

Research Article

Respuesta inmune y expresión de genes en el camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) inducida por inmunoestimulantes microbianos

Antonio Luna-González¹, Jesús T. Moreno-Herrera¹, Ángel I. Campa-Córdova²
Héctor A. González-Ocampo¹, Jesús A. Fierro-Coronado¹
Píndaro Álvarez-Ruíz & Mario A. Bueno-Ibarra¹

¹Instituto Politécnico Nacional-Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional-Unidad Sinaloa, Boulevard Juan de Dios Bátiz Paredes 252, Col. San Joachin C.P. 81101, Guasave, Sinaloa, México

²Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, Mar Bermejo 195, Col. Playa Palo de Santa Rita La Paz, B.C.S., México

RESUMEN. Se realizó un bioensayo de 26 días para evaluar el efecto inmunoestimulante de bacterias ácido lácticas y levaduras (MI), adicionadas en el alimento, en *Litopenaeus vannamei*. Los tratamientos del bioensayo se realizaron por triplicado: I) dieta control (Camaronina[®]); II) MI en alimento, diario; III) MI en alimento, cada tres días y; IV) MI en alimento, cada seis días. Los camarones sólo eran libres de WSSV. Para el estudio del sistema inmune se hizo un conteo total de hemocitos, se determinó bioquímicamente la concentración de anión superóxido, y la actividad de la fenoloxidasa. También se estudió la expresión semicuantitativa de seis genes del sistema inmune, utilizando la técnica de RT-PCR. No hubo aumento significativo en el crecimiento y la supervivencia, el conteo total de hemocitos, la concentración de la proteína total en plasma y hemocitos, y la concentración del anión superóxido. La actividad de la fenoloxidasa en plasma en el tratamiento IV fue significativamente mayor que en los tratamientos I, II y III. La fenoloxidasa del SLH (proFO) en el tratamiento IV fue significativamente mayor que en los tratamientos I y III. La MI provocó una sobreexpresión significativa de los genes que codifican para la profenoloxidasa (tratamiento IV), lisozima (tratamiento III) y transglutaminasa (tratamiento II), con respecto a los animales no tratados (control). La mezcla de inmunoestimulantes microbianos puede aumentar la resistencia de *L. vannamei* contra patógenos en los cultivos.

Palabras clave: expresión de genes, inmunoestimulantes microbianos, *Litopenaeus vannamei*.

Immune response and gene expression of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) induced by microbial immunostimulants

ABSTRACT. A 26-day bioassay was performed to evaluate the immunostimulating effect of lactic acid bacteria and yeasts (IM), added in the feed, in *Litopenaeus vannamei*. Bioassay treatments were performed in triplicate: I) control diet (Camaronina[®]); II) IM in food, daily; III) IM in food every three days and; IV) IM in food every six days. The shrimp were WSSV-free. To study the immune system, a total count of hemocytes, the concentration of superoxide anion, and the phenoloxidase activity were analyzed. We also studied the semiquantitative expression of six immune system genes, using the technique of RT-PCR. There was no significant increase in the growth and survival, the total count of hemocytes, the protein concentration, and the concentration of superoxide anion. Phenoloxidase activity in plasma in the treatment IV was significantly higher than in treatments I, II, and III. The phenoloxidase of HLS (proPO) in the IV treatment was significantly higher than in treatments I and III. The IM caused a significant overexpression of the genes coding for the prophenoloxidase (treatment IV), lysozyme (treatment III), and transglutaminase (treatment II) relative to the untreated animals (control). The mixture of microbial immunostimulants may increase the resistance of cultured *L. vannamei* against pathogens.

Keywords: gene expression, microbial immunostimulants, *Litopenaeus vannamei*.

INTRODUCCIÓN

La salud de las especies acuáticas está influenciada por la llamada triada epidemiológica, que se refiere a las interacciones entre medio ambiente, patógenos y huésped. En los sistemas de producción del camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*), muchos patógenos potenciales, como bacterias, hongos y virus co-existen con el camarón sin causar un impacto negativo en la producción, debido al equilibrio en los factores de la triada. Sin embargo, cualquier alteración en alguno de ellos, como estrés en el organismo, deterioro del ambiente o mutaciones de las cepas patógenas, puede desencadenar enfermedades agudas, que provocan pérdidas significativas en la industria (Flegel & Pasharawipas, 1998; Moriarty, 1999; Capy *et al.*, 2000; Spann *et al.*, 2000; Vidal *et al.*, 2001).

El desafío mayor que enfrenta la camaronicultura son los problemas virales, por lo tanto, es importante el estudio del sistema inmune del camarón y de los inmunoestimulantes (Song *et al.*, 1997; Arala-Chávez & Sequeira, 2000; Doñate *et al.*, 2010). En los camarones, los mecanismos celulares (citotoxicidad, coagulación, encapsulación, fagocitosis, nodulación y melanización) y humorales (enzimas lisosomales, lectinas, peroxidasa, proteínas de la coagulación, péptidos antimicrobianos y radicales libres del oxígeno y el nitrógeno) contribuyen a la defensa del organismo, limitando invasiones microbianas y virales que son eliminadas de la hemolinfa y tejidos (Söderhäll & Cerenius, 1992; Sritunyalucksana *et al.*, 2001; Bachère *et al.*, 2004; Cerenius *et al.*, 2008). La expresión de genes relacionados con el sistema inmune en el camarón proporciona información importante sobre la activación del sistema inmune y su modulación (Wang *et al.*, 2007).

Los inmunoestimulantes, incluidos en la dieta del camarón, son una alternativa al uso de antibióticos y quimioterapéuticos que causan problemas de resistencia bacteriana y ambientales (Song *et al.*, 1997). Los inmunoestimulantes son sustancias que estimulan la respuesta inmune, incrementando la resistencia de los peces e invertebrados al estrés y a las enfermedades (Raa, 1996; Sakai, 1999; Doñate *et al.*, 2010). El efecto inmunoestimulante de moléculas (alginato de sodio, glucanos, lipopolisacáridos, nucleótidos, peptidoglucanos y quitosano) y células completas (bacterias y levaduras) ha sido estudiado en peces y crustáceos (Raa, 1996; Sakai, 1999; Sajeewan *et al.*, 2009a, 2009b; Flores-Miranda *et al.*, 2011).

