

**Universidad Nacional
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Escuela de Ciencias Biológicas
Licenciatura en Biotecnología**

Informe Escrito Final

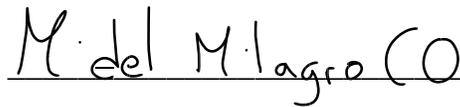
**Evaluación del uso del nematodo *Panagrolaimus* sp. enriquecido con
β-glucanos en el desempeño zootécnico y la respuesta inmune del camarón
Litopenaeus vannamei durante los primeros estadios larvales**

**Pasantía presentada como requisito parcial para optar al grado de
Licenciatura en Biotecnología**

B.Sc. Ana Yanci Jiménez Herra

**Campus Omar Dengo
Heredia, Costa Rica
2021**

Este trabajo de graduación fue Aprobado por el Tribunal Examinador de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional, como requisito parcial para optar por el grado de Licenciatura en Biología con Énfasis en Biotecnología.



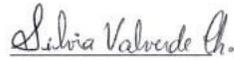
M.Sc. Milagro Carvajal Oses

Representante, Decano, quién preside



Dra. Laurence Mercier

Tutor



M.Sc. Silvia Valverde Chavarría Asesor



M.Sc. Jonathan Chacón Guzmán

Invitado especial

Agradecimientos

Al proyecto SEP-CONACyT (#220642) por financiar esta investigación, así como a las empresas “e-nema” por proporcionar los nematodos y a “Blue Genetics de México, SA de CV” por donar un probiótico que elaboran y usan durante el cultivo larvario del camarón *Litopenaeus vannamei*.

Al CIBNOR y al Laboratorio Húmedo de Nutrición Acuícola por todas las facilidades otorgadas para realizar esta investigación. Al grupo de Inmunología y Vacunología, en particular a la Dra. Martha Reyes Becerril y a Kevin Guerra Contreras, por su apoyo en la infección de las postlarvas de camarón con el *Vibrio parahaemolyticus*.

Al Dr. Laurent Seychelles de la empresa “e-nema” por sus valiosos consejos y ser un colaborador activo de esta investigación.

Un agradecimiento especial a Julio Alberto Ayala Aguilar y Sandra de la Paz Reyes por su apoyo en la realización del bioensayo. También a los técnicos Julian Garzón, Adriana Green, Olivia Arjona y María Dolores Rondero Astorga.

Agradezco profundamente a la Dra. Laurence Stéphanie Mercier por todo el apoyo brindado a pesar de las adversidades. Sin duda alguna de no ser por su iniciativa, motivación, paciencia, sabiduría, entrega y guía; no hubiese culminado esta investigación. Gracias por sus acertados y oportunos comentarios, por siempre demostrar la mejor de las intenciones y procurar que obtuviera un aprendizaje de calidad. Le agradezco infinitamente el siempre estar ahí y enseñarme tanto, aún a la distancia.

Un cordial agradecimiento a la Dra. Rosa María Morelos por enriquecer este trabajo con todo su conocimiento y experiencia. Gracias por su paciencia y dedicación durante mi entrenamiento, y por la disposición brindada durante todo el proyecto.

Gracias a la M.Sc. Silvia Valverde Chavarría por toda su ayuda para que finalmente pudiera realizar este trabajo. Agradezco infinitamente sus observaciones, recomendaciones y el apoyo brindado durante este proceso.

A todas aquellas personas que de alguna u otra manera estuvieron presentes en el desarrollo de mi vida profesional. A todos los que ya no están, y a esos que me siguen apoyando hasta en los últimos momentos.

Dedicatoria

A mi pequeña familia...

Nota aclaratoria

Cabe destacar que, debido a la situación de emergencia sanitaria causada por el virus SARS-CoV-2, fue imposible que la estudiante Ana Yanci Jiménez Herra pudiera realizar la parte experimental de su trabajo de pasantía en el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. en México. Por esta razón, se utilizaron datos en bruto de un bioensayo realizado entre julio-septiembre 2019 por parte de su comité asesor. No obstante, es importante mencionar que la estudiante recibió mentorías semanales durante tres meses para conocer a fondo las técnicas utilizadas y la metodología empleada durante dicho bioensayo. Lo anterior con el fin de poder analizar e interpretar los datos brindados y escribir en su totalidad este Informe Final.

Índice

Miembros del Tribunal.....	I
Agradecimientos	I
Dedicatoria	III
Nota aclaratoria.....	IV
Índice.....	V
Índice de cuadros.....	VII
Índice de figuras.....	VIII
Abreviaturas o acrónimos	IX
Resumen.....	XI
1. Introducción	12
1.1 Antecedentes	12
1.2 Justificación.....	15
1.3 Planteamiento del problema a investigar	16
1.4 Objetivos	16
1.4.1 Objetivo general.....	16
1.4.2 Objetivos específicos	16
2. Marco teórico.....	17
2.1 Aspectos generales del camarón blanco del Pacífico.....	17
2.2 Alimentación en la larvicultura del camarón	20
2.2.1 La <i>Artemia</i>	20
2.2.2 <i>Panagrolaimus</i> sp.	21
2.2.3 Los inmunoestimulantes	22
2.3 Desarrollo del sistema inmune en larvas de <i>L. vannamei</i> y expresión génica	24
2.3.1 Desarrollo del sistema inmune en larvas de <i>L. vannamei</i>	24
2.3.2 Expresión génica del sistema inmune	26
3. Marco Metodológico.....	27
3.1 Diseño experimental y alimentación de las larvas	27
3.2 Muestreo y análisis de muestras.....	32
3.3 Reto bacteriano.....	32
3.3.1 Reactivación de un inóculo de <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	32
3.3.2 Preparación del cultivo de <i>V. parahaemolyticus</i> para el día del reto bacteriano	32

3.3.3	Cuantificación de células viables.....	33
3.3.4	Reto bacteriano con las PL 3	33
3.3.5	Tratamiento de residuos y comprobación de espacio libre de <i>Vibrio</i>	34
3.4	Expresión génica	35
3.4.1	Extracción de ARN total y síntesis de ADN complementario.....	35
3.4.2	Evaluación de la estabilidad de los genes de referencia para la normalización de la expresión de los genes blanco.....	36
3.4.3	Análisis de la expresión relativa de genes blanco en los grupos de larvas	37
3.5	Análisis estadísticos	38
4.	Resultados.....	39
4.1	Longitud total y supervivencia de las postlarvas después de 12 días de alimentación con tres diferentes dietas.....	39
4.2	Supervivencia de las postlarvas después de ser sometidas por 24 h a un reto bacteriano con <i>V. parahaemolyticus</i>	41
4.3	Expresión relativa de los genes blanco que codifican para las proteínas relacionadas con el sistema inmune en PL 3 de <i>L. vannamei</i>	43
4.3.1	Estabilidad de los genes de referencia utilizados en la normalización de la expresión de los genes blanco.....	43
4.3.2	Expresión relativa de los genes blanco después del bioensayo	43
4.3.3	Expresión relativa de los genes blanco después de 12 días de alimentación y una posterior exposición a <i>V. parahaemolyticus</i>	47
5.	Discusión.....	50
5.1	Desempeño zootécnico de las larvas alimentadas con <i>Panagrolaimus</i> sp. enriquecidos con β -glucanos	50
5.2	Supervivencia de las larvas después de ser expuestas por 24 h a un reto bacteriano con <i>V. parahaemolyticus</i>	52
5.3	Expresión de genes en las larvas alimentadas durante 12 días con <i>Panagrolaimus</i> sp. enriquecidos con dos diferentes β -glucanos:	53
5.4	Expresión de genes en las larvas alimentadas durante 12 días con <i>Panagrolaimus</i> sp. enriquecidos con dos diferentes β -glucanos y retadas con <i>V. parahaemolyticus</i> :	55
6.	Conclusiones y recomendaciones	56
7.	Referencias.....	57

Índice de cuadros

Cuadro 1.	Clasificación taxonómica de <i>Litopenaeus vannamei</i>	17
Cuadro 2.	Protocolo de alimentación de las larvas de <i>Litopenaeus vannamei</i> durante el bioensayo.....	30
Cuadro 3.	Genes de referencia utilizados para la normalización de estabilidad de los genes blanco en postlarvas de <i>Litopenaeus vannamei</i>	36
Cuadro 4.	Cebadores para el análisis de la expresión relativa de genes blanco en postlarvas de <i>Litopenaeus vannamei</i>	37

Índice de figuras

Figura 1.	Morfología externa de un camarón peneido.....	18
Figura 2.	Ciclo de vida del camarón.....	18
Figura 3.	Estadios larvales de un camarón peneido.....	19
Figura 4.	Sistema experimental.....	28
Figura 5.	Morfología de un nauplio V.....	28
Figura 6.	Reto de las postlarvas de <i>Litopenaeus vannamei</i> (PL 3) con <i>Vibrio parahaemolyticus</i> durante 24 h.....	34
Figura 7.	Longitud total (promedio \pm error estándar, EE) de PL 3 de <i>Litopenaeus vannamei</i> después de ser alimentadas durante 12 días con tres diferentes dietas.....	40
Figura 8.	Supervivencia (promedio \pm EE) de PL 3 de <i>Litopenaeus vannamei</i> después de ser alimentadas durante 12 días con tres diferentes dietas.....	40
Figura 9.	Registro de la supervivencia (promedio) de las PL 3 de <i>Litopenaeus vannamei</i> después de ser expuestas 1, 3, 6, 12, 18 y 24 h al <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	42
Figura 10.	Supervivencia (promedio \pm EE) de PL 3 de <i>Litopenaeus vannamei</i> después de ser expuestas a un reto bacteriano con <i>Vibrio parahaemolyticus</i> durante 24 h...	42
Figura 11.	Estabilidad estimada de los genes de referencia utilizando el programa RefFinder.....	43
Figura 12.	Expresión relativa (promedio \pm EE) de los genes del sistema inmune (cMn-SOD, CAT, GPX) analizados en larvas de <i>Litopenaeus vannamei</i> después de ser alimentadas durante 12 días con tres diferentes dietas.....	45
Figura 13.	Expresión relativa (promedio \pm EE) de los genes del sistema inmune (proFO I, CP, TRAF6) analizados en larvas de <i>Litopenaeus vannamei</i> después de ser alimentadas durante 12 días con tres diferentes dietas.....	46
Figura 14.	Expresión Relativa (promedio \pm EE) de los genes analizados (cMn-SOD, CAT, GPX) en PL 4 de <i>Litopenaeus vannamei</i> después de ser alimentadas con diferentes dietas y expuestas a un reto bacteriano durante 24 h.....	48
Figura 15.	Expresión Relativa (promedio \pm EE) de los genes analizados (proFO I, CP, TRAF6) en PL 4 de <i>Litopenaeus vannamei</i> después de ser alimentadas con diferentes dietas y expuestas a un reto bacteriano durante 24 h.....	49

Abreviaturas o acrónimos

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
ANDEVA	Análisis de varianza
ARA	Ácido araquidónico (20:4n-6), del inglés “arachidonic acid”
ARN	Ácido ribonucleico
CIBNOR	Centro de Investigaciones Biológicas del Noreste, S. C.
CP	Proteína coaguladora, del inglés “clotting protein”
Cq	Ciclo de cuantificación, del inglés “quantification cycle”
CR	Cantidades relativas
DHA	Ácido docosahexaenoico (22:6n-3), del inglés “docosahexaenoic acid”
E	Eficiencia de amplificación
EE	Error estándar
ef	Factor de elongación, del inglés “elongation factor”
EPA	Ácido eicosapentaenoico (20:5n-3), del inglés “eicosapentaenoic acid”
ER	Expresión relativa
FO	Fenoloxidasa
HUFA	Ácidos grasos altamente insaturados, del inglés “highly unsaturated fatty acids”
nF	Factor de normalización, del inglés “normalization factor”
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos, del inglés “pathogen-associated molecular patterns”
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa, del inglés “polymerase chain reaction”
PL	Postlarvas
proFO	Profenoloxidasa

qPCR	PCR cuantitativa, del inglés “quantitative polymerase chain reaction”
SOD	Superóxido dismutasa
T	Gen objetivo, del inglés “target gene”
Ubi	Ubiquitina
UNA	Universidad Nacional
LPS	Lipopolisacáridos

Resumen

La producción de postlarvas (PL) del camarón *Litopenaeus vannamei* sigue dependiendo de la *Artemia* como alimento vivo. La sustitución del 75% de nauplios de *Artemia* por el nematodo *Panagrolaimus* sp. mostró ser viable en los primeros estadios larvales. Este nematodo puede ingerir macromoléculas y ser vector de sustancias inmunoestimulantes. El objetivo de esta investigación fue evaluar el uso de *Panagrolaimus* sp. enriquecido con β -glucanos en la alimentación larvaria de *L. vannamei*. Tres dietas fueron suministradas durante 12 días: 1- 100% *Artemia* (100A, control); 2- 75% nematodos enriquecidos con β -glucano extraído de *Debaryomyces hansenii* + 25% de *Artemia* (75GD); 3- 75% de nematodos enriquecidos con β -glucano obtenido de *Laminaria digitata* + 25% de *Artemia* (75GL). Finalizando el bioensayo, se midieron la longitud total, supervivencia y expresión de genes del sistema inmune (superóxido dismutasa [cMn-SOD], proteína de coagulación [CP], glutatión peroxidasa [GPX], profenoloxidasa I [proFO I], catalasa [CAT], factor 6 asociado al receptor del factor de necrosis tumoral [TRAF6]) de las PL. Posteriormente, las PL 3 fueron sometidas al *Vibrio parahaemolyticus* durante 24 h y la supervivencia y expresión génica fueron nuevamente cuantificadas. Los resultados mostraron que las PL 3 del tratamiento 75GD fueron significativamente más pequeñas y presentaron una menor supervivencia ($15.3 \pm 4.7\%$) que las de los tratamientos 100A y 75GL ($35.7 \pm 5.6\%$ y $37.7 \pm 10.4\%$, respectivamente). Los genes CAT y GPX tuvieron una expresión relativa significativamente mayor en las postlarvas alimentadas con 75GD comparado con 100A y 75GL (únicamente GPX). Respecto al reto, la supervivencia (control y estrés) fue significativamente mayor en las postlarvas alimentadas con 75GL y 100A. Las PL 4 del tratamiento 75GD presentaron niveles de expresión génica casi nulos mientras que las del tratamiento 75GL se comportaron como el control, excepto para el gen CP. Diferencias en la estructura y concentración efectiva de los β -glucanos pueden explicar los resultados. Las postlarvas alimentadas con 75GD parecen haberse encontrado en un estado de “fatiga inmune” ya que presentaron señales de desgaste y debilidad.

1. Introducción

La alimentación representa un factor determinante en la producción de postlarvas de camarón y los altos costos asociados comprometen en ocasiones la competitividad del sector camaronícola. Pese a las investigaciones realizadas, no se cuenta con un alimento de bajo costo, sostenible y libre de patógenos, que supla las necesidades nutricionales de las larvas de camarón y que produzca un desarrollo similar o mejor al obtenido con el uso de la *Artemia*, la presa viva actualmente utilizada en los laboratorios de producción. Considerando las variaciones en el abastecimiento de quistes de *Artemia* para la industria acuícola y los altos precios, así como la incidencia de las enfermedades en el cultivo larvario del camarón *Litopenaeus vannamei*, es necesario la prospección de nuevos alimentos que promuevan un adecuado crecimiento y desarrollo de estos organismos.

1.1 Antecedentes

Desde hace varias décadas y hasta la actualidad, la mayoría de los laboratorios de producción de camarones peneidos utilizan *Artemia* como presa viva en combinación con alimentos inertes comerciales (Wickins y Lee, 2002; Medina López, 2012). Los quistes deshidratados de *Artemia* se venden enlatados y solamente requieren rehidratarse durante 18 – 24 horas para obtener los nauplios (primer estado larvario de esta presa) y suministrarlos a las larvas de camarón (Wickins y Lee, 2002). El nauplio de *Artemia* se suministra usualmente a partir del estadio mysis I del camarón; cuando éste es más grande, la *Artemia* se combina con alimento microparticulado o se enriquece con ácidos grasos altamente insaturados (HUFA, por sus siglas en inglés), tales como el ácido docosahexaenoico (22:6n-3; DHA), ácido eicosapentaenoico (20:5n-3; EPA) y ácido araquidónico (20:4n-6; ARA) (Rees et al., 1994).

No se conoce de manera precisa el volumen actual de la producción de *Artemia* a nivel mundial; sin embargo, los datos más actualizados mencionan que los principales países de producción de quistes de *Artemia* son: EU, China, Rusia y Kazajstán (Litvinenko et al., 2015). Entre 2012 y 2014, la producción de *Artemia* en estos países fue estimada entre 2,950 – 3,950 toneladas (Litvinenko et al., 2015). Sin embargo, su producción y precio son impredecibles ya que varían en función de condiciones ambientales temporales como es el fenómeno del “Niño” (Stock y Gervais, 2011). En la última década, se ha reportado que algunos laboratorios de producción de

postlarvas de camarón en Vietnam (país dentro de los primeros productores de camarón a nivel mundial) no pudieron llegar a sus metas de producción debido a la escasez de quistes de *Artemia* y los altos precios, superando los € 150/kg (Gervais y Zeigler, 2013). Adicionalmente, las artemias pueden acumular altos niveles de metales pesados y contener agentes potencialmente patógenos para las larvas en cultivo (Andreatta y Rosas, 2006).

