membrana de 0,2 micras y se almacenó a -80°C.

Determinación de actividad del sistema inmune

Lisozima

Se colocaron 50 µL de hemolinfa en una microplaca y se agregaron 150 µL de suspensión de *Micrococcus* sp. (Sigma, 5 mg mL⁻¹ en solución de fosfatos 0,05 M, pH 7,0) leyendo a una absorbancia de 405 nm (Abs. de muestra a 1h). Se incubó por 1 hora a 37°C y se leyó nuevamente (Abs. de muestra a 0 h). Cálculos: Abs. muestra 1 h - Abs. muestra 0 h = lisis.

Agglutinación de hemocitos de camarón

Se utilizaron 25 µL de suspensión de eritrocitos humanos al 2% fueron colocados en ocho pozos de una microplaca, añadiendo 25 µL de plasma de camarón. En el pozo número 1, se mezcló y se tomaron 25 µL de la mezcla para pasarse al pozo 2, donde se mezcló y repitió para el pozo 3 hasta llegar al pozo 7. En el pozo 8 se agregaron 25 µL de solución salina estéril (0,85%) como blanco, se incubó por 1 h y se leyó aglutinación según dilución. La aglutinación de hemocitos de camarón se midió en concentración de aglutinina/mg mL⁻¹ de proteína.

Actividad de α-2-macroglobulina (A2M)

Se colocaron 10 µL de hemocitos en una microplaca y 10 µL de solución de tripsina (1 mg mL⁻¹) incubando por 10 min a 37°C, luego se agregaron 120 µL de inhibidor de tripsina (2 mg mL⁻¹) y se incubó la mezcla por 10 min a 37°C. Posteriormente, se adicionaron 100 µL del sustrato BAPNA (*N*α-benzoyl-L-arginine 4-nitroanilide hydrochloride) (1 mg mL⁻¹) para volver a incubar por 1 h y leer absorbancia a 415 nm. La actividad específica de A2M fue calculada aplicando la siguiente fórmula:

- A- 2- M = absorbancia x factor de dilución/tiempo de incubación.

- Factor de dilución = (Abs. muestra/Abs. estándar) x concentración estándar

Actividad específica de fenoloxidasa (FO)

Se colocaron 10 µL de plasma de camarón en una microplaca y 250 µL de L-DOPA (3 mg mL⁻¹), se incubó la mezcla por 20 min para leer a 490 nm. Los valores de absorbancia obtenidos se normalizan con los valores de proteína.

Actividad específica de profenoloxidasa (PFO)

Se agregó 10 µL de plasma de camarón en una microplaca más 10 µL de tripsina y 250 µL de L-DOPA (3 mg mL⁻¹), se dejaron incubar por 20 min y se leyó la absorbancia a 490 nm. Los valores obtenidos se normalizaron con los valores de proteína. Para la medi-

ción de proteína se centrifugó la hemolinfa a 9000 G/5 min y se separó el plasma. Se colocó 10 µL de plasma en una microplaca más 250 µL de reactivo Randox® para proteína y se leyó a 550 nm en el lector Synergy (Bio-Tek Instruments) (Sánchez-Paz *et al.*, 2007).

Análisis estadístico

Se realizó un análisis de ANOVA de dos vías y pruebas de Tukey para la actividad del sistema inmune, los resultados de la actividad del sistema inmune fueron normalizados con los resultados de proteína.

RESULTADOS

Supervivencia

La supervivencia mayor se encontró en la dieta con 1% de *Dunaliella* sp., seguida de la dieta con 2%, ambas sobre el 80%; mientras que el tratamiento control (infectado) presentó un 56% de supervivencia. No se registró mortalidad en el tratamiento blanco (sin infección) (Tabla 2).

Actividad de lisozima

Al comparar entre tratamientos no se encontraron diferencias significativas (Tabla 3). Sin embargo, se observó que los camarones alimentados con 1% de *Dunaliella* sp. (T1), incrementaron significativamente la actividad de lisozima en el plasma a las 24 y 72 hpi (horas post-infección) (Fig. 1a). En el control se observó una mayor actividad de lisozima. Algunas variaciones se encontraron a través del tiempo post-infección (Fig. 1), observándose que los niveles se mantuvieron fluctuantes y después de 120 hpi no se encontró actividad de lisozima.