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de inmunoestimulantes microbianos en el sistema inmune y la expresión de genes de *L. vannamei*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Adición de las bacterias ácido lácticas (BAL) y levaduras al alimento

Se usó una mezcla inmunoestimulante (MI) compuesta por cuatro bacterias ácido lácticas (Lta2, Lta6, Lta8 y Lta10) y una levadura (Lt6), con una concentración de 8,5 mg kg⁻¹ de alimento (Apún-Molina *et al.*, 2009; Flores-Miranda *et al.*, 2011). Los microorganismos se cultivaron en MRS (Man, Rogosa & Sharp), el pellet se obtuvo por centrifugación (sin lavar), secado a 74°C por 4 h y triturado en un mortero. La mezcla bacteriana en polvo se adicionó al alimento balanceado (Camaronina, Purina®, 35% de proteína), previamente molido en una licuadora. La mezcla se rehidrató, el pellet se hizo de nuevo en un molino de carne y se secó con un ventilador. Se preparó alimento sin microorganismos para el tratamiento control. El alimento se preparó para 27 días y se guardó a -20°C.

Obtención de animales y su aclimatación

Se trajeron camarones de la granja Acuícola Cuate Machado (Guasave, Sinaloa) a las instalaciones del Departamento de Acuicultura del CIIDIR-IPN, Unidad Sinaloa, México. Para la aclimatación y posterior cultivo, se utilizaron tinas ovaladas de plástico con una capacidad de 120 L, llenadas con 80 L de agua de mar filtrada (20 µm). En cada una de las tinas se colocaron 10 organismos. Los organismos se aclimataron durante 5 días y se alimentaron dos veces al día (09:00 y 17:00) con Camaronina, a razón del 5% de la masa corporal. Se hizo un análisis de mancha blanca a 12 camarones para saber si estaban libres de WSSV.

Extracción de ADN para la determinación de WSSV

Para la extracción de ADN se utilizó una lamela branquial (0.1 g) por organismo, la cual se colocó en 400 µL del reactivo DNAzol (MRC®), se maceró con un pistilo y se dejó incubar por 30 min. Posteriormente, se centrifugó a 13,000x g, durante 10 min, en una centrífuga Sigma 2-6E (SIGMA Laborzentrifugen GmbH®). Se recuperaron 300 µL del sobrenadante, al cual se añadieron 400 µL de etanol absoluto frío (4°C). La mezcla se dejó reposar por 15 min, agitando periódicamente. A continuación se centrifugó a 9,000x g durante 5 min y se desechó el sobrenadante. La pastilla se resuspendió en 1 mL de etanol al 70% frío (4°C) y se centrifugó a 9,000 x g durante 5 min. Se decantó el sobrenadante y se extrajo con una pipeta el líquido restante. Se colocó la muestra en un termoblock a 55°C hasta secar y se

agregaron 30 μL de agua ultrapura a 55°C. Finalmente, la muestra se agitó en un vortex, se centrifugó a 9,000x g durante 30 s y se almacenó a -20°C.

PCR para WSSV

La detección final de WSSV en los organismos se realizó mediante una PCR sencilla y una PCR anidada. Los oligonucleótidos utilizados en la PCR sencilla fueron: WSSV1:5'-ATC ATG GCT GCT TCA CAG AC-3' y WSSV2:5'-GGC TGG AGA GGA CAA GAC AT-3'. Los oligonucleótidos utilizados en la PCR anidada fueron: WSSV1 in (sentido) 5'-TCT TCA TCA GAT GCT ACT GC 3' y WSSV2 in (contrasentido) 5'-TAA CGC TAT CCA GTA TCA CG 3' (Kimura *et al.*, 1996). Los dos pares de oligonucleótidos amplifican un fragmento de 982 y 570 pb, respectivamente. La mezcla de reacción se realizó en tubos Eppendorf de 0,2 mL e incluyó 18,75 μL de H_2O ; 2,5 μL de búfer de reacción 10X (Bioline[®]); 1,0 μL de MgCl_2 (50 mM; Bioline[®]); 0,5 μL de dNTPs (10 mM; Bioline[®]); 0,5 μL de cada oligo (10 μM cada uno; Sigma-Genosys); 0,25 μL de Taq polimerasa (5 U μL^{-1} ; Bioline[®]) y 1 μL de DNA total para un volumen total de 25 μL . La amplificación se realizó en un termociclador Tpersonal (Biometra[®]) usando el siguiente programa: desnaturalización inicial a 95°C por 4 min, 35 ciclos de 30 s a 95°C, 30 s a 55°C, 2 min a 72°C y una extensión final a 72°C, por 4 min. Los fragmentos amplificados se visualizaron (incluido un marcador de peso molecular de 1 kb) en un gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio, bajo luz UV. En la PCR anidada se redujo a 45 s el tiempo de polimerización a 72°C (Kimura *et al.*, 1996).

Bioensayo

El bioensayo duró 25 días y se utilizaron con un peso promedio de $9,96 \pm 3,18$ g. Se realizaron cuatro tratamientos por triplicado: I) Grupo control (Camaronina); II) Camaronina + MI (8,5 mg kg^{-1} de alimento), diario; III) Camaronina + MI (8,5 mg kg^{-1} de alimento), cada tres días; IV) Camaronina + MI (8,5 mg kg^{-1} de alimento), cada seis días. La limpieza del sistema de cultivo se realizó cada tres días por sifoneo, recuperando el volumen de agua perdido. La temperatura, oxígeno, salinidad y pH se midieron cada tres días en cada tina (12 tinas en total). Al inicio y final del bioensayo se determinó la cantidad de nitrito, nitrato y amonio en el agua de las tinas (Strickland & Parsons, 1972). Al final del bioensayo, se determinó la supervivencia y crecimiento de los organismos, además, se tomó hemolinfa para el análisis de parámetros del sistema inmune del camarón.

Tasa de crecimiento específico

La tasa de crecimiento específico (TCE) se calculó de la siguiente manera: $\text{TCE} = 100 (\ln W_2 - \ln W_1) t^{-1}$, donde: W_2 es el peso final, W_1 el peso inicial y t es el número de días de cultivo (Ziaei-Nejad *et al.*, 2006).