Las enfermedades representan un desafío importante para los laboratorios de producción de larvas de camarón y pueden comprometer la disponibilidad de postlarvas para la etapa de engorda, además de generar grandes pérdidas económicas. Durante el desarrollo larvario, las enfermedades de origen bacteriano predominan y han sido consideradas como los principales causantes de mortalidades (Gómez Gil et al., 2001). Bacterias del género *Vibrio* (principalmente *V. harveyi*, *V. splendidus* y *V. alginolyticus*) son responsables de las enfermedades causadas por bacterias luminiscentes y “bolitas blancas”, las cuales se caracterizan por alteraciones del sistema digestivo que conducen a la muerte de las larvas (Gómez Gil et al., 2001). El síndrome de zoea II es otra enfermedad de origen bacteriano que afecta a los laboratorios de producción de postlarvas de camarón (Kumar et al., 2017). El *V. alginolyticus* ha sido detectado en organismos presentando los signos clínicos de esta enfermedad (Vandenbergh et al., 1999; Kumar et al., 2017) sin que su participación sea claramente establecida. Además de estos patógenos, varios hongos (*Lagenidium* spp. y *Sirolopidium* spp.) y protozoarios (*Zoothamnium* y *Vorticella*) provocan altas y rápidas mortalidades larvarias (Gómez Gil et al., 2001; Karunasagar et al., 1998).

Desde hace varias décadas, la industria camaronícola busca reducir su dependencia por la *Artemia*, usando alimento artificial u otra presa viva en la alimentación larvaria. Hasta la fecha, los intentos realizados con alimentos formulados han mostrado resultados no completamente satisfactorios ya que las larvas alimentadas únicamente con dichos alimentos presentaron un menor desarrollo comparado con larvas nutridas con *Artemia* (Kurmary et al., 1989; D’Abramo et al., 2006). Después de suministrar 100% de un alimento inerte comercial a larvas de *L. vannamei*, desde mysis I hasta los primeros estadios postlarvales (PL 1 – PL 5), Gamboa-Delgado y Le Vay (2009) reportaron una supervivencia, crecimiento y desarrollo significativamente menor comparado con los obtenidos en larvas alimentadas con nauplios de *Artemia*. Dicho estudio demostró que solamente el 50% de sustitución de la *Artemia* era factible al usar esta dieta comercial. Trabajos similares, con otras especies de camarón, han encontrado un desarrollo larvario más rápido cuando las presas vivas (principalmente la *Artemia*) eran suministradas solas

o en combinación con un alimento inerte (*L. setiferus*, Gaxiola et al., 2002; *Farfantepenaeus aztecus*, Robinson et al., 2005). Por lo anterior, todavía existe una gran demanda de nuevas presas vivas y alimentos inertes que pueden reemplazar el uso de la *Artemia* en el cultivo larvario del camarón blanco del Pacífico.

A partir de los años 80s, los nematodos fueron identificados como organismos con gran potencial para la larvicultura de crustáceos y peces, ya que pueden ser reproducidos rápidamente usando técnicas muy simples e ingredientes poco costosos que están disponibles todo el año (Brüggemann, 2012). Además, tienen una talla pequeña que les permite ser ingeridos por larvas y son tolerantes a amplios intervalos de temperatura y salinidad (Brüggemann, 2012). Aunque el valor nutritivo de los nematodos varía en función de la especie y está influenciado por el medio de cultivo, es importante mencionar que su perfil nutricional en proteínas y lípidos es muy parecido al de la *Artemia* (Rouse et al., 1992). Otra característica interesante de los nematodos es que pueden ser enriquecidos fácilmente con HUFA (Schlechtriem et al., 2004) y otras sustancias químicas como hormonas, inmunoestimulantes y antibióticos (Brüggemann, 2012). Estas dos últimas sustancias son comúnmente usadas en la camaronicultura para prevenir o tratar infecciones bacterianas.

Investigaciones recientes han mostrado que el nematodo *Panagrolaimus* sp. (cepa NFS-24-5) puede ser utilizado en la alimentación larvaria de *L. vannamei*. Seychelles et al. (2017) reportaron que el reemplazo de *Artemia* con 75% de este nematodo enriquecido con la emulsión comercial S.presso® no afectó el desempeño zootécnico (supervivencia, peso seco y longitud total) de las larvas mysis I y postlarvas 1 (PL 1), a excepción de una menor longitud total observada en las PL 1. Este mismo equipo de trabajo cultivó larvas de camarón blanco del Pacífico desde zoea II hasta PL 6, suministrando 100% de *Panagrolaimus* sp. enriquecido o no enriquecido en DHA con el dinoflagelado *Cryptocodinium cohnii* (Seychelles et al., 2018). Las mysis I alimentadas con nematodos fueron 300 µm más largas que aquellas mantenidas con nauplios de *Artemia*. Esa diferencia fue atribuida a la distribución de los nematodos dos días antes de la *Artemia* en el protocolo de alimentación, debido a que *Panagrolaimus* sp. presenta un menor tamaño. Dicho incremento en la longitud total no se observó en PL 1. Con PL 6, no se encontraron diferencias significativas en el desempeño zootécnico entre las postlarvas alimentadas con los nematodos enriquecidos con *C. cohnii* y aquellas del tratamiento control. Respecto a la sustitución del nauplio de *Artemia* por *Panagrolaimus* sp. entre zoea II y PL 1, los trabajos realizados por

Ayala Aguilar (2019) y López Galicia (2020) apoyan más un reemplazo parcial del 75% que uno total. Adicionalmente, Ayala Aguilar (2019) observó que las larvas de camarón parecen aprovechar mejor los nematodos de tallas grandes (800 – 1200 μm) que los pequeños (200 – 800 μm), debido probablemente a su mayor aporte nutricional. López Galicia (2020) detectó un incremento en la expresión génica de algunas enzimas digestivas como son la amilasa, lipasa, quimotripsina y tripsina cuando las larvas de camarón fueron alimentadas una vez al día con *Panagrolaimus* sp, en comparación con larvas cultivadas con *Artemia* distribuida con la misma frecuencia. Sin embargo, la expresión de los genes de amilasa y tripsina disminuyó cuando las larvas fueron alimentadas con *Panagrolaimus* sp. tres veces al día, mostrando que esta frecuencia de alimentación es más adecuada.

1.2 Justificación

El éxito en la producción de postlarvas de camarón recae principalmente en su alimentación y su susceptibilidad a algunas enfermedades bacterianas. Dentro de estas últimas, las infecciones provocadas por *Vibrio* sp. son las más recurrentes y perjudiciales, pudiendo causar hasta 100% de mortalidad.

Hoy en día, la producción comercial de postlarvas de *L. vannamei* sigue dependiendo del uso de la *Artemia* como alimento vivo. Pese a múltiples intentos en la búsqueda de un alimento sustituto, no se cuenta con una dieta viva o inerte que produzca un desarrollo larvario similar o mejor al obtenido con el uso de la *Artemia*. La gran demanda de esta presa a nivel mundial difícilmente podrá ser satisfecha por su producción actual si el crecimiento anual de la acuicultura sigue aumentando con la misma tasa.

Investigaciones realizadas por Seychelles et al. (2017), Ayala Aguilar (2019) y López Galicia (2020) mostraron que la sustitución del 75% de *Artemia* por el nematodo *Panagrolaimus* sp. es viable, aunque se observaron algunas diferencias en el desempeño zootécnico (principalmente la longitud total) y la composición bioquímica (contenido de glucógeno) de PL 1. Este nematodo es libre de patógenos y contaminantes, de fácil uso, rico en ácidos grasos altamente insaturados y puede ser suplementado con sustancias inmunoestimulantes que pueden ayudar a las larvas a resistir infecciones bacterianas.

Basado en todo lo anterior, este trabajo pretende evaluar si el enriquecimiento del nematodo *Panagrolaimus* sp. con un inmunoestimulante puede inducir una respuesta en la expresión de genes del sistema inmune en postlarvas de *L. vannamei* y mejorar su resistencia ante una infección por un *Vibrio* sp.

1.3 Planteamiento del problema a investigar

La capacidad de *Panagrolaimus* sp. para ingerir macromoléculas lo convierten en un vector potencial de sustancias inmunoestimulantes de origen microbiano, las cuales podrían ser transmitidas a las postlarvas de camarón y fortalecerlas ante una infección bacteriana. La presente investigación pretende responder a la siguiente pregunta: ¿El enriquecimiento de *Panagrolaimus* sp. con β -glucanos puede inducir una “alerta inmunitaria” en las postlarvas de *L. vannamei* y mejorar su resistencia ante una infección bacteriana? De ser así, el uso de este nematodo podría presentar una ventaja adicional en la alimentación larval y postlarval de *L. vannamei* respecto al uso de la *Artemia*. Cabe destacar que no existen investigaciones previas sobre el enriquecimiento de *Panagrolaimus* sp. con β -glucanos, razón por la cual la presente investigación usará dos β -glucanos diferentes y verificará si inducen el mismo efecto inmunoestimulador en postlarvas de *L. vannamei*.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Evaluar el uso del nematodo *Panagrolaimus* sp. suplementado con β -glucanos para la posible sustitución de la *Artemia* en la alimentación larval y primeros estadios postlarvales de *L. vannamei*, a través del análisis del desempeño zootécnico, la expresión génica de su sistema inmune y resistencia ante una infección bacteriana.

1.4.2 Objetivos específicos

1. Determinar la longitud total y supervivencia de postlarvas de *L. vannamei* alimentadas con el nematodo *Panagrolaimus* sp. suplementado con β -glucano proveniente de dos fuentes diferentes.

2. Evaluar la resistencia de postlarvas de *L. vannamei* sometidas a una infección con *Vibrio parahaemolyticus* y previamente alimentadas con el nematodo *Panagrolaimus* sp. enriquecido con β -glucano proveniente de dos fuentes diferentes.
3. Analizar la expresión de genes del sistema inmune de postlarvas de *L. vannamei* antes y después de ser expuestas a *Vibrio parahaemolyticus*, y previamente alimentadas con el nematodo *Panagrolaimus* sp. enriquecido con β -glucano proveniente de dos fuentes diferentes.

2. Marco teórico

2.1 Aspectos generales del camarón blanco del Pacífico

El camarón blanco es un crustáceo endémico del Océano Pacífico que se distribuye desde el Golfo de California hasta Perú (Barón-Sevilla et al., 2004). Este crustáceo es un decápodo que pertenece a la familia Penaeidae. En el Cuadro 1, se muestra la clasificación taxonómica de *L. vannamei*.

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de *Litopenaeus vannamei* (Fuente: Pérez-Farfante y Kensley, 1997).

Phylum	Arthropoda
Clase	Malacostraca
Orden	Decapoda
Familia	Penaeidae
Género	<i>Litopenaeus</i>
Especie	<i>vannamei</i>

Como se observa en la Figura 1, los camarones peneidos se caracterizan por poseer un cuerpo alargado y comprimido lateralmente que se divide en cefalotórax, abdomen y telson. En el cefalotórax, se encuentran dos pedúnculos oculares, un rostro que contiene espinas que permiten la diferenciación entre especies (Cabrera, 1991). Su dimorfismo sexual se caracteriza por la presencia del petasma en machos y el télico en las hembras (Pérez Farfante, 1988).

Específicamente, *L. vannamei* se diferencia por su apariencia blanca translúcida con tonos azulados cerca del telson y los urópodos, y sus patas color blanco (Dall, 1990).

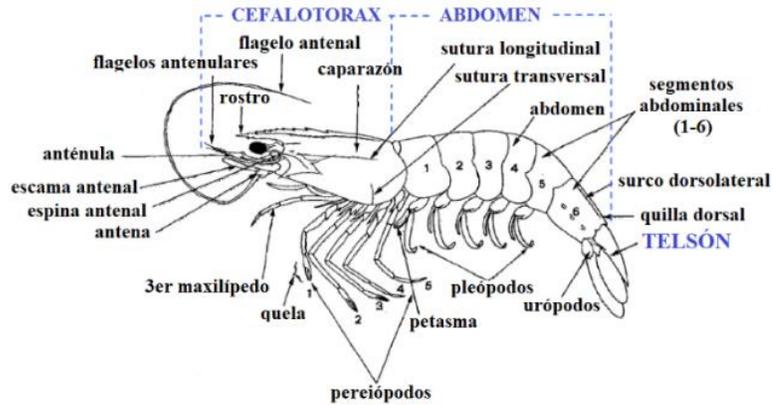


Figura 1. Morfología externa de un camarón peneido
(Fuente: Food and Agriculture Organization [FAO], 1995)

El ciclo de vida del camarón *L. vannamei* inicia con la reproducción de los adultos en la plataforma continental (Figura 2). Los huevos fecundados eclosionan en larvas, las cuales se desarrollan y son transportadas por las corrientes marinas a la zona costera (Gracia et al., 1997). La fase juvenil es principalmente estuarina y los adultos migran a aguas más profundas donde alcanzan su madurez sexual (Vinh, 2017). Los adultos tienen hábitos oceánicos donde se reproducen completando así el ciclo de vida (Dugassa y Gaetan, 2018).

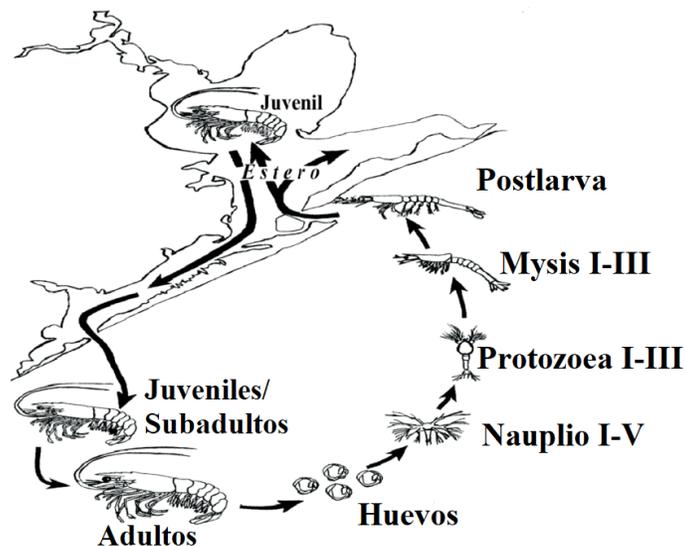


Figura 2. Ciclo de vida del camarón (Fuente: López-Martínez, 2008)

El desarrollo larvario de los camarones peneidos consta de cuatro estadios morfológicos: nauplio, protozoa o zoea, mysis y postlarva (Dall, 1990; Figura 3). Cada etapa larvaria cuenta con varios subestadios y tiene una duración de aproximadamente diez días a partir de la eclosión del huevo. El estadio nauplio es el primero en presentarse y tiene una duración de dos días durante los cuales la larva pasa por cinco subestadios (Treece y Yates, 1988). En este proceso los organismos se nutren de su reserva embrionaria y se caracterizan por ser fototáxicos positivos (Bray y Lawrence, 1992). En la etapa protozoal o zoeal, la alimentación varía y se convierten en larvas fitófagas (Bray y Lawrence, 1992). Esta etapa tiene una duración de cuatro a cinco días donde se presentan tres subestadios (Kitani, 1986). Posteriormente se presenta la mysis donde el organismo cambia nuevamente su dieta y muestra una tendencia por alimentarse de algas y pequeños organismos; dicho estadio tiene una duración de tres a cuatro días pasando por tres subestadios (Gracia et al., 1997). Se les designa como postlarvas a los organismos que concluyen la etapa de mysis. La postlarva tiene la apariencia de un camarón adulto y generalmente se encuentra en el fondo de la columna de agua o puede estar adherida a las paredes de los tanques (Dall, 1990; Kitani, 1993). Los días que transcurren después de la metamorfosis mysis – postlarva se suman para designar en qué etapa de desarrollo está la postlarva. Por ejemplo, una PL 3 es aquel animal que ha crecido tres días después de dicha metamorfosis. Después de sucesivas mudas, las postlarvas se transforman en juveniles (Kitani, 1986).

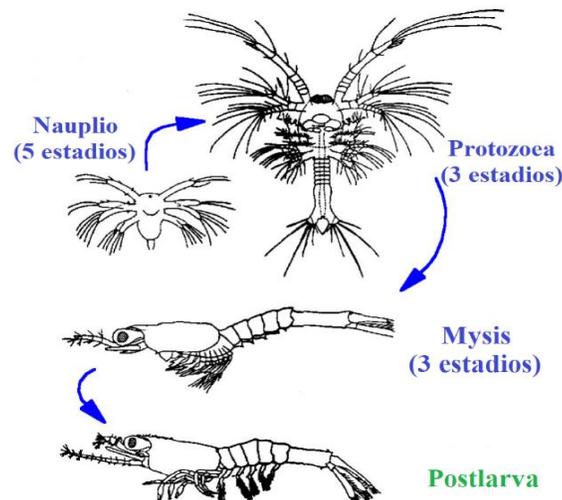


Figura 3. Estadios larvales de un camarón peneido
(Fuente: Fenucci, 1988)

2.2 Alimentación en la larvicultura del camarón

La larvicultura del camarón se realiza en laboratorios destinados específicamente para este fin, los cuales generalmente se encuentran divididos en maduración de reproductores, cultivo larvario, unidad de maternización y producción de alimento vivo (microalgas y *Artemia*) (AQUATECNOLOGÍA S.A., 2009). Una vez eclosionados los huevos fecundados de camarón, los nauplios son trasladados a los tanques de producción donde permanecen hasta convertirse en postlarvas PL 10 o PL 15, aproximadamente. Durante todo este periodo la alimentación se basa en una combinación de presas vivas (microalgas y *Artemia*) y dietas artificiales; la cantidad administrada aumenta con el paso de los días y conforme incrementa el crecimiento larval.

2.2.1 La *Artemia*

La *Artemia* es un organismo filtrador no selectivo que se alimenta de materia orgánica particulada, así como de pequeños organismos vivos (Reeve, 1963). Se encuentra representada a nivel mundial por al menos seis especies bisexuales (FAO, 1986) y habita aguas hipersalinas de hasta 110 ups (Vanhaecke et al., 1987). Su reproducción puede ser tanto sexual como partenogenética (Vanhaecke et al., 1987) y una hembra puede producir de 100 a 300 huevos por desove (Sugumar, 2010). Ante la presencia de condiciones ambientales adversas, los huevos se convierten en quistes que pueden permanecer en estado de latencia (Sorgeloos, 1980). Esta característica ha favorecido la comercialización y uso de la *Artemia* como alimento vivo en la industria acuícola ya que los quistes pueden ser almacenados durante un periodo largo (de varios meses a algunos años) (Clegg, 1997) y rehidratados durante aproximadamente 24 h para obtener los nauplios (Sorgeloos, 1980). Los nauplios de *Artemia* recién eclosionados presentan un perfil bromatológico constituido principalmente por proteínas (50.6 – 77.8%), carbohidratos (3.6 – 6.9%) y lípidos (11.2 – 18%) (García-Ortega et al., 1998).