Aglutinación de hemocitos de camarón

Entre tratamientos no se encontraron diferencias estadísticas significativas ($P > 0,05$) con relación a la aglutinación de hemocitos, observándose aglutinaciones ligeramente mayores en el tratamiento con 1%

de *Dunaliella* sp. (Tabla 3). En la figura 1b se muestra la actividad de aglutinina, registrándose tres incrementos a 0, 24 y 144 hpi en los camarones alimentados previamente con 1% de *Dunaliella* sp. contenida en el alimento. Los camarones alimentados con 2% de *Dunaliella* sp. incrementaron su actividad aglutinante a 0, 24 y 48 hpi con respecto a los demás tratamientos, mientras que el control registró un incremento a las 0 y 48 hpi respecto al blanco.

Actividad específica de α -2-macroglobulina (A2M)

En la actividad de A2M (Fig. 1c) se observó un incremento a las 24 hpi en el tratamiento con 2% *Dunaliella* sp. comparado con los demás tratamientos. A las 72 h se registró un incremento de actividad A2M en los camarones alimentados con 1% de *Dunaliella* sp. y a las 120 hpi en los camarones alimentados con 2% *Dunaliella* sp., mientras que a las 144 h se registraron valores basales en todos los tratamientos. Se observó para todos los tratamientos, a excepción del blanco a las 24 hpi, que el valor de A2M aumentó hasta siete veces con relación al valor inicial (antes de la infección).

Actividad específica de fenoloxidasa (FO)

La actividad fenoloxidasa se incrementó significativamente en juveniles alimentados con 2% *Dunaliella* sp. a las 24 y 48 hpi respecto al blanco, alcanzando valores basales a las 144 hpi. Los camarones alimentados con 1% registraron un ligero incremento en la actividad de FO a las 72 hpi. Después de una disminución registrada en el control a las 0 h, se observaron dos incrementos en la actividad enzimática a las 24 y 72 hpi (Fig. 1d).

Actividad específica de profenoloxidasa (PFO)

En la actividad específica de profenoloxidasa, se observó un incremento a las 120 hpi en los camarones alimentados con la dieta al 2% de *Dunaliella* sp. y control con respecto al blanco. Así mismo, los camarones del grupo control (infectado) presentaron valores elevados comparados con los otros tratamientos a 24, 48 y 120 hpi (Fig. 1e).

Tabla 2. Porcentaje de sobrevivencia en los diferentes tratamientos. hpi: horas post-infección.