Obtención de hemolinfa

Para determinar la expresión de los genes del sistema inmune (profenoloxidasa, transglutaminasa, crustina, peneidina 3a, lisozima y superóxido dismutasa), actividad de la fenoloxidasa y peroxidasa, concentración del anión superóxido intracelular y conteo de hemocitos, se extrajo la hemolinfa de los camarones cultivados con jeringas para insulina (27G x 13 mm), de la parte ventral del organismo, justo en la zona del segundo par de pleópodos. La jeringa se cargó con una solución isotónica para camarón y EDTA como anticoagulante (SIC-EDTA, Na₂) (NaCl 450 mM, KCl 10 mM, Hepes 10 mM + EDTA-Na₂ 10 mM, pH 7,3), previamente enfriada a 4°C (Vargas-Albores *et al.*, 1993), en una proporción 2:1 (2 volúmenes de SIC-EDTA por cada volumen extraído de hemolinfa). La muestra de hemolinfa se colocó en tubos Eppendorf[®] de 1,5 mL. Para el conteo de hemocitos se extrajo la hemolinfa de dos camarones por tina (6 por tratamiento) en SIC-EDTA enfriado. Para el estudio bioquímico de FO y peroxidasa se utilizó la hemolinfa de dos camarones por tina (seis por tratamiento). Se separaron los hemocitos del plasma centrifugando a 800x g por 6 min a 4°C. El plasma se almacenó a -80°C y el paquete celular se lavó con 1 mL de SIC-EDTA frío (4°C). La muestra lavada se centrifugó a 800x g por 6 min a 4°C, desechándose el sobrenadante. Al paquete celular se adicionaron 300 μL de búfer de cacodilatos 10 mM (pH 7) y se centrifugó a 14,000x g por 10 min a 4°C, recuperándose el sobrenadante del lisado de hemocitos (SLH) y se guardó a -80°C (Vargas-Albores *et al.*, 1993). Para la determinación bioquímica del anión superóxido intracelular se utilizaron dos camarones por tina (seis por tratamiento). Las células se separaron del plasma y se lavaron (como arriba) y se resuspendieron en un búfer especial como se explica más adelante.

Para determinar la expresión de los genes del sistema inmune, se extrajo la hemolinfa de tres camarones por tina (réplica) y se hizo un grupo. La hemolinfa se centrifugó a 800x g por 6 min a 4°C. El plasma se eliminó y el paquete celular (grupo de tres camarones) se lavó con 1 mL de SIC-EDTA frío (4°C). Al paquete celular se adicionaron 1,5 mL de Trizol (MRC[®]) frío (4°C) y se almacenó a -80°C.

Conteo y separación de hemocitos

El conteo de los hemocitos se realizó en una cámara de Neubauer con una retícula de 0,01 mm. Para el conteo se tomaron 50 μL de hemolinfa y se diluyeron (1:5 v/v) en una solución de formol al 6%. A partir de esta dilución se realizaron dos conteos en el microscopio.

Actividad de fenoloxidasa (plasma) y profenoloxidasa (SLH)

La actividad de la FO se realizó con la técnica descrita por Hernández-López *et al.* (1996). La actividad de la FO en plasma se midió espectrofotométricamente por la formación de dopacromo a partir de L-dihidroxifenilalanina (L-Dopa). A 50 μL de muestra, se le adicionaron 50 μL de búfer de cacodilato 10 mM, pH 7 y 50 μL de L-Dopa (3 mg mL^{-1} en agua destilada). Se incubó durante 10 min a temperatura ambiente (aprox. 25°C), posteriormente se adicionó 800 μL de búfer de cacodilato y se determinó la absorbancia a 492 nm en un espectrofotómetro Thermo Spectronic Genesys 2 (Thermo Scientific®). En todos los ensayos se utilizó cacodilato como control negativo. La FO de SLH se determinó activando la proFO previamente con tripsina 0,1 mg mL^{-1} en agua destilada para convertirla en FO. La actividad de la FO se midió como se describió previamente. La actividad enzimática se expresó como unidades, donde una unidad representa el incremento en la absorbancia de 0,001 $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína. La cantidad de proFO disponible en la muestra se calculó de la siguiente forma:

$$\text{FO} + \text{FO activada con tripsina} = \text{FO total}$$

$$\text{FO total} - \text{FO} = \text{proFO}$$

Cuantificación del anión superóxido intracelular

El anión superóxido se cuantificó mediante la metodología de Song & Hsieh (1994). Se tomó 100 μL de hemolinfa de cada grupo y se centrifugó a 800x g por 5 min. Posteriormente, se descartó el sobrenadante y los hemocitos se lavaron tres veces con búfer SIC-EDTA y se tiñeron con 100 μL de una solución NBT (0,3%) durante 30 min a 37°C. La reacción de tinción se finalizó mediante la eliminación de la solución NBT por centrifugación y la adición de 100 μL de metanol absoluto. Después de tres lavados con metanol al 70%, los hemocitos se secaron al aire durante 30 min y luego se añadieron 120 μL de KOH más 140 μL de DMSO para disolver el formazán citoplasmático. La densidad óptica del formazán disuelto se leyó a 630 nm en un espectrofotómetro para comparar los efectos de los diferentes tratamientos en la generación del anión.

Extracción de ARN y RT-PCR semicuantitativa

Se utilizaron los hemocitos guardados a -80°C en Trizol. El ARN total fue extraído de acuerdo al protocolo del fabricante y guardado a -80°C hasta su uso. La concentración y pureza del ARN se determinó midiendo la absorbancia a 260/280 nm en un nanofotómetro (Nanodrop 8000, Thermo Scientific®).

Se usó la transcriptasa reversa M-ML (Invitrogen®) para sintetizar la primera hebra (ADNc) con el primer oligo dT₂₀ a partir de 1 μg de ARN total a 37°C, por 50 min. El ADNc resultante en búfer TE 1x se almacenó a -20°C para su uso en las reacciones de PCR. La concentración del ADNc se determinó midiendo la absorbancia a 260/280 nm en un nanofotómetro (Nanodrop 8000).

Se analizó la expresión de los genes profenoloxidasa (proFO), transglutaminasa (TG), crustina (CR), peneidina 3a (PEN), lisozima (LIZ) y superóxido dismutasa (SOD) en hemocitos utilizando los primers de Wang *et al.* (2007). El gen de la β -actina, que es constitutivo, fue usado como control en todas las reacciones de amplificación para normalizar la expresión de los genes de estudio. Se utilizaron 100 ng de ADNc para la PCR en una reacción con volumen de 25 μL . La amplificación se realizó en un termociclador Tpersonal, con las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 95°C por 5 min, 40 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 s, 60°C por 1 min, anillado (temperatura variable para cada gen) y extensión a 72°C por 90 s y una elongación final a 72°C por 5 min. Los productos de la PCR fueron visualizados en un gel de agarosa al 1,0% teñido con bromuro de etidio, usando un sistema de fotodocumentación (UVP). La cuantificación del ARNm se realizó empleando el programa de análisis de imágenes IMAGE J® (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) que permitió comparar la intensidad de la banda correspondiente al producto amplificado de los genes de estudio con el testigo β -actina, calculando la razón gen de estudio/ β -actina (por triplicado de la misma muestra). Para determinar la expresión de cada gen en los tratamientos con MI con respecto al control, se dividió el resultado (densidad de banda del gen blanco/densidad de banda del gen beta actina) del gen entre el resultado del mismo gen en el control.