La producción de *Artemia* se localiza principalmente en Norteamérica, Asia y algunas regiones de Sudamérica (Muñoz y Pacios, 2010). Los cambios ambientales temporales afectan dicha producción y las fluctuaciones provocan la variación del costo de los quistes, generando una incertidumbre económica para los acuicultores y un incremento en sus gastos de producción en repetidas ocasiones.

2.2.2 *Panagrolaimus* sp.

Panagrolaimus sp. (cepa NFS-24-5) es un nematodo terrestre de vida libre, principalmente bacterívoro, de cuerpo cilíndrico y alargado que mide entre 176 – 1377 μm de longitud y de 8 a 61 μm de diámetro (Honnens y Ehlers, 2013b). Adicionalmente, tiene la capacidad de permanecer activo durante 24 h en agua de mar y puede sobrevivir a una desecación moderada, al entrar en anhidrobiosis (Shannon et al., 2005; Honnens et al., 2013). El análisis de la cutícula de *Caenorhabditis elegans*, un nematodo de la misma familia que *Panagrolaimus* sp. mostró que contiene 80% de colágeno y 20% de cuticlinas, glicoproteínas y lípidos (Page y Johnstone, 2007). *Panagrolaimus* sp. es dioico (Honnens y Ehlers, 2013b); durante el apareamiento el macho se enrolla alrededor de la hembra y la reproducción se realiza por anfimixis (Honnens y Ehlers, 2013b; Ayub et al., 2013a).

Desde hace prácticamente una década, este nematodo ha sido identificado como un posible candidato para reemplazar el rotífero o la *Artemia* (Honnens y Ehlers, 2013b; Honnens et al., 2014; Seychelles et al., 2017; 2018), las dos presas vivas mayormente usadas en la alimentación larval de peces y crustáceos a pesar de que sus producciones son costosas y requieren instalaciones y personal calificado (Dhont et al., 2013). A diferencia de otros nematodos, *Panagrolaimus* sp. presenta la capacidad de ser producido en masa (Honnens y Ehlers, 2013a), en medios líquidos monoxénicos (Honnens y Ehlers, 2013b; Ayub et al., 2013a) y condiciones libres de patógenos (Honnens et al., 2014). Ayub et al. (2013b) observaron que una hembra puede producir en promedio hasta 214 juveniles a la temperatura óptima de 27 °C. A esta misma temperatura, se logró la obtención de juveniles maduros (pre-adultos) en un lapso de 72 h después de la eclosión del huevo (Ayub et al., 2013a). Adicionalmente, este nematodo es tolerante a una desecación moderada, lo que le permite ser almacenado y transportado desde el sitio de producción hasta la granja acuícola donde será usado. Aunque carece del DHA, Honnens et al. (2014) mostraron que este ácido graso puede ser incorporado a *Panagrolaimus* sp. usando la emulsión comercial S.presso® rica en ácidos grasos poliinsaturados. Seychelles et al. (2017) mostraron que este enriquecimiento también se puede lograr empleando el dinoflagelado *Cryptocodinium cohnii*.

2.2.3 Los inmunoestimulantes

Los inmunoestimulantes son “moléculas de alarma” que activan el sistema inmune de vertebrados e invertebrados y les permiten ser más resistentes ante infecciones provocadas por virus, bacterias, hongos y parásitos (Raa, 1996). Desde hace aproximadamente 25 años, existe un gran interés por el uso de sustancias inmunoestimulantes en el cultivo de camarones peneidos ya que puede prevenir o reducir la incidencia de enfermedades de origen microbiano y viral (Campa-Córdova et al., 2017; Flores-Miranda et al., 2011). Dichas sustancias son adicionadas a las dietas, se mezclan en el agua de cultivo o pueden ser inyectadas a los organismos (Le Moullac et al., 2000). Una exposición previa del camarón *L. vannamei* a inmunoestimulantes genera un incremento en la actividad de parámetros celulares y humorales de su sistema inmune, lo que le confiere una mayor resistencia ante la presencia de un patógeno. Chang et al. (2011) observaron que el suministro de dietas conteniendo 0.2% de β -glucanos y 0.06% de glicirricina durante 18 días incrementó la actividad enzimática de la profenoloxidasa (proFO), superóxido dismutasa (SOD), así como la producción de anión superóxido en juveniles. Estos autores también reportaron una mayor resistencia de los animales alimentados con estos inmunoestimulantes 120 h después de inyectarles *V. alginolyticus*. Así mismo, Burgents et al. (2004) mostraron que la mortalidad de juveniles inyectados con *Vibrio* sp. 90-69B3 disminuye al ser alimentados por tres semanas con una dieta suplementada con 1% de un inmunoestimulante comercial (Diamond V XP Yeast CultureR).

La mayoría de las sustancias inmunoestimulantes son extraídas de la pared celular de bacterias (fragmentos de péptidos muramil, lipopolisacáridos, y lipopéptidos), así como de levaduras, algas y hongos (β -glucanos) (Raa, 1996; Le Moullac et al., 2000). Los β -glucanos son polímeros de D-glucosa unidos por enlaces β -1,3 o β -1,4, los cuales pueden presentar ramificaciones laterales de enlaces β -1,6 (Bacic et al., 2009). Estos polisacáridos pertenecen a un grupo denominado “patrones moleculares asociados a patógenos” (PAMPs, por sus siglas en inglés), debido a su capacidad de desencadenar una respuesta del sistema inmune por ser reconocidos como elementos no propios por algunos componentes del mismo (Erwig y Gow, 2016; Novak y Vetvicka, 2008).

La levadura *Debaryomyces hansenii* es considerada como un organismo con un gran potencial biotecnológico (Breuer y Harms, 2006; Angulo et al., 2020). Es osmotolerante (Ōnishi, 1963) y puede vivir en condiciones extremas (Breuer y Harms, 2006). También tiene la

particularidad de producir y acumular lípidos (Merdinger y Devine, 1965), así como poliaminas (Reyes-Becerril et al., 2011b), y su pared celular contiene β -glucanos (Ortuño et al., 2002), entre otros compuestos.

D. hansenii ha sido empleada en el cultivo de peces marinos (*Mycteroperca rosacea*, *Sparus aurata*: Reyes-Becerril et al., 2008a, 2008b, 2011a, 2012; *Dicentrarchus labrax*: Tovar et al., 2004, 2010), moluscos (*Haliotis midae*: Macey y Coyne, 2005, 2006) y crustáceos (*Litopenaeus vannamei*: Nimrat et al., 2011; Pacheco et al., 2012; *Penaeus monodon*: Sukumaran et al., 2010; *Fenneropenaeus indicus*: Sarlin y Philip, 2011) para evaluar si tiene un efecto nutricional y/o probiótico, incluyendo propiedades inmunoestimulantes. En el caso del camarón *L. vannamei*, Pacheco et al. (2012) observaron un incremento del número total de hemocitos, después de inocular una solución de *D. hansenii* (proveniente tanto de una cepa aislada de agua de mar como de un cítrico) a una concentración de 1×10^6 UFC/mL en el agua de cultivo de juveniles. También, reportaron un incremento en la actividad antioxidante de los hemocitos (SOD y catalasa [CAT]) en los animales cultivados con 1×10^4 UFC/mL de la cepa proveniente de agua de mar. Para aquella aislada de un cítrico, solamente se detectó un incremento de la CAT cuando se usó una inoculación de 1×10^6 UFC/mL. No obstante, en larvas zoea III y mysis III de *L. vannamei*, el suplemento de las levaduras *D. hansenii* y *Rhodotorula* sp. junto con cepas de *Bacillus* no tuvo ningún efecto sobre el crecimiento y la supervivencia de los organismos, respecto a los del tratamiento control (Nimrat et al., 2011).

La laminarina es un polisacárido de reserva que se encuentra en varias algas pardas (Nagaoka et al., 2000). La laminarina obtenida a partir de la macroalga *Laminaria digitata* es un β -glucano soluble y de bajo peso molecular (Nelson y Lewis, 1974), conformado por una cadena principal de enlaces glicosídicos β -1,3 con ramificaciones laterales β -1,6, las cuales pueden presentarse de manera consecutiva (Liu et al., 2018a). Rioux et al. (2010) mostraron como la estructura de los diferentes tipos de laminarina puede influir en su actividad antioxidante y antimicrobiana. De manera específica, Liu et al. (2018a) observaron que una laminarina (*L. digitata*) con pocas ramificaciones produce una mayor actividad antimicrobiana contra bacterias Gram negativas, mientras que otra con numerosas ramificaciones genera un mayor efecto en la pared celular de las bacterias Gram positivas.

La laminarina ha sido probada como inmunoestimulante durante el cultivo de camarón. Martín-Manzo et al. (2018) indicaron que el uso de laminarina como aditivo en la dieta de juveniles

de *L. vannamei* puede incrementar la respuesta inmune de éstos al potenciar la concentración de lectinas encargadas del reconocimiento de patógenos. Así mismo, Pacheco et al. (2011) mostraron un incremento en la actividad de las enzimas SOD y CAT en juveniles de *Farfantepenaeus californiensis* sometidos a un reto con el virus de la mancha blanca y previamente alimentados con una dieta enriquecida con 0.1% de laminarina. Los organismos tratados con laminarina murieron 144 h después de la inyección del virus mientras que todos los animales que no recibieron la dieta con este inmunoestimulante sobrevivieron solamente 72 h. Adicionalmente, Zhao et al. (2012) reportaron que una alimentación prolongada con 1% de laminarina incrementa la actividad de las enzimas CAT y lisozima (LIS) en juveniles de *L. vannamei*. El suministro de dicha dieta disminuyó también la mortalidad de los animales al ser expuestos a un estrés de toxicidad con nitrito.

2.3 Desarrollo del sistema inmune en larvas de *L. vannamei* y expresión génica

2.3.1 Desarrollo del sistema inmune en larvas de *L. vannamei*

Los crustáceos se caracterizan por poseer un sistema inmune innato conformado por componentes celulares y humorales que juntos se encargan del reconocimiento y eliminación de agentes extraños (Söderhäll y Cerenius, 1992).

Los componentes celulares son constituidos por tres tipos de hemocitos (hialinos, granulares y semi-granulares), los cuales se diferencian especialmente por su tamaño y número de gránulos intracelulares (Bauchau, 1981; Söderhäll y Cerenius, 1992; Johansson et al., 2000). Los hemocitos hialinos están principalmente involucrados en los procesos de fagocitosis y coagulación (Hose et al., 1990). La coagulación permite evitar la pérdida de hemolinfa y diseminación de bacterias en el animal después de un daño en el exosqueleto. Es el resultado de la polimerización de la proteína coaguladora (conocida en inglés como “clotting protein”, CP) presente en la hemolinfa y ocurre por la acción de enzimas transglutaminasas dependientes de iones Ca^{2+} liberados por los hemocitos hialinos (Kopáček et al., 1993; Lee y Söderhäll, 2002).

Los hemocitos semi-granulares y granulares están implicados en el almacenamiento y liberación del sistema proFO (Söderhäll y Cerenius, 1992; Vargas-Albores et al., 2005). Este sistema actúa mediante la activación de la fenoloxidasa, una enzima que lleva a cabo la síntesis de la melanina (Johansson y Söderhäll, 1989), la cual está implicada en la reparación de los daños de

la cutícula (Sritunyalucksana y Söderhäll, 2000; Lee y Söderhäll, 2002). Durante el proceso de melanización, se producen intermediarios de la quinona, los cuales son altamente tóxicos y pueden destruir el material extraño (Durliat, 1985). Los hemocitos semi-granulares participan también en la fagocitosis, así como en la encapsulación de partículas demasiado grandes para ser fagocitadas (Vargas-Albores et al., 2005).

Los componentes humorales están principalmente constituidos por especies reactivas de oxígeno, péptidos antimicrobianos, enzimas reguladoras de procesos inmunes y moléculas asociadas al reconocimiento de agentes extraños. Cabe mencionar que los hemocitos sintetizan algunos de estos componentes de la respuesta humoral del sistema inmune, como son el sistema proFO y las enzimas transglutaminasas involucradas en el proceso de coagulación. Durante la fagocitosis de un microorganismo invasor, los hemocitos también generan especies reactivas de oxígeno (EROs) para eliminarlo (Roch, 1999; Campa-Córdova et al., 2002). No obstante, una producción excesiva de EROs puede ocasionar en los organismos un “estrés oxidativo”, definido como una pérdida en el balance de la producción de moléculas oxidantes y las defensas antioxidantes del organismo, lo que puede generar daño a células y tejidos (Sies, 1993). El anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) es la primera especie en formarse, y puede ser tóxica para el hospedero si sale de la vacuola fagocítica en concentraciones elevadas (Warner, 1994). Para evitar este daño celular, el anión superóxido es transformado en peróxido de hidrógeno (H_2O_2) mediante la acción de la enzima SOD (Roch, 1999; Muñoz et al., 2000). Sin embargo, el producto de esta reacción también es dañino para el hospedero, por lo que es indispensable la acción de las enzimas CAT y glutatión peroxidasa (GPX) para convertir el peróxido de hidrógeno en agua (Holmblad y Söderhäll, 1999; Fukuhara et al., 2002). Debido al rol que cumplen, dichas enzimas (SOD, CAT y GPX) son conocidas como parte del sistema antioxidante de los organismos.

Dentro de los componentes humorales, el papel de las lectinas y lisozimas es muy importante. Las lectinas son proteínas plasmáticas encargadas de la identificación de patógenos a través del reconocimiento específico de carbohidratos presentes en sus paredes (Marques y Barroco, 2000; Dam y Brewer, 2010). Adicionalmente, estas proteínas median los procesos de opsonización (Söderhäll y Cerenius, 1992), aglutinación, encapsulación y generación de especies reactivas de oxígeno ante el reconocimiento de materiales extraños (Wang y Wang, 2013). Por otra parte, la LIS es una proteína antibacteriana con actividad lítica. Tiene la capacidad de reconocer e hidrolizar una variedad de especies de bacterias, hidrolizando los enlaces β -1,4-

glucosídico de los peptidoglucanos que se encuentran en las paredes celulares de las bacterias (Jollès y Jollès, 1984).

Los receptores Tipo Toll son otras moléculas de reconocimiento que desempeñan un papel importante en el sistema inmune de los camarones peneidos ya que pueden reconocer una gran variedad de patógenos (Velázquez Lizárraga, 2016). La activación de estos receptores provoca una cascada de señalización intracelular en la que participan varias proteínas. Una de ellas es el factor 6 asociado al receptor del factor de necrosis tumoral (TRAF6). El TRAF6 es un adaptador que activa promotores de los péptidos antimicrobianos, por lo que se ha observado que juega un papel importante en la regulación de la respuesta antibacteriana y antiviral (Wang et al., 2012). En *Litopenaeus vannamei*, la expresión del gen TRAF6 fue detectada en branquias, músculo, corazón, branquias, intestino y hepatopáncreas, entre otros tejidos (Wang et al., 2011).

Aunque existen numerosos estudios sobre el sistema inmune de camarones peneidos en la etapa juvenil y adulta, poco se sabe sobre su funcionamiento y desarrollo en estadios larvales y postlarvales (Martín et al., 2012), debido a la pequeña talla de los animales. En *L. vannamei*, Martín et al. (2012) detectaron actividad de la fenoloxidasa desde la etapa embrionaria, registrando un pico en el estadio de nauplio I, seguido por un decremento progresivo hasta PL 7. Adicionalmente, observaron un aumento progresivo de la producción de anión superóxido desde el huevo hasta los primeros estadios postlarvales, con excepción de zoea I y III, así como de mysis III. Por último, registraron una mayor actividad de la SOD cuando los animales alcanzaron el estadio de zoea I, coincidiendo con la primera alimentación de las larvas y la presencia de bajos niveles de anión superóxido.

2.3.2 Expresión génica del sistema inmune

Actualmente, el desarrollo de la biología molecular ha permitido el estudio de la expresión de genes asociados con el sistema inmune de crustáceos como son los relacionados con el sistema proFO, la generación de EROs y el reconocimiento de patógenos (Liu et al., 2010; Gollas-Galván et al., 2017; Rajkumar et al., 2017).

Durante el análisis de expresión de estos genes en camarones, se han logrado observar cómo algunos de ellos permanecen activos desde el desarrollo embrionario hasta etapas larvales y postlarvales. Atribuyéndose este comportamiento a mecanismos de defensa endógenos, algunos heredados de la madre y otros expresados diferencialmente a lo largo del desarrollo (Álvarez-Lee,

2020). Estudios recientes han demostrado como los genes relacionados al sistema proFO y a la lisozima presentan actividad durante los estadios tempranos de protozoa, los asociados a las enzimas SOD y CAT durante estadios de nauplio temprano y los codificantes para la proteína de coagulación se pueden encontrar activos inclusive desde el huevo (Gollas-Galván, 2017; Álvarez-Lee, 2020). Cabe destacar que dicha actividad puede alterarse ante la aplicación de estímulos externos, por ejemplo, el suministro de sustancias probióticas e inmunoestimulantes. La implementación de estos estímulos en etapas tempranas del desarrollo, podrían mejorar la inmunocompetencia de las larvas en estadios posteriores (Álvarez-Lee et al., 2020).

3. Marco Metodológico

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio Húmedo de Nutrición Acuícola y Laboratorio de Inmunogenómica Marina del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C. (CIBNOR, La Paz, México), en colaboración con la empresa de producción de nematodos “e-nema” (Schwentinental, Alemania).