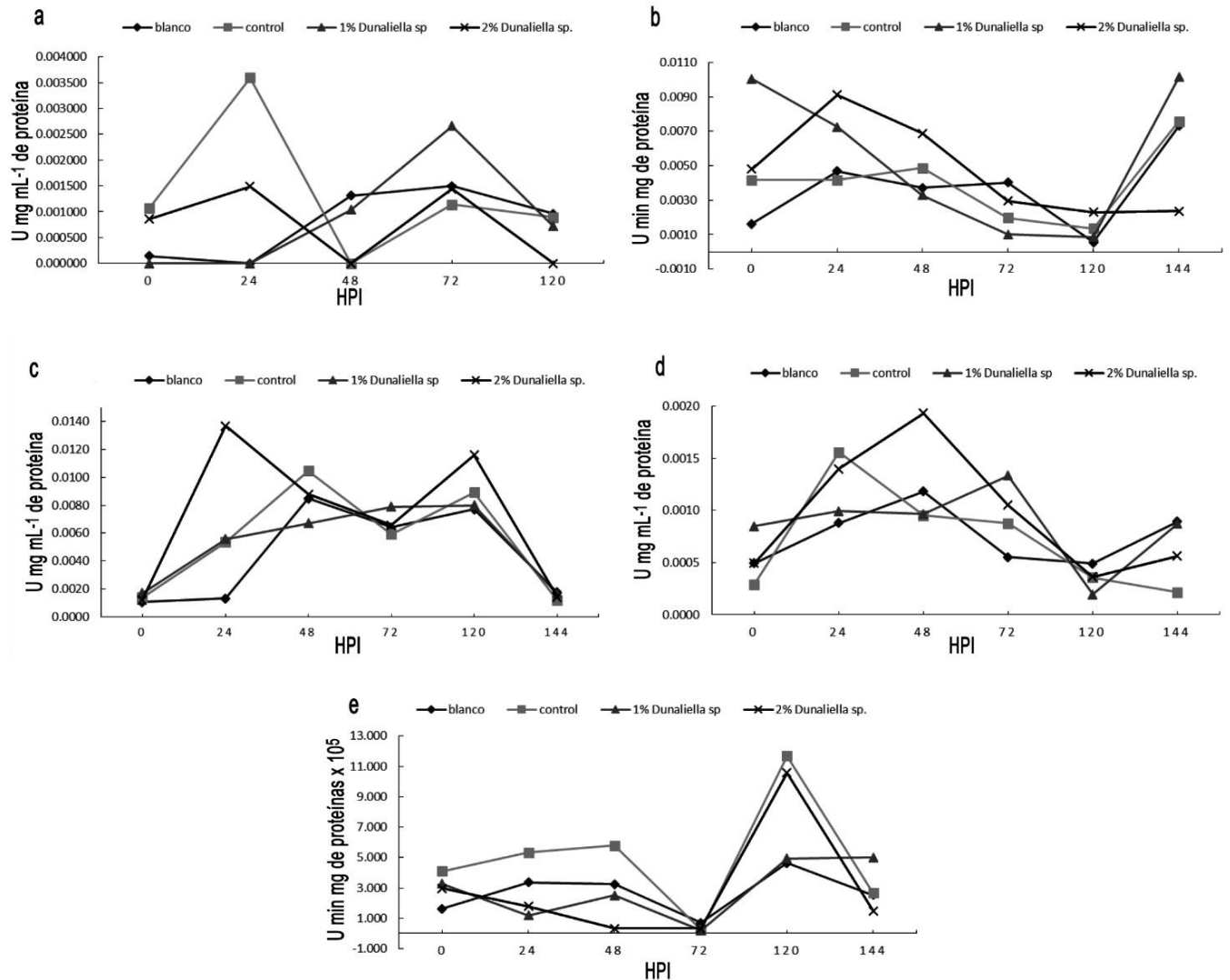
Tratamiento	Sobrevivencia (%)
	144 hpi
Blanco (sin infección)	100
Control (infectado)	56
Dieta con 1% de <i>Dunaliella</i> sp.	83
Dieta con 2% de <i>Dunaliella</i> sp.	81

DISCUSIÓN

Es evidente que la administración de una dieta rica en carotenoides tiene un efecto protector en los camarones con una mejora en el crecimiento, reducción en la tasa de mortalidad y mejor rendimiento, por lo tanto la administración de carotenoides es esencial para el bienestar del cultivo (Arredondo-Figueroa *et al.*, 2013).

Tabla 3. Actividad específica y desviación estándar de componentes del sistema inmune en *Litopenaeus vannamei* en los tratamientos y control.

Tratamiento	Aglutinina	Fenoloxidasa	Profenoloxidasa	Tripsina	α -2-Macroglobulina	Lisozimas
Blanco	0,00365 ^A (0,00132)	0,00074 ^A (0,00019)	0,09687 ^A (0,01765)	0,00638 ^A (0,00138)	0,00444 ^A (0,00102)	0,00079 ^A (0,00027)
Control	0,00391 ^A (0,00097)	0,00071 ^A (0,00014)	0,06592 ^A (0,01458)	0,00792 ^A (0,00101)	0,00554 ^A (0,00074)	0,00140 ^A (0,00021)
1%	0,00534 ^A (0,00081)	0,00086 ^A (0,00011)	0,07209 ^A (0,01338)	0,00744 ^A (0,00084)	0,00527 ^A (0,00061)	0,00125 ^A (0,00022)
2%	0,00487 ^A (0,00077)	0,00096 ^A (0,00011)	0,08350 ^A (0,01359)	0,00974 ^A (0,00080)	0,00723 ^A (0,00059)	0,00077 ^A (0,00023)

**Figura 1.** Comportamiento de la respuesta inmune en *Litopenaeus vannamei* por día y por tratamiento. a) Lisozimas, b) aglutinina, c) α -2-macroglobulina (A2M), d) fenoloxidasa (FO), e) profenoloxidasa (PFO). HPI: Horas post-infección.