Secuenciación de genes del sistema inmune

Los productos amplificados de los genes de estudio fueron limpiados con el kit Wizard SV Geland PCR Clean-Up System (Invitrogen®). La cuantificación se realizó con el kit Quant-iT™ dsDNA HS Kit (Invitrogen®). Los productos ya limpios se mandaron a secuenciar (LANGEBIO, Irapuato, México).

Determinación de la concentración de proteína

La concentración de proteína se determinó de acuerdo al método descrito por Bradford (1976), utilizando albúmina de suero bovino para construir una curva estándar. Como muestra se utilizó el sobrenadante del lisado de hemocitos y el plasma.

Análisis estadístico de los resultados

Los datos de crecimiento, conteo de hemocitos, FO, y anión superóxido se analizaron con un ANDEVA para determinar la existencia de diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0,05$). Si se encontraron diferencias entre tratamientos, se realizó una prueba de Tukey (HSD) para identificar la naturaleza de estas diferencias (Zar, 1996). Para analizar la expresión de los genes del sistema inmune y bajo los supuestos de heterocedasticidad, no normalidad y que los datos no provienen de un mismo tipo de distribución se realizó una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, considerando diferencias significativas para un valor $P < 0,05$.

RESULTADOS

Parámetros físicos y químicos y de calidad del agua

Los parámetros físicos, químicos (temperatura, salinidad, pH y oxígeno disuelto) y de calidad del agua (nitrito, nitrato y amonio) se mantuvieron dentro de los intervalos óptimos para el cultivo de camarón según Brock & Main (1994) durante los 26 días que duró el bioensayo.

WSSV, supervivencia y tasa de crecimiento específico

Los animales del bioensayo resultaron negativos para WSSV (datos no mostrados). La supervivencia en el bioensayo fue del 100% en todos los tratamientos. Respecto a la TCE, los resultados muestran que no hubo diferencias significativas entre los tratamientos. Sin embargo, a pesar de lo anterior, en el tratamiento III, donde se alimentaron los camarones con inmunoestimulantes cada tres días, se obtuvo un mejor crecimiento promedio (Tabla 1).

Conteo total de hemocitos (CTH)

Los resultados del CTH muestran que no hubo diferencias significativas pero se observó un mayor número de hemocitos en los tratamientos con aditivos, especialmente en el tratamiento III (Tabla 1).

Anión superóxido en SLH

Los resultados de la concentración de anión superóxido en el SLH no mostraron diferencias

significativas entre los tratamientos (Tabla 1), pero si una tendencia a aumentar en los tratamientos con aditivos.

ProFO, FO

Los resultados de la actividad de la fenoloxidasas (U/min/mg de proteína $\times 10^3$) en el plasma mostraron que en el tratamiento IV ésta fue significativamente mayor en comparación con los tratamientos I, II y III ($P = 0,0001$; $P = 0,0001$; $P = 0,0001$, respectivamente). Los resultados en el SLH mostraron que en el tratamiento IV la proFO (FO) fue significativamente mayor que en el tratamiento I ($P = 0,001$) y III ($P = 0,003$) (Tabla 1).

Determinación de proteína

La determinación de la proteína (Tabla 1) se hizo tanto en el plasma como en el SLH. No existieron diferencias significativas entre los tratamientos, tanto en plasma como en el SLH. La proteína se utilizó para determinar la actividad de la fenoloxidasas.

Análisis de la expresión de genes del sistema inmune

Los resultados (Tabla 2) muestran que los genes crustina, peneidina y superóxido dismutasa no presentaron diferencias significativas ($P > 0,05$) entre los tratamientos, de acuerdo a la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. Por otro lado, en el gen de la lisozima se observó una sobreexpresión significativa en el tratamiento III respecto al control (2,03 veces más; $P = 0,02$). La expresión del gen de la transglutaminasa fue significativamente mayor en el tratamiento II respecto al control (1,26 veces más; $P = 0,03$). Por último, la expresión del gen de la profenoloxidasas fue significativamente mayor en el tratamiento IV respecto al control (14,7 veces más; $P = 0,01$).

Las secuencias obtenidas de los seis genes se compararon con las secuencias nucleotídicas reportadas en el banco genómico (GeneBank), coincidiendo con las reportadas por Wang *et al.* (2007).

DISCUSIÓN

Las enfermedades microbianas causan graves problemas en la acuicultura a nivel mundial (Lo *et al.*, 1997). En el mercado existen varios inmunoestimulantes que pretenden fortalecer el sistema inmune de *L. vannamei* para que sea más resistente a las enfermedades pero existe escaso soporte científico sobre su función y la dosis/frecuencia de aplicación (Sajeevan *et al.*, 2009a). Por lo tanto, en este trabajo

Tabla 1. Análisis de la supervivencia, tasa de crecimiento específico, conteo total de hemocitos, anión superóxido y actividad de la fenoloxidasas en el camarón blanco *L. vannamei* alimentado con inmunoestimulantes microbianos.

Parámetro estudiado	Tratamientos				
	I	II	III	IV	
Supervivencia (%)	100	100	100	100	
TCE (% d ⁻¹)	0,96 ± 0,09	1,06 ± 0,10	1,25 ± 0,35	1,21 ± 0,02	
CTH (x10 ⁶)	28,5 ± 17,5	34,0 ± 16,2	40,6 ± 19,2	39,1 ± 10,5	
Anión superóxido (Abs 630 nm)	1,10 ± 0,55	1,47 ± 0,63	1,74 ± 0,61	1,45 ± 0,29	
Actividad de la fenoloxidasas	Plasma	0,119 ± 0,007 ^a	0,113 ± 0,006 ^a	0,138 ± 0,008 ^a	0,189 ± 0,007 ^b
	SLH	37,3 ± 5,19 ^a	51,3 ± 6,13 ^{ab}	38,9 ± 3,12 ^a	63,7 ± 4,69 ^b
Proteína (mg mL ⁻¹)	Plasma	88,6 ± 15,6	91,7 ± 9,1	102 ± 6,1	87,1 ± 10,5
	SLH	0,52 ± 0,1	0,38 ± 0,05	0,43 ± 0,1	0,35 ± 0,02

Tratamientos: I) Control negativo (Camaronina); II) Camaronina + MI (8,5 mg kg⁻¹ de alimento) diario; III) Camaronina + MI (8,5 mg kg⁻¹ de alimento), cada tres días; IV) Camaronina + MI (8,5 mg kg⁻¹ de alimento) cada seis días. Los valores se indican como promedio ± EE. Letras distintas indican diferencias significativas. TCE: tasa de crecimiento específico. CTH: conteo total de hemocitos. SLH: sobrenadante del lisado de hemocitos. Actividad de la fenoloxidasas: U/min/mg de proteína x10³.