3.1 Diseño experimental y alimentación de las larvas

El sistema experimental (Figura 4) consistió en 12 unidades independientes de 100 L cada una, las cuales se llenaron a la mitad de su capacidad con agua marina filtrada (5 μm) y esterilizada con luz ultravioleta. Durante los tres primeros días del experimento, se agregó 3 L de agua de mar (35 ups) diariamente hasta alcanzar un volumen final de 60 L. No se realizaron recambios de agua durante todo el cultivo, pero se agregó 1 L de agua dulce diariamente para controlar la salinidad y mantenerla a 37 ups. También es importante mencionar que se usó un probiótico elaborado y proporcionado por la empresa “Blue Genetics México S.A. de C.V.” (Pichilingue, México) para controlar los niveles de amoníaco (NH_3) y nitritos (NO_2). La temperatura del agua en las unidades fue controlada a 31 °C mediante calentadores (Figura 5). Cada tanque fue equipado de dos piedras difusoras para mantener la concentración de oxígeno disuelto por encima de los 5 mg/L y el fotoperiodo fue ajustado a 12 h luz y 12 h oscuridad.



Figura 4. Sistema experimental

Nauplios V de *L. vannamei* fueron comprados a la empresa Larvas Gran Mar, S. A. de C. V. (San Juan de la Costa, México) y aclimatados durante dos horas antes de ser distribuidos entre las unidades experimentales. La densidad de siembra fue de 150 nauplios/L, basándose en los 60 L de cada unidad experimental. Cabe mencionar que el nauplio V (Figura 5) tiene una longitud de aproximadamente 0.6 mm y presenta maxilas y maxilipedos en su parte ventral (Treece y Yates, 1988). También se caracteriza por tener una furca caudal larga y pronunciada.



Figura 5. Morfología de un nauplio V

Diariamente, se colectaron tres organismos (larvas/postlarvas, según el día muestreado) en una de las réplicas de cada tratamiento y se determinó el estadio de desarrollo y aspecto morfológico general (ej. presencia de gotas lipídicas, tracto digestivo lleno, presencia de malformaciones, etc.). Estas evaluaciones fueron realizadas por medio de un microscopio óptico (BX51-P, Olympus). Todas las réplicas 1 fueron seleccionadas en el primer día del experimento. Al día siguiente se muestrearon las réplicas 2; enseguida fue el turno de las réplicas 3 y posteriormente de las réplicas 4. Este ciclo de muestreo se repitió sucesivamente durante todo el

bioensayo. Para mantener un control sobre los parámetros fisicoquímicos del agua, se realizaron mediciones cada mañana a las 8:00 am, del oxígeno disuelto y de la temperatura utilizando un oxímetro (Pro20, YSI). El pH se midió utilizando un potenciómetro (pHTestr 10, Oakton) y la salinidad del agua fue determinada con un refractómetro (Scientific BTX-1, Vee Gee).

Durante el ensayo, se suministraron las siguientes dietas:

Dieta 1: 100% *Artemia* (100A).

Dieta 2: 75% nematodos enriquecidos con β -glucano proveniente de *Laminaria digitata* (laminarina) + 25% *Artemia* (75GL).

Dieta 3: 75% nematodos enriquecidos con β -glucano proveniente de *D. hansenii* + 25% *Artemia* (75GD).

Nauplios de *Artemia* fueron usados tanto para la dieta 100A como para las dietas 75GL y 75GD y los nematodos enriquecidos con β -glucanos tenían una longitud entre 200 - 1,200 μm . A partir del día 1, la microalga *Chaetoceros calcitrans* fue suministrada en todos los tanques ya que los nauplios V de *L. vannamei* estaban próximos a transformarse en zoea I. Cuando el 50% de los animales aproximadamente alcanzaron el estadio de zoea II, se inició con el suministro de los nematodos (Dietas 75GL y 75GD). Las larvas fueron alimentadas tres veces al día (10:00 am, 2:00 pm y 6:00 pm) por 12 días y para cada dieta se utilizaron cuatro réplicas. En el Cuadro 2, se muestra el protocolo de alimentación que se siguió para cada uno de los tratamientos.

Cuadro 2. Protocolo de alimentación de las larvas de *Litopenaeus vannamei* durante el bioensayo

Día de cultivo	Estadio larval	Microalga (cel/mL)	ALIMENTO VIVO SUMINISTRADO A CADA UNIDAD EXPERIMENTAL				
			100A	75GL		75GD	
			<i>Artemia</i> 100%	Nematodos 75%	<i>Artemia</i> 25%	Nematodos 75%	<i>Artemia</i> 25%
1	NV	60,000					
2	ZI	80,000					
3	ZI	80,000					
4	ZI/ZII	80,000		2,550,000		2,550,000	
5	ZII/ZIII	100,000		2,550,000		2,550,000	
6	ZIII/MI	120,000	26,667	3,400,000	6,667	3,400,000	6,667
7	MI/MII	100,000	26,667	3,400,000	6,667	3,400,000	6,667
8	MII	80,000	28,334	3,612,500	7,083	3,612,500	7,083
9	MII/MIII	70,000	33,334	4,250,000	8,334	4,250,000	8,334
10	MIII/PL 1	60,000	46,667	5,950,000	11,667	5,950,000	11,667
11	PL 1		52,640	6,711,500	13,160	6,711,500	13,160
12	PL 2		52,640	6,711,500	13,160	6,711,500	13,160

Nota: a) Se suministraron aproximadamente 170 nematodos por cada *Artemia*. **NV** – nauplio V; **ZI, ZII y ZIII** – zoea I, II y III; **MI, MII y MIII** – mysis I, II y III; y **PL 1** – postlarva 1. 100A – 100% *Artemia*; 75GL – 75% Nematodos enriquecidos con β -glucano proveniente de *Laminaria digitata* (Laminarina) + 25% *Artemia*; 75GD – 75% Nematodos enriquecidos con β -glucano obtenido de *Debaryomyces hansenii* + 25% *Artemia*.

Los nematodos *Panagrolaimus* sp. (cepa NFS 24-5) fueron producidos por la empresa “e-nema”. El cultivo se realizó en un biorreactor de 30 L en un medio líquido con *Escherichia coli* (cepa K12, DSM 498) a partir de un inóculo conteniendo 10,000 nematodos/mL. Después del día 14 de cultivo, los nematodos (200 - 1,200 μm) fueron tamizados y enjuagados para eliminar el medio de cultivo. Enseguida, los nematodos fueron enriquecidos en DHA durante 15 h con el dinoflagelado *Cryptecodinium cohnii*. Un lote de nematodos fue enriquecido con laminarina y otro fue colocado sobre filtros de celulosa para ser deshidratados. Los dos lotes fueron enviados a la ciudad de La Paz (Baja California Sur, México) donde fueron guardados a 4 °C hasta su uso. Los nematodos fueron hidratados dos horas antes de ser suministrados a las larvas de camarón.

Los nematodos se enriquecieron con los inmunoestimulantes de la siguiente manera: en un matraz que contenía 0.1 g de laminarina (Sigma, L-9634) y 200 mL de agua potable, se colocaron los nematodos recién enriquecidos en DHA. El matraz fue agitado durante una hora a 75 rpm, posteriormente los nematodos fueron enjuagados y colocados en filtros de papel para iniciar el proceso de deshidratación, tal y como lo describen Honnens y Ehlers (2013b) y Honnens et al. (2014). Cabe recalcar que este proceso fue realizado en las instalaciones de la empresa “e-nema”. Por otra parte, el enriquecimiento con β -glucano proveniente de *D. hansenii* (cepa CBS 8339) se realizó en las instalaciones del CIBNOR, de la siguiente manera: los nematodos fueron hidratados una hora y transferidos en un matraz con 50 mL de agua potable y 0.025 g del extracto puro de β -glucanos. El matraz fue agitado con un agitador orbital a 75 rpm durante otra hora. Enseguida, los organismos fueron lavados y contados antes de ser suministrados a las larvas. Cabe destacar que el glucano extraído de la cepa de la levadura *D. hansenii* fue donado por el grupo de Inmunología y Vacunología del CIBNOR.

Los nauplios de *Artemia* fueron obtenidos diariamente a partir de la rehidratación de 1 g de quistes de este crustáceo (85% – 90% de eclosión, Biogrow) en una cubeta de plástico conteniendo 10 L de agua a una salinidad de 15 ups y temperatura de 24 °C. Después de 24 h, los nauplios recién eclosionados fueron cosechados, tamizados (100 μm) y desinfectados con yodo (Argentyne, 2 mL/L) por 10 min. Por último, los nauplios fueron escaldados durante 10 segundos en agua hirviendo, antes de ser suministrados a las larvas.

3.2 Muestreo y análisis de muestras

El muestreo se realizó después de 12 días de cultivo y consistió en vaciar y filtrar separadamente cada unidad experimental. Para cada tanque, se tomaron diez PL 3 para determinar la longitud total (de la extremidad del rostro hasta el telson), mediante fotografías *in vivo* utilizando un microscopio óptico (BX51-P, Olympus) y una cámara fotográfica. La supervivencia se evaluó antes de vaciar las unidades, usando dos vasos de precipitado de 250 mL y contando las postlarvas presentes en cada uno. La supervivencia se extrapola tomando en cuenta los 60 L de cada unidad. Además, para cada réplica, se colocaron aproximadamente 50 mg de postlarvas en un tubo de plástico conteniendo 0.5 mL de TRIzol, el cual fue guardado a -80 °C para el análisis de la expresión de genes del sistema inmune. Finalmente, se muestrearon 30 PL 3 de cada unidad experimental para ser utilizadas en el reto bacteriano.

3.3 Reto bacteriano

3.3.1 Reactivación de un inóculo de *Vibrio parahaemolyticus*

Se reactivó un vial de *V. parahaemolyticus* de la colección de cepas del Grupo de Inmunología y Vacunología del CIBNOR, el cual se encontraba preservado a -80 °C en medio TSB 2% de NaCl y 15% de glicerol. Para la reactivación, se colocaron 500 µL del cultivo criopreservado en un matraz con 25 mL de medio TSB 2% de NaCl y se sembraron dos cultivos más, uno en el mismo medio con agar y otro en el medio CHROMagar Vibrio. El medio líquido se cultivó por 18 h a 30 °C con agitación a 130 rpm. En cuanto a los medios sólidos, se incubaron por 24 h a 30 °C. Transcurrido el tiempo de incubación, se observó la morfología celular por tinción de Gram y la morfología colonial en las placas de agar TSA y el medio selectivo-diferencial CHROMagar Vibrio.

3.3.2 Preparación del cultivo de *V. parahaemolyticus* para el día del reto bacteriano

A partir del cultivo reactivado y confirmado como *V. parahaemolyticus*, se tomó una colonia con un asa y se sembró en 25 mL de medio TSB 130% al 2% de NaCl. Este cultivo se incubó por 18 h a 30 °C, a una agitación constante de 130 rpm. Con base en una curva de crecimiento en

relación UFC-DO_{600nm} se ajustó 1 mL del cultivo a una concentración celular de 1×10^9 UFC/mL. Posteriormente, se recuperaron las células de *V. parahaemolyticus* por centrifugación (3900 rpm a temperatura ambiente por 20 min). Se descartó el medio de cultivo y se re-suspendieron las células en una solución salina al 2% de NaCl.

3.3.3 Cuantificación de células viables

A partir de las células recuperadas, se procedió a realizar diluciones seriadas hasta 1×10^{-7} con el fin de cuantificar las células viables y se llevó a cabo la dispersión de las diluciones en agar TSA al 2% de NaCl. Los medios inoculados fueron incubados por 24 h a 30 °C para su posterior conteo.

3.3.4 Reto bacteriano con las PL 3

El reto bacteriano se realizó en un laboratorio especializado del CIBNOR, el cual cuenta con un sistema de agua con circuito cerrado y unos contenedores para tratar la misma. Para cada una de las cuatro réplicas de los tratamientos 100A, 75GL y 75GD, se utilizaron dos recipientes con 500 mL del agua de mar de las unidades experimentales de 100 L. De manera aleatoria, uno de los recipientes fue etiquetado como control y el otro como infectado. En cada recipiente se colocaron 15 postlarvas, y las condiciones ambientales y de alimentación fueron las descritas en el bioensayo. Posteriormente, se inocularon 50 µL de la suspensión de células de *V. parahaemolyticus* con el fin de alcanzar una concentración de 1×10^5 UFC/mL de la bacteria en los recipientes marcados como infectados. En los de control, se agregaron 50 µL de la solución salina a 2%. Después de la infección, las PL 3 fueron monitoreadas a las 1, 3, 6, 12, 18 y 24 h para evaluar la supervivencia. Las postlarvas vivas al final del reto (PL 4) fueron colocadas en tubos de plástico conteniendo 0.5 mL de TRIZOL para posteriormente determinar la expresión de varios genes del sistema inmune. Las muestras fueron guardadas a -80 °C hasta el análisis.



Figura 5. Reto de las postlarvas de *Litopenaeus vannamei* (PL 3) con *Vibrio parahaemolyticus* durante 24 h.

3.3.5 Tratamiento de residuos y comprobación de espacio libre de *Vibrio*

Al finalizar el reto, el agua residual clorada de los recipientes fue esterilizada y se tomaron muestras en diferentes puntos del laboratorio donde hubo contacto con el patógeno. Las muestras fueron tomadas por triplicado y sembradas en medio CHROMagar Vibrio para descartar la presencia del patógeno en las instalaciones utilizadas para el experimento. Las placas fueron incubadas por 24 h a 30 °C. Transcurrido el tiempo de incubación, se observaron las placas en búsqueda de colonias color lila a morado, las cuales son características para *V. parahaemolyticus* en este medio. No se encontró ninguna colonia de ese color.

3.4 Expresión génica

3.4.1 Extracción de ARN total y síntesis de ADN complementario

Se realizó la extracción de ARN total para cada uno de los grupos de postlarvas (PL 3 y 4) de cada réplica antes y después del reto bacteriano, utilizando el kit FastRNA ProGreen Kit (MP Biomedicals). La digestión del ADN genómico se llevó a cabo con la enzima DNase I (Promega) siguiendo las especificaciones del proveedor. Mediante PCR de punto final se evaluó el ARN total aislado con un gen de referencia (L8) para verificar la eliminación del ADN genómico de cada muestra. La reacción de PCR se llevó a cabo utilizando un volumen de reacción de 6 μ l conteniendo además de 1 μ l de ARN total de cada muestra, 0.25 U de GoTaq Flexi Polymerase (Promega), 1X de Colorless Go Taq Flexi Buffer (Promega), 2.0 mM de MgCl₂ (Promega), 0.2 mM de dNTP mix (Promega) y H₂O Milli-Q. Las condiciones para la amplificación fueron de 4 min a 94°C seguido de 35 ciclos, cada uno de 30 s a 94° C, 30 s a 60° C y 45 s a 72° C (desnaturalización / alineación / extensión), con una extensión final de 10 min a 72° C. La no amplificación de productos se analizó en una electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1% en buffer TBE 1X, por 30 min a 100 voltios, con un marcador de tamaño de 100 pb (Promega). Para su visualización en el fotodocumentador-UV se utilizó una tinción fluorescente con GelRed (Biotium). Para cuantificar la concentración y pureza del ARN obtenido, se utilizó un espectrofluorómetro (NanoDrop 1000, Thermo Scientific). Se verificó su integridad por medio de electroforesis horizontal de 2 μ l de ARN total en un gel de agarosa al 1 % en buffer TBE1X, por 60 min a 60 voltios, con la tinción fluorescente de GelRed. Una vez verificada la integridad de cada muestra, se utilizaron 2 μ g del ARN total obtenido para la síntesis del ADN complementario (ADNc) siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante de la enzima *GoScript Reverse Transcriptase* (Promega) y una mezcla de Oligo (dT)₁₈ y Random Primers. Una vez obtenido el ADNc, se amplificó por PCR punto final para verificar la síntesis y se visualizó en un gel de agarosa como se menciona anteriormente.

3.4.2 Evaluación de la estabilidad de los genes de referencia para la normalización de la expresión de los genes blanco

Los genes de referencia que fueron evaluados para su posible utilización en la normalización de la expresión de los genes blanco fueron: la proteína ribosomal (*L8*), ubiquitina (*ubi*) y factor de elongación α -1 (*ef α -1*). Las amplificaciones se realizaron por triplicado en un termociclador de tiempo real CFX96 (Bio-Rad), utilizando placas de 96 pozos y filmes adhesivos ópticos (Axygen). Las reacciones se realizaron en un volumen final de 15 μ l que fueron preparadas utilizando 7.5 μ l de una mezcla para qPCR descrita en Morelos-Castro et al. (2015) que contiene: 1x EvaGreen (Biotium), 0.45 U de Go Taq Flexi Polymerase (Promega), 1X de Colorless Go Taq Flexi Buffer (Promega), 2.5 mM de MgCl₂, 0.2 mM de dNTP mix (Promega) y H₂O libre de nucleasas; 5 μ l de la dilución de ADNc 1:50 (concentración 50 ng/ μ l) y para cada par de cebadores de los genes de referencia a evaluar se utilizaron diferentes concentraciones con base en las curvas de eficiencia. Las condiciones de amplificación fueron: 5 min a 95 °C, seguido de 40 ciclos de 15 s a 95 °C, 15 s a 60 °C y 15 s a 72 °C donde se llevó a cabo la lectura de la fluorescencia. La curva de desnaturalización fue de 60 a 95 °C con un incremento de 0.5 °C/s. Cada curva de disociación obtenida fue analizada para la confirmación de un solo amplicon (curva) y la discriminación de posibles productos inespecíficos o dímeros, ya que la temperatura de fusión de los productos específicos se disocia a una temperatura más alta que los artefactos (dímeros) de la PCR (Ririe et al., 1997). Los ciclos de cuantificación (Cq) obtenidos por PCR en tiempo real de cada gen de referencia, se promediaron y se estimó la estabilidad en la expresión de cada gen con el programa RefFinder (Xie et al., 2012).

Cuadro 3. Genes de referencia utilizados para la normalización de estabilidad de los genes blanco en postlarvas de *Litopenaeus vannamei*.