En estudios realizados por Medina-Félix *et al.* (2014) se encontró que cuando se aplica una dieta rica en antioxidantes se obtiene una respuesta favorable por parte del camarón blanco aumentando su supervivencia en un 80%.

La lisozima en los crustáceos es un componente fundamental para el sistema inmune, ya que actúa en la respuesta de defensa contra una amplia variedad de patógenos (De la Re-Vega *et al.*, 2004). Aunque no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos, se observaron fluctuaciones constantes en la actividad de lisozimas a lo largo de la infección con WSSV, Mai & Wang (2010) realizaron un estudio para determinar la acción de las lisozimas en el sistema inmune innato de *L. stylirostris* y encontraron que cuando se inyecta intramuscularmente 8 µg de lisozim a camarones e infectados con WSSV, aumenta la supervivencia al virus del 70 al 80%.

La aglutinina conocida como LPSBP (LPS Binding Protein), es una proteína cuya importancia radica en su capacidad de aglutinar bacterias y unirse a los hemocitos para estimular la fagocitosis, así mismo, de lisar a los hemocitos activando el sistema profenoloxidasa y de coagulación (Vargas *et al.*, 1996; Rendón & Balcázar, 2003). Sritunyalucksana *et al.* (1999), infectaron hemocitos de *Penaeus monodon* (Fabricius, 1798) con YHV (virus de cabeza amarilla) y detectaron una disminución de la actividad de aglutinación en los hemocitos durante de la infección, siendo concordante con lo encontrado en este trabajo.

La A2M funciona como inhibidor de proteasas, al actuar como opsonina para marcar y unirse a las proteasas, formando un complejo llamado α -2-macroglobulina-proteasa, de tal manera que permite su endocitosis y degradación proteolítica (Armstrong, 2010; Figueroa-Pizano, 2013). Estas proteasas, participan en el sistema profenoloxidasa, que ayuda a regular la producción de especies reactivas de oxígeno que se generan por la oxidación de fenoles. Por lo tanto, cuando la A2M disminuye, produce un desbalance en el sistema profenoloxidasa, provocando una producción excesiva de radicales libres. Estas características permiten a la A2M jugar un papel importante en la defensa inmune de los camarones, ya que es una proteína capaz de unirse y neutralizar diversas gamas de proteasas que funcionan como factores de virulencia (Armstrong, 2010). Además, juega un papel esencial en el sistema profenoloxidasa, ya que al ser activada a su forma fenoloxidasa por la serina proteasa, la A2M y los inhibidores de tripsina que se encuentran fuera de los hemocitos en el plasma, eliminan a la serina activando el sistema profenoloxidasa (Sung *et al.*, 1998). Figueroa-Pizano (2013) reportó para el camarón blanco infectado con BNHP (Bacteria de la necrosis hepato-

pancreática) una disminución en los valores de A2M conforme avanzó la infección, lo cual fue similar a lo encontrado en esta investigación.

La FO se encuentra inactiva en el interior de los gránulos de los hemocitos en forma de profenoloxidasa (PFO) y es liberada en presencia de un antígeno para ser activada con la ayuda de calcio (Figueroa-Pizano, 2013), siendo esta la enzima terminal del sistema profenoloxidasa (Sung *et al.*, 1998; Sarathi *et al.*, 2007), sin embargo, el mecanismo de activación del sistema PFO se desconoce (Sarathi *et al.*, 2007). Subashini *et al.* (2012) evaluaron la eficiencia de una bacteria del género *Vibrio* como inmunoestimulante en *Marsupenaeus japonicus* (Bate, 1888) en contra de WSSV y encontraron mayor actividad de PFO en los tratamientos con bacteria que en los tratamientos control, lo que indicó la acción de la PFO en presencia del virus. Sarathi *et al.* (2007) observaron en las primeras 48 hpi. un aumento en la actividad de PFO en *Fenneropenaeus indicus* (Milne-Edwards, 1837) infectados con WSSV, comparados con el grupo control a las 72 hpi. En este trabajo el aumento en la PFO podría atribuirse a la estimulación de los carotenos provistos por las dietas.