Tabla 2. Expresión relativa de los genes del sistema inmune de *L. vannamei* alimentado con inmunoestimulantes microbianos.

Gen	Expresión relativa a beta actina en tratamientos			
	I	II	III	IV
Lisozima	0,56 ± 0,05 ^a	0,96 ± 0,17 ^{ab}	1,14 ± 0,10 ^b	0,85 ± 0,01 ^{ab}
Crustina	1,04 ± 0,01	1,23 ± 0,03	1,28 ± 0,12	1,59 ± 0,39
Transglutaminasa	1,01 ± 0,03 ^a	1,28 ± 0,02 ^b	1,15 ± 0,02 ^{ab}	1,23 ± 0,12 ^{ab}
Peneidina	1,22 ± 0,17	1,22 ± 0,04	1,27 ± 0,01	1,25 ± 0,28
Superóxido dismutasa	0,96 ± 0,05	0,90 ± 0,10	1,05 ± 0,03	1,10 ± 0,10
Profenoloxidasas	0,13 ± 0,02 ^a	0,66 ± 0,01 ^{ab}	0,97 ± 0,09 ^{ab}	1,92 ± 0,31 ^b

I) Control negativo (Camaronina); II) Camaronina + MI (8,5 mg kg⁻¹ de alimento) diario; III) Camaronina + MI (8,5 mg kg⁻¹ de alimento) cada tres días; IV) Camaronina + MI (8,5 mg kg⁻¹ de alimento) cada seis días. Los valores se indican como promedio ± EE.

se evaluó el efecto inmunoestimulante de una mezcla microbiana compuesta por bacterias ácido lácticas y una levadura adicionadas en el alimento en juveniles de camarón blanco, *L. vannamei*, alimentado con diferente frecuencia.

En el bioensayo realizado, la supervivencia fue del 100% en los cuatro tratamientos sin encontrarse diferencias significativas en la tasa de crecimiento específico entre ellos. Durante el experimento se mantuvieron los parámetros físicos, químicos y de calidad del agua dentro de los intervalos propuestos por Brock & Main (1994), para el cultivo de camarón blanco, por lo que se puede afirmar que el sistema de cultivo y el manejo fueron adecuados.

Los hemocitos son responsables de la coagulación, endurecimiento del exoesqueleto y eliminación de materiales extraños (Johansson & Söderhäll, 1989; Song & Hsieh, 1994). Un incremento en el número de

hemocitos aumenta la respuesta inmune de los crustáceos durante los periodos de estrés y los hace más resistentes a las enfermedades (Truscott & White, 1990; Le Moullac *et al.*, 1998). En este trabajo, aunque se observó un aumento en el número de hemocitos en los tratamientos con inmunoestimulantes, especialmente en el tratamiento III (alimentados cada tres días con la MI), respecto al control, no hubo diferencias significativas. Por el contrario, Peraza-Gómez *et al.* (2011) en *L. vannamei*, obtuvieron un aumento significativo en el número total de hemocitos (40,9x10⁶ hemocitos mL⁻¹) respecto al control (25,0x10⁶ hemocitos mL⁻¹) cuando administraron la misma mezcla de BAL y una levadura pero adicionadas vivas en el alimento en una concentración de 1x10⁶ unidades formadoras de colonias (UFC)/g de alimento. Los autores mencionan que el aumento en el número de hemocitos pudo ser

inducido por componentes de la pared celular de la mezcla inmunoestimulante (peptidoglucanos de las BAL y β -glucanos de la levadura). Del mismo modo, Bai *et al.* (2010) encontraron que administrando β -glucanos con diferente frecuencia (2000 mg kg⁻¹ de alimento) a *L. vannamei* en cultivo aumentó significativamente el número de hemocitos respecto al control.

El anión superóxido se produce durante el proceso de fagocitosis en los hemocitos y tiene actividad bactericida (Song & Hsieh, 1994; Muñoz *et al.*, 2000). La molécula es uno de los parámetros del sistema inmune más utilizados para determinar el estado de salud de los camarones cultivados. En este trabajo, no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos respecto a la concentración del radical anión superóxido. Sin embargo, la concentración fue mayor en los tratamientos con la MI, especialmente en el tratamiento III (alimentados cada tres días). Contrariamente, Campa-Córdova *et al.* (2002) inmovilizaron camarones (*L. vannamei*) con β -glucanos y polisacáridos sulfatados, encontrando que la generación del anión superóxido aumentó significativamente en los camarones tratados con respecto al control. Sin embargo, es importante recordar que, a diferencia del trabajo mencionado donde utilizaron moléculas aisladas, en este trabajo se utilizaron los microorganismos completos (BAL y levadura) para inmunoestimular los animales. De la misma manera, Guertler *et al.* (2010) encontraron un aumento significativo del anión superóxido en los hemocitos de los camarones (*L. vannamei*, *L. schmitti* y *Farfantepenaeus paulensis*), tratados con 2 mg mL⁻¹ de laminarina (β -glucano) respecto al grupo control.

La enzima SOD cataliza la transformación del anión superóxido a peróxido de hidrógeno (Wang *et al.*, 2010); sin embargo, a nivel de transcripción del ARNm del gen de la SOD no hubo un aumento significativo entre los organismos alimentados con la MI y el grupo control. Como el anión superóxido se produce durante el proceso de fagocitosis, los resultados a nivel bioquímico (concentración del anión superóxido en hemocitos) y genético indican que no hubo un aumento significativo en la actividad fagocítica de los hemocitos de *L. vannamei* alimentado con la MI.