Gen	Nombre primer	Secuencia	Referencia	Tamaño (pb)
Proteína ribosomal L8	L8-F	GCCTAAGGTGCGTGGTGT	Galindo-Torres et al., 2019	181
	L8-R	ATTCTGCCTTGGGTCCTTCT		
Ubiquitina	UBI-F	GGAAGACCATCACCTTG	Ventura-López et al., 2016	146
	UBI-R	TCAGACAGAGTGCGACCATC		
Factor de elongación	EF1a-F	TGATTGCCACACTGCTCAC	Ceseña et al., 2021	163
	EF1a-R	GAAGGTCTCCACGCACATAG		

3.4.3 Análisis de la expresión relativa de genes blanco en los grupos de postlarvas

La amplificación de los genes blanco para el análisis de su expresión se realizó mediante una PCR en tiempo real o PCR cuantitativa (qPCR), utilizando los cebadores descritos en el Cuadro 4, con el ADNc de cada muestra de postlarvas (concentración 50 ng/μl). La amplificación por qPCR se realizó como se menciona en la sección 3.4.2 para los genes de referencia. Las cantidades relativas (CR) para los genes blanco fueron estimadas con la ecuación $CR = (1+E)^{(Cq_{promedio} - Cq)}$ donde CR= cantidad relativa. Los valores de expresión relativa (ER) de cada gen blanco se calcularon con la ecuación $ER = CR_t/CR_{nf}$ (t=target gene (gen blanco), y nf=factor de normalización= media geométrica de los genes de referencia) (Hellemans et al., 2007). Los genes blanco permitieron evaluar la expresión de genes que codifican para las proteínas relacionadas con el sistema inmune: Superóxido dismutasa (cMn-SOD), proteína de coagulación (CP), glutatión peroxidasa (GPX), profenoloxidasa I (proFO I), catalasa (CAT), factor 6 asociado al receptor del factor de necrosis tumoral (TRAF6) y lisozima (LIS).

Cuadro 4. Cebadores para el análisis de la expresión relativa de genes blanco en postlarvas de *L. vannamei*.

Gen	Nombre primer	Secuencia	Referencia	Tamaño (pb)
Superóxido dismutasa (cMn-SOD)	cMnSOD-F cMnSOD-R	CGCGGATCCGATGGCTGAGGCAAAGGAA CCGGAATTCTGGGCAAACATCTGTGCTATCT	Rajkumar et al., 2017	113
Proteína de coagulación (CP)	CPR-F CPR-R	CTTCCAGTGAACGTCTGCCT AGACTGAAGCCCATGTGTCGTC	Gollas-Galvan et al., 2017	145
Glutatión peroxidasa (GPX)	GPx-F GPx-R	TCGGCAAAGTCGACGTCAA GCAGTCGCTCCTTCAGGTACTTA	Liu et al., 2010	66
Profenoloxidasa I (proFOI)	proFO I-F proFO I-R	GCCTTGGCAACGCTTTCA CGCGCATCAGTTCAGTTTGT	Liu et al., 2010	60
Catalasa (CAT)	CAT-F CAT-R	ACTGTAGGAGGTGAGAGTGG TGCGTGTGAATGAAGGATGG	Diseñados	161
Factor 6 asociado al receptor del factor de necrosis tumoral (TRAF6)	TRAF6-F TRAF6-R	CGCGGATCCGATGTTACCCGACACCTAT CCGGAATTCTTCCAACCTTGCCTTTAC	Rajkumar et al., 2017	280
Lisozima (LIS)	Lis_F Lis-R	ATAAACCGCAACAGAAACCG AACCGTGAGACCAGCACTCT	Gollas-Galvan et al., 2017	283

3.5 Análisis estadísticos

El programa STATISTICA 8.0 (StatSoft, USA) fue empleado para analizar tanto las variables zootécnicas (supervivencia y longitud total) como los resultados de la expresión de genes del sistema inmune de las postlarvas de *L. vannamei*.

Para las variables zootécnicas (longitud total y supervivencia) al finalizar el bioensayo, primeramente, se verificó la normalidad (Prueba de Kolmogorov-Smirnov) y la homocedasticidad de varianzas (Pruebas de Levene y Bartlett para la longitud y supervivencia, respectivamente) de los datos (Zar, 1999). Como estos dos supuestos se cumplieron, se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) de una vía y posteriormente una prueba de Tukey para determinar las diferencias significativas entre tratamientos. Para los resultados de supervivencia obtenidos 24 h después de la infección con *V. parahaemolyticus*, se probó la normalidad de los datos mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov así como la homocedasticidad de varianzas aplicando una prueba de Levene. Estas dos condiciones fueron encontradas, por lo que los datos fueron analizados con un ANDEVA de dos vías utilizando las dietas administradas [100A, 75GD, 75GL] y las condiciones de estrés [control, estrés] como variables independientes. Al no existir una interacción significativa entre dichas variables, solamente las medias globales (medias agrupadas, ya sea de la condición de dieta o estrés) se presentan en la sección de resultados.

En el caso de los resultados de expresión génica, se analizaron de manera diferente los obtenidos antes y después del reto bacteriano. Para aquellos colectados antes del reto bacteriano, se evaluó el cumplimiento de los supuestos de normalidad (Prueba de Kolmogorov-Smirnov) y homocedasticidad de varianzas (Prueba de Brown-Forsyth). Como este cumplimiento no fue satisfecho, se transformaron los datos utilizando la fórmula $\ln(X+1)$. Enseguida, la expresión relativa de cada gen fue analizada con un ANDEVA de una vía y cuando una diferencia significativa fue encontrada, se llevó a cabo una prueba *a posteriori* de Tukey para determinar qué medias individuales eran diferentes. Para los resultados obtenidos después de someter las postlarvas a *V. parahaemolyticus*, se verificaron los supuestos de normalidad (Prueba de Kolmogorov-Smirnov) y homocedasticidad de varianzas (Prueba de Levene) y se realizó un ANDEVA de dos vías (dietas [100A, 75GD, 75GL] y condiciones de estrés [control, estrés] como variables independientes). Las diferencias entre las medias de cada grupo (medias individuales) fueron determinadas por una prueba de Tukey, solamente cuando la interacción entre las variables

independientes fue significativa. De lo contrario, las diferencias significativas entre las medias globales están indicadas en la sección de resultados en el texto. Para todos los análisis, el nivel de significancia fue establecido en 5%. Todos los resultados son presentados como promedio \pm error estándar (EE).

4. Resultados

4.1 Longitud total y supervivencia de las postlarvas después de 12 días de alimentación con tres diferentes dietas

Al finalizar los 12 días del bioensayo, las postlarvas alimentadas con 75% *Panagrolaimus* sp. enriquecidos con β -glucano proveniente de *L. digitata* + 25% *Artemia* (75GL) mostraron una longitud total similar ($P \geq 0.05$) a aquellas alimentadas con 100% *Artemia* (100A). En cambio, las PL 3 cultivadas con 75% nematodos enriquecidos con β -glucano extraído de *D. hansenii* + 25% *Artemia* (75GD) presentaron una longitud total significativamente menor ($P < 0.05$) a la obtenida en las postlarvas alimentadas con las dos dietas anteriormente citadas (Figura 7). Esta misma tendencia fue observada en la supervivencia al final del experimento (Figura 8). Las PL 3 de los tratamientos 75GL y 100A tuvieron una supervivencia significativamente mayor, del doble aproximadamente ($P < 0.05$; $37.6 \pm 1.6\%$ y $35.6 \pm 0.9\%$, respectivamente), en comparación con las postlarvas del tratamiento 75GD ($15.3 \pm 0.7\%$).

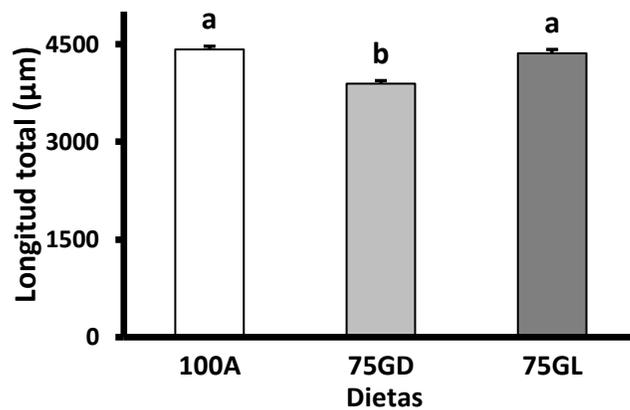


Figura 7. Longitud total (promedio \pm error estándar, EE) de PL 3 de *Litopenaeus vannamei* después de ser alimentadas durante 12 días con tres diferentes dietas. 100A: 100% *Artemia*; 75GL: 75% nematodos enriquecidos con β -glucano obtenido de *Laminaria digitata* + 25% *Artemia*; 75GD: 75% nematodos enriquecidos con β -glucano proveniente de *Debaryomyces hansenii* + 25% *Artemia*. Letras diferentes indican diferencias significativas.

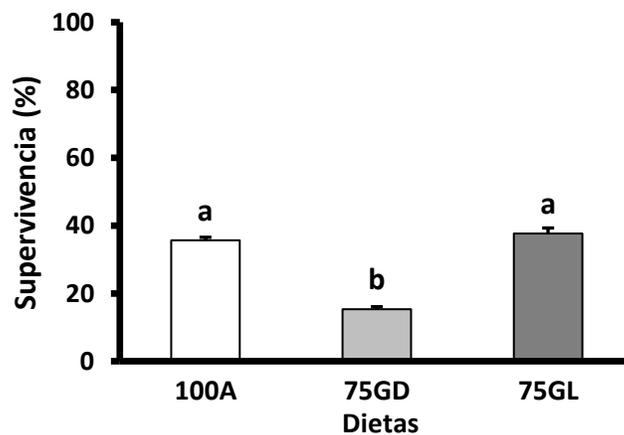


Figura 8. Supervivencia (promedio \pm EE) de PL 3 de *Litopenaeus vannamei* después de ser alimentadas durante 12 días con tres diferentes dietas. 100A: 100% *Artemia*; 75GL: 75% nematodos enriquecidos con β -glucano obtenido de *Laminaria digitata* + 25% *Artemia*; 75GD: 75% nematodos enriquecidos con β -glucano proveniente de *Debaryomyces hansenii* + 25% *Artemia*. Letras diferentes indican diferencias significativas.

4.2 Supervivencia de las postlarvas después de ser sometidas por 24 h a un reto bacteriano con *V. parahaemolyticus*

Respecto a la supervivencia durante el reto bacteriano, una hora después de iniciar el desafío, las PL 3 de todos los grupos control mostraron 100% de supervivencia, mientras que se observó mortalidad en los grupos estrés alimentados con 100A, 75GD y 75GL (Figura 9). Seis horas después de la infección, solamente el grupo control de la dieta 75GL mantuvo una supervivencia de 100%. A las 12 h post-infección, se observó una alta mortalidad en algunos grupos; más de un tercio de las postlarvas alimentadas con 75GD y expuestas a la bacteria habían muerto para este momento. Tras 18 h de exposición al *Vibrio*, la supervivencia de las postlarvas alimentadas con 75GL y 100A (grupos estrés y control agrupados) fue de aproximadamente 84%, mientras que para las postlarvas alimentadas con 75GD la supervivencia fue de solamente el 51%. Veinticuatro horas después de la infección, se observó un efecto significativo ($P < 0.05$) de la condición de estrés por exposición a *V. parahaemolyticus* en la supervivencia de las postlarvas (Figura 10). Los organismos que estuvieron en presencia con la bacteria presentaron una supervivencia significativamente menor (promedio global: $56.1 \pm 4.8\%$) en comparación con la de los grupos control (promedio global: $73.9 \pm 4.4\%$). Aunque la interacción no fue significativa ($P = 0.84$), este efecto fue ligeramente más pronunciado en las postlarvas alimentadas con la dieta 75GD que 75GL y 100A. De manera general, la supervivencia a las 24 h fue significativamente mayor ($P < 0.05$) en las postlarvas alimentadas con 75GL (promedio global: $80.8 \pm 3.4\%$) y 100A (promedio global: $77.5 \pm 5.5\%$) que aquellas cultivadas con 75GD (promedio global: $36.6 \pm 5.0\%$).

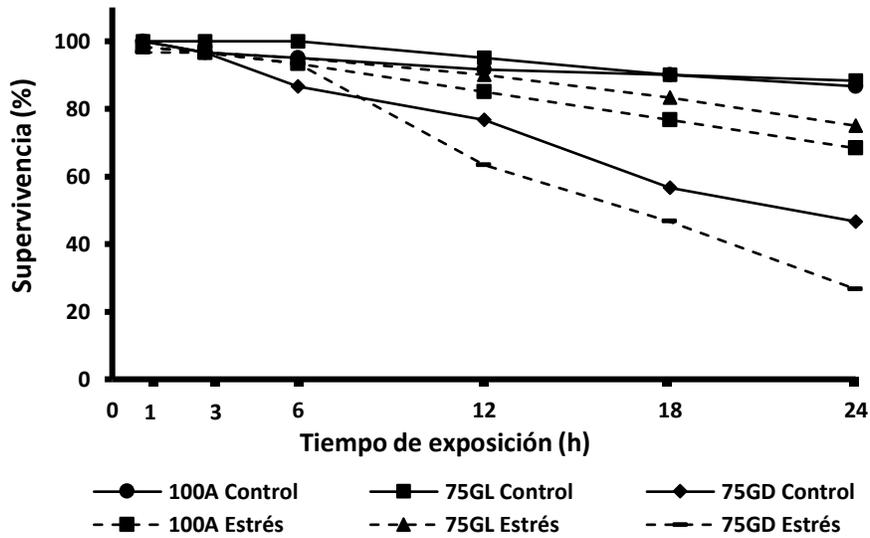


Figura 9. Registro de la supervivencia (promedio) de las PL 3 de *Litopenaeus vannamei* después de ser expuestas 1, 3, 6, 12, 18 y 24 h al *Vibrio parahaemolyticus*. 100A: 100% *Artemia*; 75GL: 75% nematodos enriquecidos con β -glucano obtenido de *Laminaria digitata* + 25% *Artemia*; 75GD: 75% nematodos enriquecidos con β -glucano proveniente de *Debaryomyces hansenii* + 25% *Artemia*.

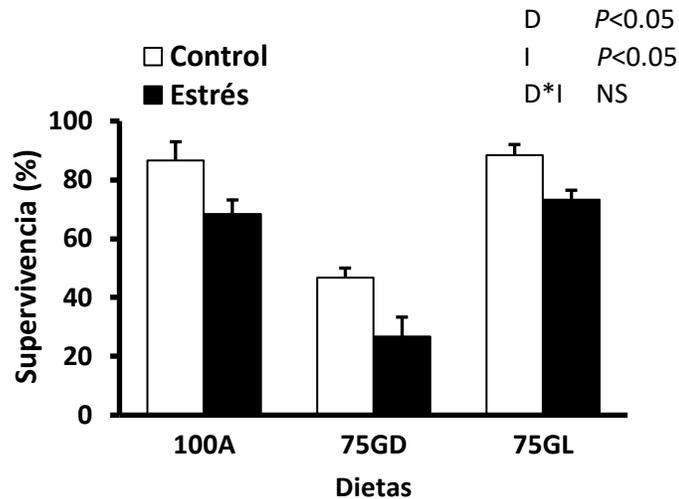


Figura 10. Supervivencia (promedio \pm EE) de PL 3 de *Litopenaeus vannamei* después de ser expuestas a un reto bacteriano con *Vibrio parahaemolyticus* durante 24 h. Control: postlarvas no infectadas; Estrés: postlarvas infectadas. D: dieta; I: infección; NS: no significativo. 100A: 100% *Artemia*; 75GL: 75% nematodos enriquecidos con β -glucano obtenido de *Laminaria digitata* + 25% *Artemia*; 75GD: 75% nematodos enriquecidos con β -glucano proveniente de *Debaryomyces hansenii* + 25% *Artemia*.

4.3 Expresión relativa de los genes blanco que codifican para las proteínas relacionadas con el sistema inmune en PL 3 de *L. vannamei*

4.3.1 Estabilidad de los genes de referencia utilizados en la normalización de la expresión de los genes blanco

El gen de referencia que mostró mayor estabilidad para el análisis de expresión de los genes relacionados con el sistema inmune de las postlarvas de *L. vannamei* fue la proteína ribosomal (*L8*), siendo el gen mejor promediado por el programa RefFinder (Figura 11) y, por ende, el elegido como referencia para los análisis estadísticos de expresión génica.

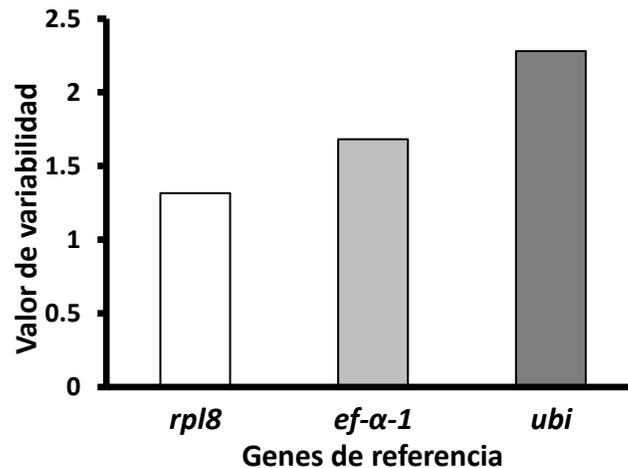


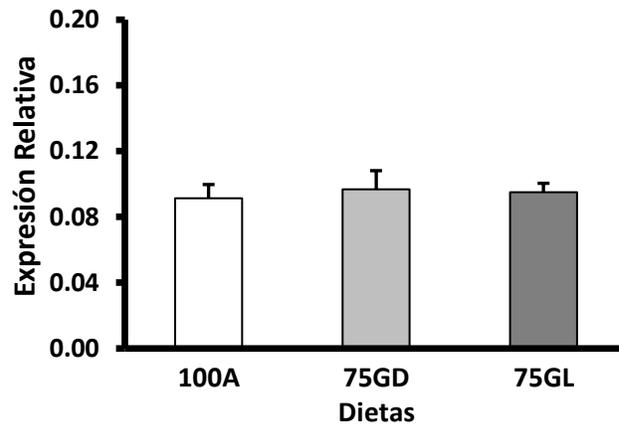
Figura 11. Estabilidad estimada de los genes de referencia utilizando el programa RefFinder. Resultados basados en los métodos Delta Ct, Bestkeeper, NormFinder y GeNorm. *L8*: Proteína Ribosomal, *ef α-1*: Factor de elongación, *ubi*: Ubiquitina.