La FO es la enzima más importante y reconocida del proceso de melanización que se da en los camarones como un sistema de defensa. Figueroa-Pizano (2013) encontró que organismos infectados con BNHP tienen menor actividad que el control negativo, pero en los días después de la infección empieza a disminuir. La FO produce hidroxilación de fenoles y oxidación de o-fenoles a quinonas, necesarios para la melanización (Andrade, 2011). Sarathi *et al.* (2007) encontraron estimulación del sistema inmune generado por *Vibrio alginolyticus* (Miyamoto *et al.*, 1961) lo que provocó un aumento en la actividad de FO. Niveles elevados de FO surgen como un ineficiente mecanismo de compensación por mantener la resistencia a la infección, esta podría ser la razón por la cual aumentó la concentración de FO en el presente trabajo.

CONCLUSIONES

La inclusión de *Dunaliella* sp. a la dieta de *L. vannamei* tiene un efecto positivo en la supervivencia, con un 83% en los camarones alimentados durante 30 días con 1% de microalga, 81% en los juveniles alimentados con 2% y el grupo control (no tratado e infectado) con el 56%. La actividad del sistema inmune de *L. vannamei* se activó por la inclusión de dos concentraciones de *Dunaliella* sp. en el alimento de camarones, obteniendo incrementos significativos previo a la infección en la actividad enzimática de lisozima, aglutinina y fenoloxidasa. Durante la infección, se incrementó signifi-

cativamente respecto al grupo blanco (no tratado ni infectado), la actividad de lisozima, aglutinina, α -2-macroglobulina y fenoloxidasas en los camarones alimentados con 1% de la microalga. Los juveniles alimentados con 2% de *Dunaliella* sp. registraron incrementos significativos respecto al grupo control en la actividad de lisozima, aglutinina, fenoloxidasas y profenoloxidasas. El presente estudio mostró que la inclusión del *Dunaliella* sp. en el alimento al 1 o 2%, mejoró la respuesta del sistema inmune y la resistencia a infecciones experimentales con WSSV en juveniles de camarón blanco.