El sistema profenoloxidasa es uno de los mecanismos defensivos más importantes en crustáceos (Söderhäll & Cerenius, 1992; Sung *et al.*, 1996). En este trabajo, la actividad de la fenoloxidasa (SLH y Plasma) fue significativamente más alta en el tratamiento IV (alimentados cada seis días con la MI) respecto al grupo control. De manera similar, Suphantharika *et al.* (2003) reportaron un aumento de

la actividad de la FO en camarones tigre (*Penaeus monodon*) cuando administraron oralmente β -glucanos (0,2%, peso/peso). Felix *et al.* (2004) encontraron que la adición de la macroalga (*Sargassum wightii*) en polvo en el alimento funcionó como inmunoestimulante ya que la actividad de la FO en los animales alimentados con 10 g kg⁻¹ de alimento fue significativamente mayor que en los animales del grupo control. En el mismo tenor, la actividad de la FO en camarones blancos (*L. vannamei*) alimentados con dietas conteniendo *Lactobacillus plantarum* vivas (10⁷ y 10¹⁰ UFC kg⁻¹ de alimento) fue significativamente más alta a las 168 h respecto a los camarones del grupo control (Chiu *et al.*, 2007). En contraste, Peraza-Gómez *et al.* (2011) en *L. vannamei*, no obtuvieron un aumento significativo en la actividad de la FO en los organismos tratados respecto al grupo control, cuando administraron la misma mezcla de BAL y una levadura utilizadas en este trabajo pero adicionadas vivas en el alimento en una concentración de 1x10⁶ UFC g⁻¹ de alimento.

La respuesta inmune innata en invertebrados se dispara cuando los receptores que reconocen patrones moleculares (RRPM), en el hemocito o solubles en el plasma, reconocen y se unen específicamente a los patrones moleculares asociados a patógenos (lipopolisacáridos, β -glucanos, peptidoglucanos, ADN y ARN) (Dalmo & Bøgwald, 2008; Wang *et al.*, 2010). Cuando los hemocitos de los camarones (*L. vannamei*) reconocen las moléculas en los microorganismos se dispara una cascada de proteasas serinas que da como resultado la activación del sistema profenoloxidasa (Wang *et al.*, 2010). En este trabajo se encontró un aumento significativo en la transcripción del ARNm de la profenoloxidasa en el tratamiento IV (alimentados con la MI cada seis días) respecto al grupo control. El aumento en la expresión del gen significa que los camarones son más resistentes ante el ataque de un posible patógeno. Es importante recalcar que los resultados a nivel genético coinciden con los del análisis bioquímico.

Cuando los hemocitos de los camarones (*L. vannamei*) reconocen las moléculas en los microorganismos se liberan varias proteínas, incluyendo la profenoloxidasa, proteinasa serina, peroxinectina, inhibidor de proteinasas y lisozima (Lin *et al.*, 2010). La lisozima es una enzima hidrolítica lisosomal que pertenece al sistema de péptidos antimicrobianos y es un componente importante del sistema de defensa del camarón contra bacterias Gram negativas (Wang *et al.*, 2010). En este trabajo se hizo el análisis de la actividad de la lisozima en hemocitos dando como resultado una sobre-expresión significativa del gen en el tratamiento III (alimentados diariamente con la MI) respecto al control. Burge *et al.* (2007) hicieron un

estudio para cuantificar la expresión del gen de la lisozima en respuesta a un desafío con *Vibrio campbelli*. La lisozima se expresó en la mayoría de los hemocitos en circulación y en los tejidos.

En este trabajo, el gen de la transglutaminasa presentó una expresión significativamente mayor en el tratamiento II (alimentados diario con la MI) en comparación con los camarones del grupo control. La proteína de la coagulación es un dímero plasmático que se llama proteína coaguladora (CP), y se encuentra en el plasma en crustáceos decápodos. La polimerización de CP se efectúa mediante la acción de la enzima transglutaminasa en presencia de calcio. La transglutaminasa se encuentra en el interior de las células hialinas del camarón y se libera al plasma por daño tisular o como una respuesta inmediata de los hemocitos ante la presencia de lipopolisacáridos LPS y β -1,3-glucanos (Martín *et al.*, 1991; Yeh *et al.*, 1998; Montaña-Pérez *et al.*, 1999). La transglutaminasa está implicada en la coagulación de la sangre y es un mecanismo de defensa entre los invertebrados. Según Fagutao *et al.* (2012) el silenciamiento génico de la transglutaminasa hace al camarón más susceptible a infecciones bacterianas y virales; por tanto, esta enzima es un componente esencial del sistema inmune del camarón y está implicada en la regulación de algunos otros genes (crustina y lisozima).

Respecto al gen de la crustina, su expresión fue igual en todos los tratamientos, por lo que la MI no tuvo un efecto positivo en los camarones alimentados. La crustina es un péptido antimicrobiano muy importante en los crustáceos decápodos. Antony *et al.* (2010) caracterizaron la crustina en los hemocitos del camarón tigre gigante (*Penaeus monodon*) a nivel molecular. Los autores observaron una expresión diferencial del gen de la crustina en respuesta a la administración de diversos inmunoestimulantes (levaduras y bacterias). Los inmunoestimulantes mejoraron la producción de crustina y confieren una protección significativa del camarón contra la infección de WSSV.

La expresión del gen de la peneidina 3a fue igual en todos los tratamientos, por lo que la MI no tuvo un efecto positivo en los camarones alimentados. Las peneidinas son una familia única de péptidos antimicrobianos que se han encontrado solamente en camarones peneidos. Existen tres subfamilias de peneidinas (PEN2, PEN3 y PEN4) que son muy efectivas contra bacterias Gram positivas, pero no contra bacterias Gram negativas (Destoumieux *et al.*, 1999; Bachère *et al.*, 2004; Gueguen *et al.*, 2006; De Lorgeril *et al.*, 2008).

La mezcla de inmunoestimulantes microbianos aumenta la resistencia de *L. vannamei* cuando se alimentan a diario, cada tres y cada seis días, por lo que se recomienda alimentar los camarones cada tres días, en concordancia con lo reportado por Flores-Miranda *et al.* (2011). Por último, es recomendable el estudio de la expresión de genes del sistema inmune utilizando RT-qPCR.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y a la Secretaría de Investigación y Posgrado del Instituto Politécnico Nacional (SIP-IPN) por el apoyo económico. Jesús Tomás Moreno Herrera agradece al CONACyT y a la SIP-IPN por las becas de maestría.