4.3.2 Expresión relativa de los genes blanco después del bioensayo

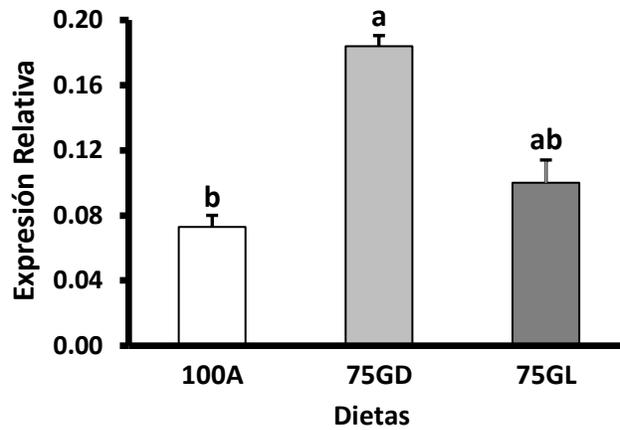
De los seis genes analizados en PL 3 de *L. vannamei*, únicamente CAT y GPX mostraron una expresión relativa significativamente diferente al finalizar el bioensayo, en relación con las dietas administradas (Figura 12 B y Figura 12 C). La expresión relativa del gen CAT fue

significativamente mayor ($P < 0.05$) en las postlarvas alimentadas con 75GD en comparación con aquellas cultivadas con 100A; pero no significativamente diferente ($P \geq 0.05$) con respecto a las postlarvas que recibieron 75GL como alimento (Figura 12 B). De igual manera, las PL 3 cultivadas con la dieta 75GD presentaron una expresión del gen GPX significativamente mayor comparado con aquellas alimentadas con 100A y 75GL (Figura 12 C). Los demás genes analizados (cMn-SOD, proFO I, CP y TRAF6) no mostraron diferencias significativas ($P \geq 0.05$) en su expresión relativa con relación a las dietas suministradas (Figura 12 A y Figura 13 A, B y C). Cabe destacar que no se llevó a cabo el análisis de los datos referentes a la expresión relativa del gen LIS, dado a que no hubo expresión relativa para el 48% de las muestras analizadas y se reportaron valores muy bajos en la expresión del 52% restante. Esta situación fue observada únicamente para este gen.

A) Superóxido dismutasa



B) Catalasa



C) Glutación peroxidasa

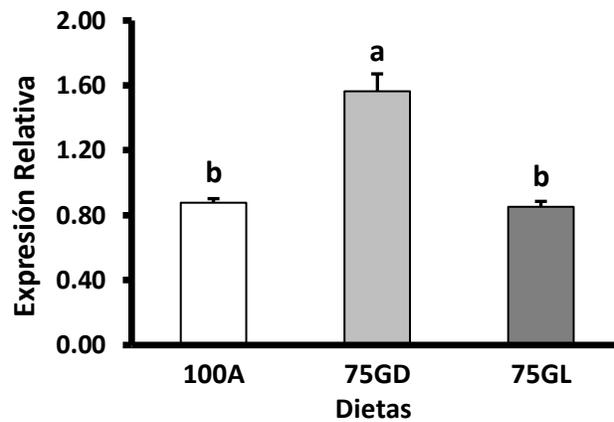
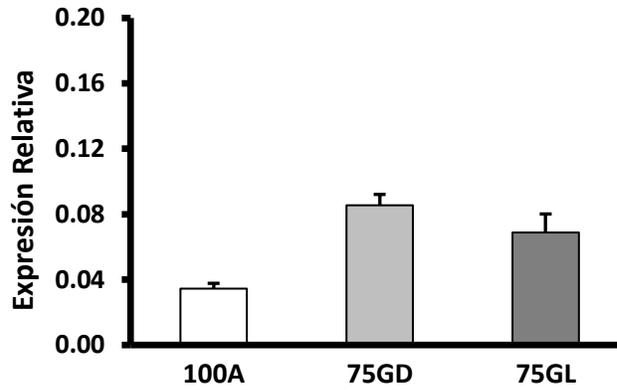
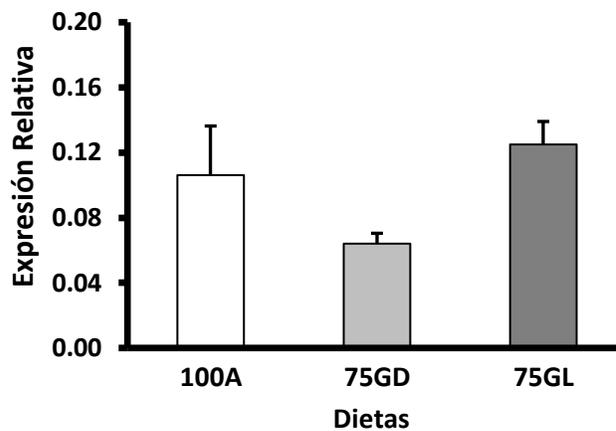


Figura 12. Expresión relativa (promedio ± EE) de los genes del sistema inmune (cMn-SOD, CAT, GPX) analizados en postlarvas de *Litopenaeus vannamei* después de ser alimentadas durante 12 días con tres diferentes dietas. 100A: 100% *Artemia*; 75GL: 75% nematodos enriquecidos con β -glucano obtenido de *Laminaria digitata* + 25% *Artemia*; 75GD: 75% nematodos enriquecidos con β -glucano proveniente de *Debaryomyces hansenii* + 25% *Artemia*. Letras diferentes indican diferencias significativas.

A) Profenoloxidasas I



B) Proteína de coagulación



C) TRAF6

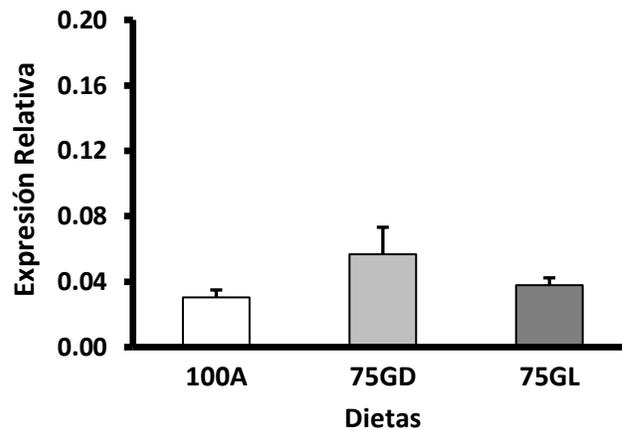
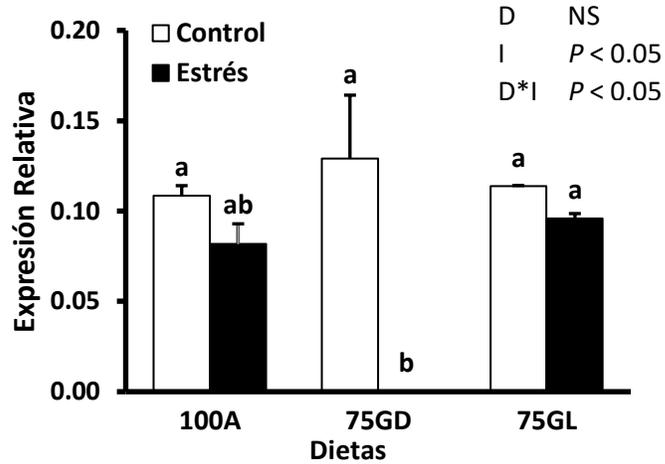


Figura 13. Expresión relativa (promedio \pm EE) de los genes del sistema inmune (proFO I, CP, TRAF6) analizados en postlarvas de *Litopenaeus vannamei* después de ser alimentadas durante 12 días con tres diferentes dietas. 100A: 100% *Artemia*; 75GL: 75% nematodos enriquecidos con β -glucano obtenido de *Laminaria digitata* + 25% *Artemia*; 75GD: 75% nematodos enriquecidos con β -glucano proveniente de *Debaryomyces hansenii* + 25% *Artemia*. Letras diferentes indican diferencias significativas.

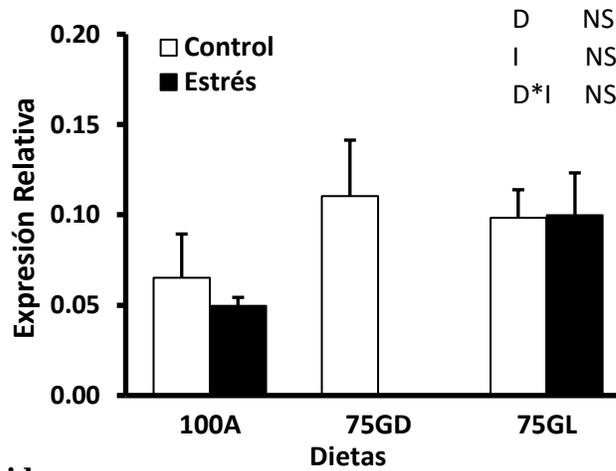
4.3.3 Expresión relativa de los genes blanco después de 12 días de alimentación y una posterior exposición a *V. parahaemolyticus*

Cuando las PL 3 fueron sometidas a la presencia de la bacteria *V. parahaemolyticus*, varios genes del sistema inmune de las alimentadas con 75GD mostraron diferencias significativas ($P < 0.05$) en su expresión respecto a las postlarvas del grupo control cultivadas con la misma dieta y/o las postlarvas alimentadas con 75GL y 100A, lo cual fue evidenciado por la significancia de la interacción (dieta \times infección) (Figuras 14 y 15). Al terminar el reto bacteriano, la expresión relativa de los genes cMn-SOD y GPX fue prácticamente nula para los grupos expuestos a *V. parahaemolyticus* y alimentados con 75GD y significativamente menor ($P < 0.05$) comparado con los animales del grupo control alimentados con la misma dieta (Figura 14 A y Figura 14 C). No se observaron diferencias significativas ($P \geq 0.05$) en la expresión relativa de los genes mencionados entre las postlarvas cultivadas con 100A (tanto grupo control como expuesto a bacteria), 75GL (tanto grupo control como expuesto a bacteria) y 75GD (control). En el caso del gen CAT, tampoco se observaron diferencias entre los diferentes tratamientos a pesar de que las postlarvas cultivadas con 75GD y expuestas a *V. parahaemolyticus* mostraron una expresión génica prácticamente igual a cero (Figura 14 B). Lo anterior puede deberse a la amplia desviación estándar de los resultados para algunos de los tratamientos. En cuanto al gen proFO I, su expresión mostró ser afectada por la presencia de *V. parahaemolyticus*, ya que una disminución en la expresión relativa fue observada en las postlarvas infectadas (promedio global: 0.01 ± 0.002) respecto a las del control (promedio global: 0.03 ± 0.010) (Figura 15 A). La expresión relativa del gen CP fue también afectada al exponer las postlarvas ante *V. parahaemolyticus*, pero la respuesta fue diferente en función de la dieta administrada. Las postlarvas alimentadas con 75GL presentaron una expresión relativa de este gen significativamente más alta ($P < 0.05$) que aquellas cultivadas con 75GD y 100A (Figura 15 B). Por último, la expresión del gen TRAF6 en las postlarvas alimentadas con 75GL y expuestas a *V. parahaemolyticus* fue significativamente mayor ($P < 0.05$) comparado con aquellas cultivadas con 75GD e infectadas (Figura 15 C).

A) Superóxido dismutasa



B) Catalasa



C) Glutatión peroxidasa

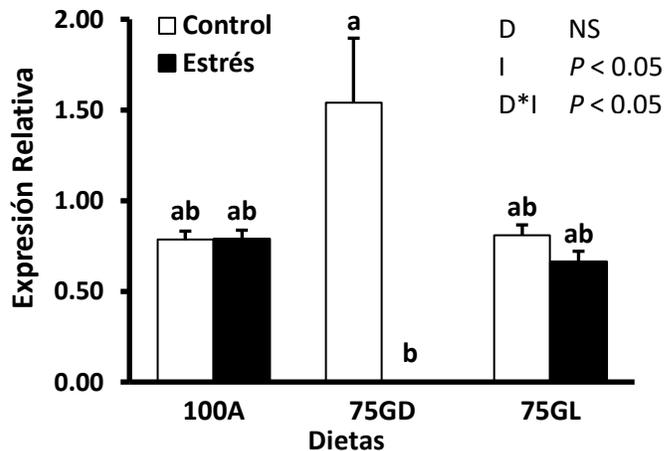
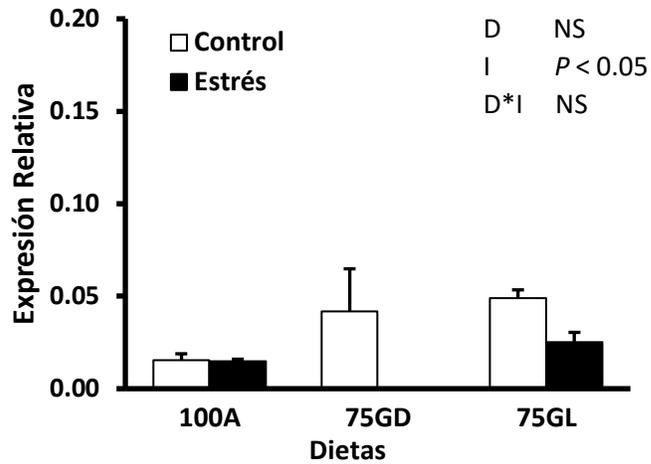
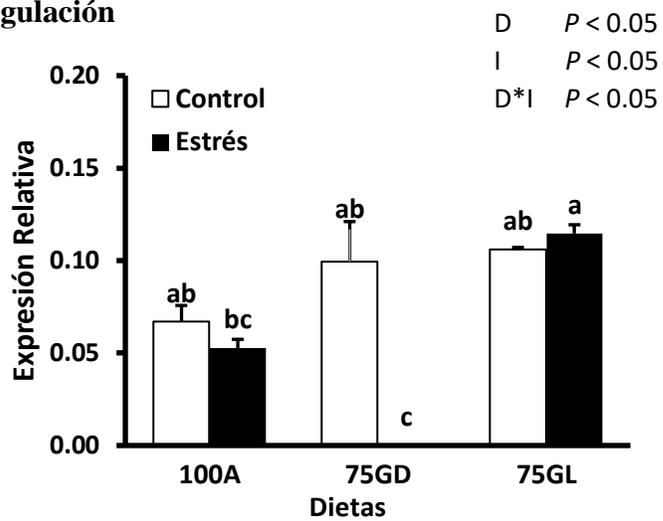


Figura 14. Expresión Relativa (promedio \pm EE) de los genes analizados (cMn-SOD, CAT, GPX) en PL 4 de *Litopenaeus vannamei* después de ser alimentadas con diferentes dietas y expuestas a un reto bacteriano durante 24 h. Control: postlarvas no infectadas; Estrés: postlarvas infectadas. D: dieta; I: infección; NS: no significativo. Letras diferentes indican diferencias significativas.

A) Profenoloxidasas I



B) Proteína de coagulación



C) TRAF6

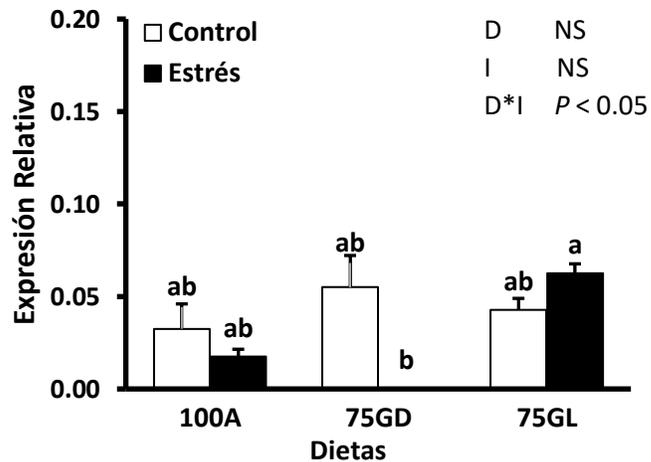


Figura 15. Expresión Relativa (promedio \pm EE) de los genes analizados (proFO I, CP, TRAF6) en PL 4 de *Litopenaeus vannamei* después de ser alimentadas con diferentes dietas y expuestas a un reto bacteriano durante 24 h. Control: postlarvas no infectadas; Estrés: postlarvas infectadas. D: dieta; I: infección; NS: no significativo. Letras diferentes indican diferencias significativas.