REFERENCIAS

- Andrade, A.J. 2011. Shrimp immunological reactions against WSSV: role of haemocytes on WSSV fate. Tesis de maestría. Universidad de Gante, Bélgica, 60 pp.
- Armstrong, P.B. 2010. Role of α -2-macroglobulin in the immune responses of invertebrates. *Invertebr. Surviv. J.*, 7: 165-180.
- Arredondo-Figueroa, J., R. Pedroza-Islas, J. Ponce-Palafox & E.J. Vernon-Carter. 2003. Pigmentación del camarón blanco del Pacífico (*Litopenaeus vannamei*, Boone 1931) con carotenoides de Chile (*Capsicum annuum*), esterificados y saponificados, en comparación con la astaxantina. *Rev. Mex. Ing. Quím.*, 2: 101-108.
- Berger, C. 2000. Aportes de la bio-tecnología a la alimentación y a la inmuno-estimulación de camarones peneidos. In: L.E. Cruz-Suárez, D. Ricque-Marie, M. Tapia-Salazar, M.A. Olvera-Novoa & R. Civera-Cerecedo (eds.). *Avances en nutrición acuícola. Memorias del V Simposio Internacional de Nutrición Acuícola*. 19-22 Noviembre 2000, Mérida, Yucatán, pp. 102-110.
- Campa-Córdova, A., A. Hernández-Salmerón, F. Ascencio-Valle & A. Aguirre-Guzmán. 2010. Respuesta inmune y antioxidante en camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, expuesto a inmunoestimulantes y probióticos. In: L.E. Cruz-Suarez, D. Ricque-Marie, M. Tapia-Salazar, M. G. Nieto-López, D.A. Villarreal-Cavazos & J. Gamboa-Delgado. (eds.). *Avances en nutrición acuícola. Memorias del Décimo Simposio Internacional de Nutrición Acuícola*, 8-10 de Noviembre, 2010, San Nicolás de los Garza, N. L., México, pp. 567-587.
- Comité de Sanidad Acuícola del Estado de Sonora (COAES). 2013. Informe de sanidad de camarón 2013. Comité de Sanidad Acuícola del Estado de Sonora, Sonora, 98 pp.
- Del Campo, J.A., M. García-González & M. Guerrero. 2007. Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: current state and perspectives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 74: 1163-1174.
- De la Re-Vega, E., K. García-Orozco, S. Calderón-Arredondo, M. Romo-Figueroa & G. Yepiz-Plascencia. 2004. Recombinant expression of marine shrimp lysozyme in *Escherichia coli*. *Electron. J. Biotechnol.*, 7: 295-301.
- Fagutao, F., H. Kondo, T. Aoki & I. Hirono. 2011. Prophenoloxidase has a role in innate immunity in penaeid shrimp. In: M.G. Bondad-Reantaso, J.B. Jones, F. Corsin & T. Aoki (eds.). *Diseases in Asian aquaculture. VII. Fish health section*. Asian Fisheries Society, Selangor, Malaysia, pp. 171-176.
- Figueroa-Pizano, M.D. 2013. Efecto de la bacteria de la necrosis hepatopancreática sobre la expresión de genes y respuesta inmune del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. Tesis de Maestría, Universidad de Sonora, Sonora, 69 pp.
- Fimbres-Olivarría, D. 2011. Crecimiento, biomasa y producción de carotenoides de *Dunaliella* sp. en concentraciones diferentes de nitrógeno. Tesis de Maestría, Universidad de Sonora, Sonora, 57 pp.
- Guillard, R.L. & J.H. Ryther. 1962. Studies on marine planktonic diatoms I. *Cyclotella nana* Husted and *Detonula confervacea* (Cleve). *Can. J. Microbiol.*, 8: 229-239.
- Jiang, G. 2011. Can white spot syndrome virus be transmitted through the phytoplankton, rotifer, artemia, shrimp pathway? *Afr. J. Biotechnol.*, 11: 1277-1282.
- Li, F. & J. Xiang. 2013. Recent advances in researches on the innate immunity of shrimp in China. *Dev. Comp. Immunol.*, 39: 11-26.
- Liu, B., Z. Yu, X. Song & Y. Guan. 2007. Studies on the transmission of WSSV (white spot syndrome virus) in juvenile *Marsupenaeus japonicus* via marine microalgae. *J. Invertebr. Pathol.*, 95: 87-92.
- MaBadhul, H., K. Kalai-Priya, R. Rajaram, R. Vignesh & M. Srinivasan. 2012. Real time PCR quantification of WSSV infection in specific pathogen free (SPF) *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) exposed to antiviral nucleotide. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.*, 2: 1120-1129.
- Mai, W.J. & W.N. Wang. 2010. Protection of blue shrimp (*Litopenaeus stylirostris*) against the White Spot Syndrome Virus (WSSV) when injected with shrimp lysozyme. *Fish Shellfish Immunol.*, 28: 727-733.
- Martínez-Córdova, L.R., M. Ezquerro-Brauer, L. Bringas-Alvarado, E. Aguirre-Hinojosa & M. del C. Garza-Aguirre. 2002. Optimización de alimentos y prácticas de alimentación en el cultivo de camarón en el noroeste de México. In: L.E. Cruz-Suárez, D. Ricque-Marie, M. Tapia-Salazar, M.G. Gaxiola-Cortés & N. Simoes (eds.). *Avances en nutrición acuícola*.

- Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. Cancún, Quintana Roo, pp. 560-581.
- Medina-Félix, D., J.A. López-Elías, L. Martínez-Córdova, M. López-Torres, J. Hernández-López & F. Mendoza-Cano. 2014. Evaluation of the productive and physiological responses of *Litopenaeus vannamei* infected with WSSV and fed diets enriched with *Dunaliella* sp. *J. Invertebr. Pathol.*, 117: 9-12.
- Miyamoto, Y., K. Nakamura & K. Takizawa. 1961. Pathogenic halophiles. Proposal of a new genus "*Oceanomonas*" and of the amended species names. *Jap. J. Microbiol.*, 5: 477-486.
- Moser, J.R., D.A. Galván, F. Medoza, T. Encinas, D. Coronado, G. Portillo, M. Risoleta, F.J. Magallón, & L. Hernández. 2012. Water temperature influences viral load and detection of White Spot Syndrome Virus (WSSV) in *Litopenaeus vannamei* and wild crustaceans. *Aquaculture*, 326-329: 9-14.
- Oren, A. 2005. A hundred years of *Dunaliella* research: 1905-2005. Hebrew University of Jerusalem, Jerusalem, 15 pp.
- Pisal, D.S. & S.S. Lele. 2005. Carotenoid production from microalga, *Dunaliella salina*. *Indian J. Biotechnol.*, 4: 476-483.
- Rendón, L. & J.L. Balcázar. 2003. Inmunología de camarones: conceptos básicos y recientes avances. *Revista AquaTIC*, N°19, pp. 27-33. [<http://www.revista-aquatic.com/aquatic/art.asp?t=p&c =158>]. Reviewed: 27 February 2013.
- Sánchez-Paz, A. 2010. White spot syndrome virus: an overview on an emergent concern. *EDP Sciences*, 10: 41-43.
- Sánchez-Paz, A., F. García-Carreño, J. Hernández-López, A. Muhlia-Almazán & G. Yepiz-Plascencia. 2007. Effect of short-term starvation on hepatopancreas and plasma energy reserves of the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 340: 184-193.
- Sarathi, M., V.P. Ishaq-Ahmed, C. Venkatesan, G. Balasubramanian, J. Prabavathy & A.S. Sahul-Hameed. 2007. Comparative study on immune response of *Fenneropenaeus indicus* to *Vibrio alginolyticus* and white spot syndrome virus. *Aquaculture*, 271: 8-20.
- Sritunyalucksana, K., P. Sithisarn, B. Withayachumnarnkul & T. Flegel. 1999. Activation of prophenoloxidase, agglutinin and antibacterial activity in haemolymph of the black tiger prawn, *Penaeus monodon*, by immunostimulants. *Fish Shellfish Immunol.*, 9: 21-30.
- Subashini, A., S. Sethi & K. Revathi. 2012. Effect of immunostimulant on enhancement of the immune response of Kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus* and its resistance against white spot syndrome virus (WSSV). *E-planet*, 9: 23-30.
- Sung, H.H., H.J. Chang, C. Her, J.C. Chang & Y.L. Song. 1998. Phenoloxidase activity of hemocytes derived from *Penaeus monodon* and *Macrobrachium rosenbergii*. *J. Invertebr. Pathol.*, 71: 26-33.
- Tapia-Salazar, M., D. Ricque-Marie, M. Nieto-López & L.E. Cruz Suárez. 2008. Uso de pigmentos de la flor de cempasúchil (*Tagetes erecta*) como aditivo en alimentos para camarón *L. vannamei*. In: L.E. Cruz-Suárez, D.R. Marie, M.T. Salazar, M.G.G. Nieto López, D.A. Villarreal Cavazos, J.P. Lazo & M.T. Viana. (eds.). Avances en nutrición acuícola. IX Simposio Internacional de Nutrición Acuícola. 24-27 Noviembre 2008. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, pp. 492-513.
- Vargas, F., I. Higuera, F. Jiménez, J. Hernández, T. Gollas & G. Yepiz. 1996. Posibilidades de inmunestimulación del camarón a través del alimento. Avances en nutrición acuícola. III. Memorias del tercer simposio internacional de nutrición acuícola. Nuevo León, Monterrey, 433-439 pp.
- Vargas-Albores, F., J. Hernández-López, T. Gollas-Galván, K. Montañón-Pérez, F. Jiménez-Vega & G. Yepiz-Plascencia. 1998. Activation of shrimp cellular defense functions by microbial products. In: T.W. Flegel (ed.). Advances in shrimp biotechnology. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok, pp. 161-166.
- Wu, W., L. Wang & X. Zhang. 2005. Identification of white spot syndrome virus (WSSV) envelope proteins involved in shrimp infection. *Virology*, 332: 578-583.
- Yeh, S.P., Y.N. Chen, S.L. Hsieh, W. Cheng & C.H. Liu. 2009. Immune response of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, after a concurrent infection with white spot syndrome virus and infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus. *Fish Shellfish Immunol.*, 26: 582-588.

Received: 2 December 2014; Accepted: 15 January 2016