REFERENCIAS

- Antony, S.P., I.S.B. Singh, N.S. Sudheer, S. Vrinda, P. Priyaja & R. Philip. 2010. Molecular characterization of a crustin-like antimicrobial peptide in the giant tiger shrimp, *Penaeus monodon*, and its expression profile in response to various immunostimulants and challenge with WSSV. *Immunobiology*, 216: 184-194.
- Apún-Molina, J.P., A. Santamaría-Miranda, A. Luna-González, S.F. Martínez-Díaz & M. Rojas-Contreras. 2009. Effect of potential probiotic bacteria on growth and survival of tilapia *Oreochromis niloticus* L., cultured in the laboratory under high density and suboptimum temperature. *Aquacult. Res.*, 40: 887-894.
- Arala-Chávez, M. & T. Sequeira. 2000. Is there any kind of adaptive immunity in invertebrates? *Aquaculture*, 191: 247-258.
- Bachère, E., Y. Gueguen, M. Gonzalez, J. de Lorgeril, J. Garnier & B. Romestand. 2004. Insights into the antimicrobial defense of marine invertebrates: the penaeid shrimps and the oyster *Crassostrea gigas*. *Immunol. Rev.*, 198: 149-168.
- Bai, N., Z. Wenbing, M. Kangsen, X. Wang, W. Xu & H. Ma. 2010. Effects of discontinuous administration of β -glucan and glycyrrhizin on the growth and immunity of white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 306: 218-224.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248-254.
- Brock, J. & K.L. Main. 1994. A guide to the common problems and diseases of cultured *Penaeus vannamei*.

- World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, 242 pp.
- Burge, E.J., D.J. Madigan, L.E. Burnett & K.G. Burnett. 2007. Lysozyme gene expression by hemocytes of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, after injection with *Vibrio*. *Fish Shellfish Immun.*, 22: 327-339.
- Campa-Córdova, A.I., N.Y. Hernández-Saavedra, R. De Philippis & F. Ascencio. 2002. Generation of superoxide anion and SOD activity in haemocytes and muscle of American white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) as a response to beta-glucan and sulphated polysaccharide. *Fish Shellfish Immun.*, 12: 353-366.
- Capy, P., G. Gasperi, C. Biemont & C. Bazin. 2000. Stress and transposable elements: co-evolution or useful parasites? *Heredity*, 85: 101-106.
- Cerenius, L., B.L. Lee & K. Söderhäll. 2008. The proPO-system: pros and cons for its role in invertebrate immunity. *Trends Immunol.*, 29: 263-271.
- Chiu, C.C., Y.K. Guu, C.H. Liu, T.M. Pan & W. Cheng. 2007. Immune responses and gene expression in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, induced by *Lactobacillus plantarum*. *Fish Shellfish Immun.*, 23: 364-377.
- Dalmo, R.A. & J. Børgwald. 2008. Beta-glucans as conductors of immune symphonies. *Fish Shellfish Immun.*, 25: 384-396.
- De Lorgeril, J., Y. Gueguen, C. Goarant, E. Goyard, C. Mugnier, J. Fievet, D. Piquemal & E. Bachère. 2008. A relationship between antimicrobial peptide gene expression and capacity of a selected shrimp line to survive a *Vibrio* infection. *Mol. Immunol.*, 5: 3438-3445.
- Destoumieux, D., P. Bulet, J.M. Strub, A. Van Dorsselaer & E. Bachère. 1999. Recombinant expression and range of activity of penaeidins, antimicrobial peptides from penaeid shrimp. *Eur. J. Biochem.*, 266: 335-346.
- Doñate, C., J.C. Balasch, A. Callol, J. Bobe, L. Tort & S. MacKenzie. 2010. The effects of immunostimulation through dietary manipulation in the rainbow trout; evaluation of mucosal immunity. *Mar. Biotechnol.*, 12: 88-99.
- Fagutao, F.F., M.B.B. Maningas, H. Kondo, T. Aoki & I. Hirono. 2012. Transglutaminase regulates immune-related genes in shrimp. *Fish Shellfish Immun.*, 32: 711-715.
- Felix, S., P. Herald Robins & A. Rajeev. 2004. Immune enhancement assessment of dietary incorporated marine algae *Sargassum wightii* (Phaeophyceae/Punctariales) in tiger shrimp *Penaeus monodon* (Crustacea/Penaeidae) through prophenoloxidase (proPO) systems. *Indian J. Mar. Sci.*, 33: 361-364.
- Flegel, T.W. & T. Pasharawipas. 1998. Active viral accommodation: a new concept for crustacean response to viral pathogens. In: T.W. Flegel (ed.). *Advances in shrimp biotechnology*. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok, pp. 245-250.
- Flores-Miranda, M.C., A. Luna-González, A.I. Campa-Córdova, H.A. González-Ocampo, J.A. Fierro-Coronado & B.O. Partida-Arangure. 2011. Microbial immunostimulants reduce mortality in whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) challenged with *Vibrio sinaloensis* strains. *Aquaculture*, 320: 51-55.
- Gueguen, Y., J. Garnier, L. Robert, M.P. Lefranc, I. Mougnot & J. de Lorgeril. 2006. PenBase, the shrimp antimicrobial peptide penaeidin database: sequence based classification and recommended nomenclature. *Dev. Comp. Immunol.*, 30: 283-288.
- Guertler, C., D. Dias-Shleder, M.A. Barracco & L.M. Perazzolo. 2010. Comparative study of the intracellular superoxide anion production in different penaeid species through the NBT-reduction assay. *Aquacult. Res.*, 41: 1082-1088.
- Hernández-López, J., T. Gollas-Galván & F. Vargas-Albores. 1996. Activation of the prophenoloxidase system of the brown shrimp (*Penaeus californiensis* Holmes). *Comp. Biochem. Phys. C*, 113C: 61-66.
- Johansson, M.W. & K. Soderhall. 1989. Cellular immunity in crustaceans and the proPO system. *Parasitol. Today*, 5: 171-176.
- Kimura, T., K. Yamano, H. Nakano, K. Momoyama, M. Hiraoka & K. Inouye. 1996. Detection of penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV) by PCR. *Fish Pathol.*, 31: 93-98.
- Le Moullac, G., C. Soyez, D. Saulnier, D. Ansquer, J.C. Avarre & P. Levy. 1998. Effect of hypoxia stress on the immune response and the resistance to vibriosis of the shrimp *Penaeus stylirostris*. *Fish Shellfish Immun.*, 8: 621-629.
- Lin, Y.C., C.M. Tayag, C.L. Huang, W.C. Tsui & J.C. Chen. 2010. White shrimp *Litopenaeus vannamei* that had received the hot-water extract of *Spirulina platensis* showed earlier recovery in immunity and up-regulation of gene expressions after pH stress. *Fish Shellfish Immun.*, 29: 1092-1098.
- Lo, C.F., K.F. Lin, C.H. Ho, Y.L. Chu, C.H. Chen, P.Y. Yeh & S.E. Peng. 1997. Detection and tissue tropism of white spot syndrome baculo virus (WSBV) in captured brooders of *P. monodon* with a special emphasis on reproductive organs. *Dis. Aquat. Organ.*, 30: 53-72.
- Martín, G.G., J.E. Hose, S. Omori, C. Clong, T. Hoodbhoy & N. Mcbrell. 1991. Localization and roles of coagulation and transglutaminase in