5. Discusión

5.1 Desempeño zootécnico de las postlarvas alimentadas con *Panagrolaimus* sp. enriquecidos con β -glucanos

En el presente trabajo, el origen del β -glucano usado en el enriquecimiento de *Panagrolaimus* sp. tuvo un impacto sobre el desempeño zootécnico de las postlarvas de *L. vannamei*. Tanto la longitud total como la supervivencia de las PL 3 fueron influenciadas negativamente cuando el 75% de *Artemia* fue sustituido por nematodos enriquecidos con el β -glucano proveniente de *D. hansenii*. Este efecto no fue observado cuando los animales fueron alimentados con *Panagrolaimus* sp. enriquecidos con el β -glucano procedente de *L. digitata*, a la misma densidad. Esta diferencia puede ser atribuida tanto al método de enriquecimiento de los nematodos como a la composición estructural de los β -glucanos utilizados. Como fue descrito en la sección de marco metodológico, el enriquecimiento de los nematodos con *L. digitata* se realizó en la empresa e-nema unas semanas previas al bioensayo mientras que el β -glucano extraído de *D. hansenii* fue mezclado con *Panagrolaimus* sp. recién hidratados en el CIBNOR, unas pocas horas antes de usarlos como presa viva. El utilizar diferentes condiciones y equipos para el enriquecimiento de los dos lotes de nematodos pudo haber influido en la concentración final del β -glucano presente en los organismos, aunque la misma concentración absoluta fue usada. Por lo mismo, es posible que el efecto inmunoestimulante del β -glucano proveniente de *D. hansenii* haya sido mayor que el procedente de *L. digitata* y haya provocado un efecto de “fatiga inmune”. Respecto a lo anterior, investigaciones previas han demostrado como una alta concentración de β -glucano en la dieta de camarones puede provocar un efecto nocivo en estos animales. Esto ha sido mostrado por Chang et al. (2000) quienes notaron una disminución en la supervivencia de reproductores de *P. monodon* a partir del vigésimo quinto día de suministrar una dieta conteniendo 2 g/kg de β -glucano. La mortalidad fue atribuida a un estado de “fatiga inmune” en los camarones, causado por una sobreestimulación de su sistema de defensa. Por otra parte, la influencia de la estructura de los β -glucanos en su efecto inmunoestimulante ya fue reportada por Sukumaran et al. (2010). Al alimentar postlarvas de *P. monodon* con diferentes β -glucanos, mostraron como aquellos con mayor peso molecular y menor grado de ramificaciones laterales (1,6) confirieron una mayor supervivencia a los organismos después de ser expuestos a una infección. Cabe destacar que los dos β -glucanos utilizados en el presente trabajo difieren en su composición estructural: *D.*

hanseni contiene un 17.8% de enlaces 1,6 (por cada 100 enlaces 1,3) (Sukumaran et al., 2010) mientras que *L. digitata* presenta solamente un 10.5% de estos enlaces (Liu et al., 2018a). Debido a lo anterior, quizás se podría atribuir el mejor desempeño zootécnico obtenido en las postlarvas alimentadas con *L. digitata* al menor grado de ramificaciones laterales presentes en dicho β -glucano. No obstante, no se determinó la concentración final de los β -glucanos en los nematodos, por lo que esta explicación no pudo verificarse.

Como se mencionó en la sección de antecedentes, la viabilidad de reemplazar 75% de *Artemia* por el nematodo *Panagrolaimus* sp. en el cultivo larvario de *L. vannamei*, desde zoea II hasta PL 1, ya fue señalada por Seychelles et al. (2017; artículo sometido el 1 de febrero del 2021), así como por Ayala-Aguilar (2019) y López-Galicia (2020). No obstante, en al menos dos de estos trabajos se obtuvieron PL 1 más pequeñas [diferencias de 300 y 400 μ m en Seychelles et al. (artículo sometido el 1 de febrero del 2021) y Seychelles et al. (2017), respectivamente] al utilizar dicha dieta comparada con el tratamiento 100% *Artemia*. La única vez en la que no se encontró esta diferencia de longitud total en este estadio postlarval, fue cuando Seychelles et al. (artículo sometido el 1 de febrero del 2021) utilizaron tanques de cultivo cónicos y más chicos (10 L) con un sistema de aireación en el fondo de las unidades que permitió mantener los nematodos suspendidos en la columna de agua. En el presente trabajo, se utilizaron tanques de cultivo más grandes (100 L) con un fondo ligeramente plano y dos piedras de aireación que no permitían una permanencia tan constante de los nematodos en la columna de agua (Mercier, comunicación personal). Esto podría indicar que además de las condiciones de cultivo, el enriquecimiento de *Panagrolaimus* sp. con el β -glucano proveniente de *L. digitata* favoreció de cierta manera y ligeramente el crecimiento de las postlarvas de *L. vannamei*. Este efecto fue claramente reportado en larvas del camarón *Fenneropenaeus chinensis* por Wang y Qi (2010) después de alimentarlas diariamente con una micro-dieta conteniendo 0.25% de β -1,3 glucanos. No se conoce el mecanismo responsable de este incremento en la tasa de crecimiento. López et al. (2003) sugirieron que el β -glucano incorporado en la dieta es degradado en el tracto digestivo por las β -glucanasas, lo cual produce energía. No obstante, esta hipótesis fue propuesta en camarones adultos y el sistema digestivo de las postlarvas de camarón es diferente.

5.2 Supervivencia de las postlarvas después de ser expuestas por 24 h a un reto bacteriano con *V. parahaemolyticus*

El suplementar las dietas con los distintos β -glucanos no confirió una mayor resistencia a las postlarvas ante la presencia de *V. parahaemolyticus*. Es posible que en el presente trabajo la concentración del β -glucano en la dieta 75GL no haya sido suficiente para brindar protección a las postlarvas durante el desafío. Sajeevan et al. (2009) encontraron que el suministro de una dieta conteniendo 0.2% de glucano a postlarvas de *F. indicus* incrementa significativamente su supervivencia al ser expuestas al virus de la mancha blanca, mientras que dietas con niveles más bajos de 0.05 y 0.1% no proporcionan este mismo efecto. En este trabajo, muestran la importancia de la dosis y frecuencia de administración de los inmunoestimulantes como son los glucanos. Respecto al uso del β -glucano extraído de *D. hansenii*, como ya se mencionó anteriormente, es probable que los camarones alimentados con esta dieta se encontraban en un estado de “fatiga inmune” al finalizar los 12 días del bioensayo alimenticio. Para realizar el desafío bacteriano, las postlarvas fueron capturadas y transferidas a unidades más pequeñas, así como trasladadas a otro laboratorio experimental. Las diferentes manipulaciones y cambios en las condiciones experimentales fueron probablemente fuentes adicionales de estrés para todas las postlarvas. Es posible que al momento del reto bacteriano el sistema inmune de las postlarvas alimentadas con la dieta 75GD se encontraba “debilitado” por la concentración en β -glucano y el estrés de manipulación, lo que explicaría la mortalidad registrada en el grupo control (no expuesto a *V. parahaemolyticus*) de este tratamiento.

Tanto la dieta suministrada como el proceso de infección tuvieron incidencia en la supervivencia de las postlarvas al finalizar las 24 h del reto bacteriano. Aquellas alimentadas con 100A y 75GL parecen haber resistido mejor al estrés de manipulación pre-desafío, el cual fue idéntico para todos los tratamientos e inevitable para realizar el mismo. Adicionalmente, las postlarvas que recibieron la dieta 75GL mostraron una clara tendencia, no estadísticamente significativa, en sobrevivir mejor ante la presencia de *V. parahaemolyticus* en el agua comparado con aquellas cultivadas con 75GD. El registro de la mortalidad post-desafío se realizó sobre un periodo de 24 h y es posible que esta tendencia observada fuera más pronunciada si se hubiera extendido el reto a 48 o 72 h. Por ejemplo, al suplementar la zingerona como inmunoestimulante

en la dieta de juveniles de *L. vannamei*, Chang et al. (2012) observaron diferencias significativas en la supervivencia de los organismos hasta las 72 h después de su exposición al *V. alginolyticus*. En un estudio realizado por Joshi et al. (2014), la dosis letal media (DL₅₀) de *V. parahaemolyticus* usada para infectar juveniles de *L. vannamei* fue de 1x10⁵ UFC/mL. Esta dosis fue calculada a partir de un bioensayo previo, el cual consistió en inyectar diferentes diluciones de la cepa bacteriana a los camarones y observar la mortalidad durante 48 h. En la presente investigación, se utilizó la misma concentración de *Vibrio* y a las 24 h del reto, un 56% de las postlarvas infectadas habían muerto. Esta diferencia en la letalidad del *Vibrio* puede deberse a la cepa usada, a las condiciones experimentales o a la mayor susceptibilidad de los organismos en estadios postlarvales ante una infección bacteriana (Aguirre-Guzmán et al., 2013).

5.3 Expresión de genes en las postlarvas alimentadas durante 12 días con *Panagrolaimus* sp. enriquecidos con dos diferentes β-glucanos:

En el presente trabajo, el suministro de la dieta 75GD durante 12 días provocó una mayor respuesta antioxidante en las PL 3, ya que se observó un incremento significativo en la expresión relativa de los genes CAT y GPX en dichos organismos en comparación con aquellos alimentados con 100A. Ceseña et al. (2021) reportaron también una mayor expresión relativa de los genes GPX y cMn-SOD en hepatopáncreas de juveniles de *L. vannamei* después del suministro de *D. hansenii* en el alimento y agua de cultivo durante 10 días. El aumento en la expresión relativa de estos dos genes fue atribuido a la activación del sistema antioxidante de los camarones en respuesta a la presencia del β-glucano y otros compuestos presentes en la pared celular de la levadura suministrada. Pacheco et al. (2012) también mencionaron que el uso de algunas cepas de *D. hansenii* pueden incrementar la actividad antioxidante de juveniles de *L. vannamei* y el número de hemocitos circulantes, los cuales poseen una capacidad citotóxica. En el presente estudio, la activación del sistema antioxidante no parece haber sido tan pronunciada en los camarones alimentados con 75GL, lo que puede deberse a varios factores como son la concentración efectiva de β-glucano en *Panagrolaimus* sp. después de su enriquecimiento con laminarina, así como la frecuencia de suministro y la estructura molecular de este β-glucano. Si bien Pacheco et al. (2012) reportaron un incremento de la actividad SOD y CAT en juveniles de *L. vannamei* después de

cultivarlos añadiendo diariamente laminarina en el agua de cultivo, no lograron observar dicho aumento al repetir el ensayo suministrando este inmunoestimulante cada 7 días.

Es importante mencionar que en el presente trabajo no se observó un incremento significativo en la expresión relativa del gen cMn-SOD en las PL 3 alimentadas con 75GD o 75GL. Estudios previos han descrito la actividad de enzimas antioxidantes como es la SOD y mostraron que fluctúa (“baja – sube – baja”), lo que podría estar relacionado con el nivel de sustratos disponibles para cada una de ellas (Liu et al., 2018b). Por ejemplo, Duan et al. (2018) evaluaron la activación del sistema antioxidante en juveniles de *L. vannamei* y notaron como los niveles de SOD aumentaron 6 h después de la exposición al estrés mientras que los de CAT y GPX mostraron un incremento solamente hasta las 24 h y 48 h, respectivamente. En relación con lo anterior, se puede inferir que había una mayor cantidad de peróxido de hidrógeno en las PL 3 alimentadas con 75GD al momento de muestrear, por lo que la expresión significativa de los genes CAT y GPX explica probablemente la eliminación de dicha especie reactiva de oxígeno. En las postlarvas alimentadas con 75GL, el nivel de peróxido de hidrógeno era probablemente menor, por lo que la expresión relativa del gen GPX no fue tan alta como en los camarones alimentados con 75GD. Tanto la GPX como la CAT presentan afinidad por el peróxido de hidrógeno. Sin embargo, se considera que la GPX tiene un rol más preponderante en la eliminación de este compuesto ya que se encuentra ampliamente distribuida por toda la célula y no solamente en los peroxisomas como es el caso de la CAT (Cohen y Hochstein, 1963). Eso podría explicar que la expresión génica de GPX en las PL 3 cultivadas con la dieta 75GD fue ocho veces más alta en comparación a la obtenida para CAT.

Aunque no fue significativa, se observó una ligera tendencia hacia una mayor expresión relativa de los genes codificantes para la proFO I y el TRAF6 en los organismos alimentados con las dietas 75GD y 75GL en comparación con los alimentados con *Artemia*. Rajkumar et al. (2017) al estudiar la ontogenia de *L. vannamei* notaron un incremento en la expresión relativa de proFO y TRAF6 en postlarvas (PL 5 – 10) al incorporar inmunoestimulantes de origen vegetal en la dieta alimenticia de los organismos. Estos autores atribuyeron los aumentos en la activación del sistema de defensa de las postlarvas por la presencia de los inmunoestimulantes. Cabe destacar que se demostró como el sistema proFO no es funcional durante los primeros estadios larvales del camarón y generalmente se desarrolla conforme avanza la ontogenia de los organismos, alcanzando un estado óptimo en juveniles y adultos (Jiravanichpaisal et al., 2007). Por lo tanto, se puede suponer que en el presente trabajo el sistema proFO de las PL 3 se encontraba aún inmaduro,

y por ende no se pudo observar un efecto inmunoestimulante más pronunciado con el uso de los β -glucanos.

5.4 Expresión de genes en las postlarvas alimentadas durante 12 días con *Panagrolaimus* sp. enriquecidos con dos diferentes β -glucanos y retadas con *V. parahaemolyticus*:

El estrés causado por la presencia de la bacteria ocasionó una baja expresión (casi nula) de todos los genes analizados en los organismos alimentados con la dieta 75GD. Estos bajos niveles en la expresión podrían indicar que al finalizar el reto bacteriano los organismos se encontraban muy débiles, incluso podríamos inferir que casi moribundos. Dicha teoría se puede sustentar ya que los niveles de expresión de los genes de referencia utilizados para el cálculo de los genes blanco de las postlarvas sometidas a la dieta 75GD también estuvieron por debajo de los niveles normales. Es decir, ni estos genes esenciales para el desarrollo de las postlarvas presentaban los niveles de expresión relativa de un organismo sano.

Por otro lado, la exposición al *Vibrio* generó un incremento significativo en la expresión relativa del gen CP en las postlarvas previamente alimentadas con nematodos enriquecidos con laminarina. Cuando Ekblom et al. (2021) estudiaron la expresión génica en otro crustáceo (*Pacifastacus leniusculus*), observaron como el uso de laminarina indujo un incremento en la expresión relativa del gen CP. Dicho equipo de trabajo concluyó que la proteína de coagulación además de evitar la pérdida de hemolinfa en crustáceos podría presentar un rol importante en el reconocimiento y eliminación de moléculas “no propias” para el organismo, razón por la cual su expresión aumenta ante la presencia de β -glucanos.

Pese a que en el presente trabajo no se logró apreciar un aumento en la expresión relativa de los demás genes analizados en las postlarvas previamente suplementadas con laminarina y sometidas a estrés bacteriano; Huang et al. (2012) reportaron un incremento de la expresión relativa de los genes ProPO y cMn-SOD después de suministrar laminarina en la dieta de adultos de *L. vannamei* y someter los animales a estrés por nitrito. De la misma manera, aunque no utilizaron laminarina, Rajkumar y su equipo de trabajo (2017) también observaron un aumento en la expresión relativa de TRAF6 en camarones juveniles después de ser alimentados con un inmunoestimulante herbal y ser sometidos a un desafío viral. Es posible que como se mencionó anteriormente varios factores propios de la laminarina, así como la concentración suministrada pudieron influir en desempeño inmunoestimulante de dicho β -glucano.

6. Conclusiones y recomendaciones

- El enriquecimiento de *Panagrolaimus* sp. con β -glucanos generó una activación del sistema de defensa en las postlarvas de *L. vannamei*. Se observó particularmente este efecto a nivel de la respuesta antioxidante de las postlarvas alimentadas con la dieta 75GD. No obstante, las PL 3 de este tratamiento parecieron encontrarse en un estado de “fatiga inmune” al finalizar los 12 días del bioensayo, lo cual podría deberse a una sobre activación de su sistema de defensa. La alta mortalidad observada durante el reto bacteriano, tanto en el grupo control como estrés, se debe probablemente a este estado de agotamiento.
- Las diferencias encontradas en el desempeño zootécnico y expresión génica entre las postlarvas cultivadas con 75GD y 75GL pueden explicarse tanto por la composición estructural de los β -glucanos como su concentración efectiva después del proceso de enriquecimiento de los nematodos. Debido a lo anterior, se recomienda estandarizar la metodología empleada en el enriquecimiento de los nematodos con el fin de suministrar a las postlarvas la misma concentración efectiva de inmunoestimulantes.
- El suplementar las dietas con los distintos β -glucanos no confirió una mayor resistencia a las postlarvas ante la presencia del *V. parahaemolyticus*. El registro de la mortalidad post-desafío se realizó sobre un periodo de 24 h y los resultados pudieran haber sido diferentes si se hubiera extendido el reto a 48 h o 72 h. Por lo mismo, se recomienda tomar este punto en consideración para futuras investigaciones.
- Se necesitan más estudios empleando sustancias inmunoestimulantes durante el cultivo larvario del camarón *L. vannamei*. De igual manera, el uso de *Panagrolaimus* sp. como vector de estas sustancias tiene que ser investigado más a fondo, probando diferentes dosis y frecuencias de suministro, entre otros factores.