- hemolymph coagulation in decapods crustaceans. *Comp. Biochem. Phys. B*, 100B: 517-522.
- Montaño-Pérez, K., T. Reyes-Izquierdo & F. Vargas-Albores. 1999. El proceso de coagulación en camarones penaeidos. *Ciencia*, 50: 23-28.
- Moriarty, D.J.W. 1999. Disease control in shrimp aquaculture with probiotic bacteria. In: C.R. Bell, M. Brylinsky & P. Johnson-Green (eds.). *Proceedings of the 8th International Symposium on Microbial Ecology*. Atlantic Canada Society for Microbial Ecology, Halifax, pp. 237-243.
- Muñoz, M., R. Cedeño, J. Rodríguez, W.P.W. Van der Knaap, E. Mialhe & E. Bachère. 2000. Measurement of reactive oxygen intermediate production in haemocyte of the penaeid shrimp, *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 191: 89-107.
- Peraza-Gómez, V., A. Luna-González, A.I. Campa-Córdova, J.A. Fierro-Coronado, H.A. González-Ocampo & J.C. Sainz-Hernández. 2011. Dietary microorganism and plant effects on the survival and immune response of *Litopenaeus vannamei* challenged with the white spot syndrome virus. *Aquacult. Res.*, 42: 559-570.
- Raa, J. 1996. The use of immunostimulatory substances in fish and shellfish farming. *Rev. Fish. Sci.*, 4: 229-288.
- Sajeevan, T.P., P. Rosamma & I.S. Bright Singh. 2009a. Dose/frequency: a critical factor in the administration of glucan as immunostimulant to Indian white shrimp, *Fenneropenaeus indicus*. *Aquaculture*, 287: 248-252.
- Sajeevan, T.P., D.W. Lowman, D.L. Williams, S. Selven, A. Anas & P. Rosamma. 2009b. Marine yeast diet confers better protection than its cell wall component (1-3)- β -D-glucan as an immunostimulant in *Fenneropenaeus indicus*. *Aquacult. Res.*, 40: 1723-1730.
- Sakai, M. 1999. Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture*, 172: 63-92.
- Söderhäll, K. & L. Cerenius. 1992. Crustacean immunity. *Ann. Rev. Fish Dis.*, 1: 2-21.
- Song, Y.L. & Y.T. Hsieh. 1994. Immunostimulation of tiger shrimp (*Penaeus monodon*) hemocytes for generation of microbiocidal substances: analysis of reactive oxygen species. *Dev. Comp. Immunol.*, 18: 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: 413-421.
- Spann, K.M., R.A. Donaldson, J.A. Cowley & P.J. Walker. 2000. Differences in the susceptibility of some penaeid prawn species to gill-associated virus (GAV) infection. *Dis. Aquat. Organ.*, 42: 221-225.
- Sritunyalucksana, K., K. Wongsuebsantati, M.W. Johansson & K. Söderhäll. 2001. Peroxinectin, a cell adhesive protein associated with the propo system from the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Dev. Comp. Immunol.*, 25: 353-363.
- Strickland, J.D.H. & T.R. Parsons. 1972. A practical handbook of seawater analysis. *Bull. Fish. Res. Bd. Can.*, 310 pp.
- Sung, H., Y. Yang & Y. Song. 1996. Enhancement of microbicid activity in the tiger shrimp *Penaeus monodon* via immunostimulation. *J. Crust. Biol.*, 16: 278-284.
- Supphantharika, M., P. Khunrae, P. Thanardkit & C. Verduyn. 2003. Preparation of spent brewers yeast β -glucans with a potential application as an immunostimulant for black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Bioresources Technol.*, 88: 55-60.
- Truscott, R. & K.N. White. 1990. The influence of metal and temperature stress on the immune system of crabs. *Funct. Ecol.*, 4: 455-461.
- Vargas-Albores, F., M.A. Guzmán-Murillo & J.L. Ochoa. 1993. An anticoagulant solution for haemolymph collection and prophenoloxidase studies of penaeid shrimp (*Penaeus californiensis*). *Comp. Biochem. Phys. A*, 106: 299-303.
- Vidal, O.M., C.B. Granja, F. Aranguren, J.A. Brock & M. Salazar. 2001. A profound effect of hyperthermia on survival of *Litopenaeus vannamei* juveniles infected with white spot syndrome virus. *J. World Aquacult. Soc.*, 32: 364-372.
- Wang, Y.C., P.S. Chang & H.Y. Chen. 2007. Tissue expressions of nine genes important to immune defence of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immun.*, 23: 1161-1177.
- Wang, K.H.C., C.W. Tseng, H.Y. Lin, I.T. Chen, Y.H. Chen, Y.M. Chen, T.Y. Chen & H.L. Yang. 2010. RNAi knock-down of the *Litopenaeus vannamei* Toll gene (LvToll) significantly increases mortality and reduces bacterial clearance after challenge with *Vibrio harveyi*. *Dev. Comp. Immunol.*, 34: 49-58.
- Yeh, M.S., Y.L. Chen & I.H. Tsia. 1998. The hemolymph clottable proteins of tiger shrimp, *Penaeus monodon*, and related species. *Comp. Biochem. Phys. B*, 121B: 169-176.
- Zar, J.H. 1996. *Biostatistical analysis*. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, 662 pp.
- Ziaei-Nejad, S., M.H. Rezaei, G.A. Takami, D.L. Lovett, A.R. Mirvaghefi & M. Shakouri. 2006. The effect of *Bacillus* spp. bacteria used as probiotics on digestive enzyme activity, survival and growth in the Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus*. *Aquaculture*, 252: 516-524.