7. Referencias

- Aguirre-Guzmán, G., López-Acevedo, E., & Vázquez-Sauceda, M. (2013). Efecto de *Vibrio harveyi* en la sobrevivencia de larvas de *Litopenaeus vannamei*. *Scientia Agropecuaria*, 4(2), 121–127. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2013.02.05>
- Álvarez-Lee, A., Martínez-Díaz, S., Gutiérrez-Rivera, J & Lanz-Mendoza, H. (2020). Induction of innate immune response in whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) embryos. *Developmental & Comparative Immunology*, 105, 103577. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2019.103577>.
- Andreatta, E., & Rosas, C. (2006). Perspectivas de la investigación en nutrición de camarones cultivados. En C. Rosas, O. Carrillo, R. Wilson, y E. R. Andreatta (Eds.). *Estado actual y perspectivas de la nutrición de los camarones peneidos cultivados en Iberoamérica* (pp. 320–322).
- Angulo, M., Reyes-Becerril, M., Medina-Córdova, N., Tovar-Ramírez, D., & Angulo, C. (2020). Probiotic and nutritional effects of *Debaryomyces hansenii* on animals. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104, 7689–7699. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10780-z>
- AQUA-TECNOLOGÍA, S.A. (2009). Proyecto laboratorio de camarón. Recuperado de <http://sinat.semarnat.gob.mx>
- Ayala Aguilar, J. (2019). *Suministro del nematodo Panagrolaimus sp. en el cultivo larvario del camarón blanco del Pacífico (Litopenaeus vannamei)* [Tesis de maestría, Universidad Autónoma de Baja California Sur].
- Ayub, F., Seychelles, L., Strauch, O., Wittke, M., & Ehlers, R-U. (2013a). Monoxenic liquid culture with *Escherichia coli* of the free-living nematode *Panagrolaimus* sp. (strain NFS 24-5), a potential live food candidate for marine fish and shrimp larvae. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97, 8049–8055. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5061-0>
- Ayub, F., Strauch, O., Seychelles, L., & Ehlers, R-U. (2013b). Influence of temperature on life history traits of the free-living, bacterial-feeding nematode *Panagrolaimus* sp. strain NFS-24. *Nematology*, 15(8), 939-946. <https://doi.org/10.1163/15685411-00002732>

- Bacic, A., Fincher, G., & Stone, B. (2009). *Chemistry, biochemistry, and biology of 1-3 beta glucans and related polysaccharides*. Academic Press.
- Barón-Sevilla, B., Bückle-Ramírez, L., & Hernández-Rodríguez, M. (2004). Cultivo intensivo de *Litopenaeus vannamei* Boone 1931, en un sistema de agua de mar recirculada. *Ciencias Marinas*, 30(1), 179–188. <http://www.scielo.org.mx/pdf/ciemar/v30n1b/v30n1ba3.pdf>
- Bauchau, A. (1981). Crustaceans. En N.A. Ratcliffe & A.F. Rowley (Eds.), *Invertebrates blood cells* (pp. 385–420). Academic Press
- Bray, W., & Lawrence, A. (1992). Reproduction of *Penaeus* species in captivity. En A. W. Fast & L. J. Lester. (Ed.), *Marine shrimp culture: principles and practices* (pp. 93–170). Elsevier.
- Breuer, U., & Harms, H. (2006). *Debaryomyces hansenii* – an extremophilic yeast with biotechnological potential. *Yeast*, 23, 415–437. <https://doi.org/10.1002/yea.1374>
- Brüggemann, J. (2012). Nematodes as live food in larviculture – a review. *Journal of World Aquaculture Society*, 43(6), 739–763. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2012.00608.x>
- Burgents, J., Burnett, K., & Burnett, L. (2004). Disease resistance of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, following the dietary administration of a yeast culture food supplement. *Aquaculture*, 231(1–4), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2003.09.003>
- Cabrera, J. (1991). Morfología del camarón postlarval *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* con fórmula rostral 3/0; organización y quetotaxia de la anténula. *Anales del Instituto de Biología. Serie Zoología*, 62(1), 41–55. <http://www.journals.unam.mx/index.php/zoo/article/view/7029/6537>
- Campa-Córdova, A., Hernández-Saavedra, N., De Philippis, R., & Ascencio, F. (2002). Generation of superoxide anion and SOD activity in haemocytes and muscle of American white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) as a response to β -glucan and sulphated polysaccharide. *Fish & Shellfish Immunology*, 12(4), 353–366. <https://doi.org/10.1006/fsim.2001.0377>
- Campa-Córdova, A., Valenzuela-Chávez, J., García-Armenta, J., Medina, D., Licon-Jain, C., Angulo-Valadez, C., Aguirre-Guzmán, G., y Mejía-Ruiz, C. (2017). Uso Profiláctico de Aditivos Inmunoestimulantes en el Cultivo del Camarón Blanco, *Litopenaeus vannamei*. En L. Cruz-Suárez, D. Ricque-Marie, M. Tapia-Salazar, M. Nieto-López, D. Villarreal-

- Cavazos, J. Gamboa-Delgado, L. López Acuña y M. Galaviz-Espinoza (Eds.). *Investigación y Desarrollo en Nutrición Acuícola* (pp. 536–555).
- Ceseña, C., Cortés-Jacinto, E., Luna-González, A., Vega-Villasante, F., Ochoa-Álvarez, N., Morelos-Castro, R., Escamilla-Montes, R., Tovar-Ramírez, D., Sánchez-Ortíz, A., & Campa-Córdova, A. (2021). Dietary supplementation of *Debaryomyces hansenii* enhanced survival, antioxidant and immune response in juvenile shrimp *penaeus vannamei* challenged with *Vibrio Parahaemolyticus*. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 24(2). <http://www.revista.ccba.uady.mx/urn:ISSN:18700462tsaes.v24i2.36169>
- Chang, C., Chen, H., Su, M. S., & Liao, I. (2000). Immunomodulation by dietary β -1, 3-glucan in the brooders of the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Fish & Shellfish Immunology*, 10(6), 505–514. <https://doi.org/10.1006/fsim.2000.0266>
- Chang, Y., Liu, C., Wu, C., Chiang, C., Lian, J., & Hsieh, S. (2012). Dietary administration of zingerone to enhance growth, non-specific immune response, and resistance to *Vibrio alginolyticus* in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) juveniles. *Fish & Shellfish Immunology*, 32(2), 284–290.
- Chang, J., Zhang, W., Mai, K., Ma, H., Liufu, Z., Wang, X., Ai, Q., & Xu, W. (2011). Effects of dietary β -glucan and glycyrrhizin on non-specific immunity and disease resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone) challenged with. *Aquaculture Research*, 42(8), 1101–1109. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2010.02696.x>
- Clegg, J. (1997). Embryos of *Artemia franciscana* survive four years of continuous anoxia: the case for complete metabolic rate depression. *Journal of Experimental Biology*, 200(3), 467–475. <https://jeb.biologists.org/content/200/3/467.short>
- Cohen, G., & Hochstein, P. (1963). Glutathione peroxidase: the primary agent for the elimination of hydrogen peroxide in erythrocytes. *Biochemistry*, 2, 1420–1428. <https://doi.org/10.1021/bi00906a038>
- D'Abramo, L., Isiordia Pérez, E., Sangha, R., & Puello-Cruz, A. (2006). Successful culture of larvae of *Litopenaeus vannamei* fed a microbound formulated diet exclusively from either stage PZ2 or M1 to PL1. *Aquaculture*, 261(4), 1356–1362. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.09.020>
- Dall, W., Hill, B., Rothlisberg, P., & Sharples, D. (1990). *The biology of the Penaeidae*. Academic Press Limited.

- Dam, T., & Brewer, C. (2010). Lectins as pattern recognition molecules: the effects of epitope density in innate immunity. *Glycobiology*, 20(3), 270–279. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwp186>
- Dhont, J., Dierckens, K., Støttrup, J., Van Stappen, G., Wille, M., & Sorgeloos, P. (2013). Rotifers, *Artemia* and copepods as live feeds for fish larvae in aquaculture. En G. Allan & G. Burnell (Eds.), *Advances in Aquaculture Hatchery Technology* (pp. 157–202). Woodhead Publishing.
- Duan, Y., Zhang, J., Wang, Y., Liu, Q., & Xiong, D. (2018). Nitrite stress disrupts the structural integrity and induces oxidative stress response in the intestines of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological and Integrative Physiology*, 329(1), 43–50. <https://doi.org/10.1002/jez.2162>
- Dugassa, H., & Gaetan, D. (2018). Biology of white leg shrimp, *Penaeus vannamei*: Review. *World Journal of Fish and Marine Sciences*, 10(2), 5–17. <https://doi:10.5829/idosi.wjfm.2018.05.17>
- Durliat, M. (1985). Clotting processes in crustacea decapoda. *Biological Reviews*, 60(4), 473–498. <https://doi:10.1111/j.1469-185x.1985.tb00620.x>
- Erwig, L., & Gow, N. (2016). Interactions of fungal pathogens with phagocytes. *Nature Reviews Microbiology*, 14(3), 163–176. <https://doi:10.1038/nrmicro.2015.21>
- FAO (1986). Manual para el cultivo y uso de *Artemia* en acuicultura. <http://www.fao.org/3/AB474S/AB474S00.htm>
- FAO (1995). Guía FAO para la identificación de especies para los fines de pesca. Pacífico Centro-Oriental. *Vertebrados*, 1, 418–537. <https://www.researchgate.net/publication/292139039>
- Fenucci, J. (1988). *Manual para la cría de camarones peneidos*. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. <http://www.fao.org/3/AB466S/AB466S00.htm>
- Flores-Miranda, M., Luna-González, A., Campa-Córdova, A., González-Ocampo, H., Fierro-Coronado, J., & Partida-Arangure, B. (2011). Microbial immunostimulants reduce mortality in whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) challenged with *Vibrio sinaloensis* strains. *Aquaculture*, 320(1–2), 51–55. <https://doi:10.1016/j.aquaculture.2011.08.005>

- Fukuhara, R., Tezuka, T., & Kageyama, T. (2002). Structure, molecular evolution, and gene expression of primate superoxide dismutases. *Gene*, 296(1–2), 99–109. [https://doi:10.1016/s0378-1119\(02\)00837-5](https://doi:10.1016/s0378-1119(02)00837-5)
- Galindo-Torres, P., Ventura-López, C., Llera-Herrera, R., & Ibarra, A. (2019). A natural antisense transcript of the fem-1 gene was found expressed in female gonads during the characterization, expression profile, and cellular localization of the fem-1 gene in Pacific white shrimp *Penaeus vannamei*. *Gene*, 706, 19–31. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2019.04.066>
- Gamboa-Delgado, J., & Le Vay, L. (2009). *Artemia* replacement in co-feeding regimes for mysis and postlarval stages of *Litopenaeus vannamei*: Nutritional contribution of inert diets to tissue growth as indicated by natural carbon stable isotopes. *Aquaculture*, 297(1–4), 128–135. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.09.009>
- García-Ortega, A., Verreth, J., Coutteau, P., Segner, H., Huisman, E., & Sorgeloos, P. (1998). Biochemical and enzymatic characterization of decapsulated cysts and nauplii of the brine shrimp *Artemia* at different developmental stages. *Aquaculture*, 161(1–4), 501–514. [https://doi:10.1016/s0044-8486\(97\)00297-4](https://doi:10.1016/s0044-8486(97)00297-4)
- Gaxiola, G., Gallardo, P., Ravallec, R., Durruty, C., García, T., Cuzon, G., Van Wormhoudt, A., y Pedroza, R. (2002). Avances en el uso de alimentos artificiales en la larvicultura de camarón. En: L. Cruz-Suárez, D. Ricque-Marie, M. Tapia-Salazar, M. Gaxiola-Cortés, y N. Simoes (Eds.). *Avances en Nutrición Acuícola VI. Memorias del Simposium Internacional de Nutrición Acuícola* (pp. 228-242).
- Gervais, N., & Zeigler, T. (2013). Synthetic products replace live *Artemia* in shrimp larviculture. *Global Aquaculture Advocate*, 16(3), 28–30.
- Gollas-Galvan, T., Cabanillas-Gómez, M., Hernández-López, J., Coronado-Molina, D., & Martínez-Porchas, M. (2017). Transcriptional expression of immune system genes in *Litopenaeus vannamei* during ontogenetic development. *Aquaculture Research*, 48(3), 1110–1118. <https://doi.org/10.1111/are.12953>
- Gómez Gil, B., Roque, A., & Guerra Flores, A. (2001). Enfermedades infecciosas más comunes en la camaronicultura en México y el impacto del uso de antimicrobianos. *Camaronicultura y Medio Ambiente*, 14, 315–346. <http://cesaibc.org/pdf/infointeres/crustaceos/enfermedadesmexico.pdf>

- Gracia, A., Vázquez-Bader, A., Arreguín-Sánchez, L., Schultz-Ruíz y Sánchez, J. (1997). Ecología de camarones peneidos. En D. Flores-Hernández, P. Sánchez-Gil, J. Seijo y F. Arreguín-Sánchez (Eds.). *Análisis y Diagnóstico de los Recursos Pesqueros Críticos del Golfo de México* (pp. 127–144). EPOMEX Serie Científica.
- Hellemans, J., Mortier, G., De Paepe, A., Speleman, F., & Vandesompele, J. (2007). qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biology*, 8(2), 1–14. <https://doi.org/10.1186/gb-2007-8-2-r19>
- Holmblad, T., & Söderhäll, K. (1999). Cell adhesion molecules and antioxidative enzymes in a crustacean, possible role in immunity. *Aquaculture*, 172(1-2), 111–123. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(98\)00446-3](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00446-3)
- Honnens, H., & Ehlers, R-U. (2013a). Cultivation of a free-living nematode *Panagrolaimus* sp. in batch and fed-batch liquid culture of *Saccharomyces cerevisiae* for larval food in marine aquaculture. *Russian Journal of Nematology*, 21(1), 13–21.
- Honnens, H., & Ehlers, R-U. (2013b). Liquid culture of *Panagrolaimus* sp. for use as food for marine aquaculture shrimp and fish species. *Nematology*, 15(4), 417–429. <https://doi.org/10.1163/15685411-00002689>
- Honnens, H., Assheuer, T., & Ehlers, R-U. (2013). Desiccation and storage of *Panagrolaimus* sp. (strain NFS-24-5). *Nematology*, 15(5), 557–566. <https://doi.org/10.1163/15685411-00002701>
- Honnens, H., Assheuer, T., & Ehlers, R-U. (2014). Enrichment of the nematode *Panagrolaimus* sp., a potential live food for marine aquaculture, with essential n-3 fatty acids. *Aquaculture International*, 22(2), 399–409. <https://doi.org/10.1007/s10499-013-9648-3>
- Hose, J., Martin, G., & Gerard, A. (1990). A decapod hemocyte classification scheme integrating morphology, cytochemistry, and function. *The Biological Bulletin*, 178(1), 33–45. <https://doi:10.2307/1541535>
- Jiravanichpaisal, P., Puanglarp, N., Petkon, S., Donnuea, S., Söderhäll, I., & Söderhäll, K. (2007). Expression of immune-related genes in larval stages of the giant tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Fish & Shellfish Immunology*, 23(4), 815–824. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2007.03.003>

- Johansson, M., & Soderhall, K. (1989). Cellular immunity in crustaceans and the proPO system. *Parasitology Today*, 5(6), 171–176. [https://doi.org/10.1016/0169-4758\(89\)90139-7](https://doi.org/10.1016/0169-4758(89)90139-7)
- Johansson, M., Keyser, P., Sritunyalucksana, K., & Söderhäll, K. (2000). Crustacean haemocytes and haematopoiesis. *Aquaculture*, 191(1–3), 45–52. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(00\)00418-X](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(00)00418-X)
- Jollès, P., & Jollès, J. (1984). What's new in lysozyme research? *Molecular and Cellular Biochemistry*, 63(2), 165–189. <https://doi.org/10.1007/BF00285225>
- Joshi, J., Srisala, J., Truong, V., Chen, I., Nuangsaeng, B., Suthienkul, O., Lo, C., Flegel, T., Sritunyalucksana, K., & Thitamadee, S. (2014). Variation in *Vibrio parahaemolyticus* isolates from a single Thai shrimp farm experiencing an outbreak of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND). *Aquaculture*, 428, 297–302. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.03.030>
- Karunasagar, I., Otta, S., & Karunasagar, I. (1998). Disease problems affecting cultured penaeid shrimp in India. *Fish Pathology*, 33(4), 413–419. <https://doi.org/10.3147/jsfp.33.413>
- Kitani, H. (1986). Larval development of the white shrimp *Penaeus vannamei* Boone reared in the laboratory and the statistical observation of its naupliar stages. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 52(7), 1131–1139. https://www.jstage.jst.go.jp/article/suisan1932/52/7/52_7_1107/_article/-char/ja/c
- Kitani, H. (1993). Morphology of postlarvae of the whiteleg shrimp *Penaeus vannamei*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 59(2), 223–227. <https://doi:10.2331/suisan.59.223>
- Kopáček, P., Grubhoffer, L., & Söderhäll, K. (1993). Isolation and characterization of a hemagglutinin with affinity for lipopolysaccharides from plasma of the crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *Developmental & Comparative Immunology*, 17(5), 407–418. [https://doi.org/10.1016/0145-305X\(93\)90032-L](https://doi.org/10.1016/0145-305X(93)90032-L)
- Kumar, T., Vidya, R., Kumar, S., Alavandi, S., & Vijayan, K. (2017). Zoea-2 syndrome of *Penaeus vannamei* in shrimp hatcheries. *Aquaculture*, 479, 759–767. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.07.022>
- Kurmaly, K., Jones, D., Yule, A., & East, J. (1989). Comparative analysis of the growth and survival of *Penaeus monodon* (Fabricius) larvae, from protozoa 1 to postlarva 1, on live feeds, artificial diets and on combinations of both. *Aquaculture*, 81(1), 27–45. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(89\)90228-7](https://doi.org/10.1016/0044-8486(89)90228-7)

- Le Moullac, G., Phillip de Laborie, L., Saulnier, D., Goarant, C., y Dehasque, M. (2000). Principios y problemas envueltos en la evaluación de inmunoestimulantes en juveniles de camarón. En R. Civera-Cerecedo, C.J. Pérez-Estrada, D. Ricque-Marie y Cruz-Suárez, L.E. (Eds.) *Avances en Nutrición Acuícola IV. Memorias del IV Simposium Internacional de Nutrición Acuícola* (pp. 509–139).
- Lee, S., & Söderhäll, K. (2002). Early events in crustacean innate immunity. *Fish & Shellfish Immunology*, 12(5), 421–437. <https://doi.org/10.1006/fsim.2002.0420>
- Litvinenko, L., Litvinenko, A., Boiko, E., & Kutsanov, K. (2015). *Artemia* cyst production in Russia. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 33(6), 1436–1450. <https://doi.org/10.1007/s00343-016-0264-8>
- Liu, K., Chiu, C., Shiu, Y., Cheng, W., & Liu, C. (2010). Effects of the probiotic, *Bacillus subtilis* E20, on the survival, development, stress tolerance, and immune status of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* larvae. *Fish & Shellfish Immunology*, 28(5–6), 837–844. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.01.012>
- Liu, Z., Xiong, Y., Yi, L., Dai, R., Wang, Y., Sun, M., Shao, X., Zhang, Z., & Yuan, S. (2018a). Endo- β -1, 3-glucanase digestion combined with the HPAEC-PAD-MS/MS analysis reveals the structural differences between two laminarins with different bioactivities. *Carbohydrate Polymers*, 194, 339–349. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.04.044>
- Liu, X., Wang, B., Li, Y., Wang, L., & Liu, J. (2018b). Effects of dietary botanical and synthetic astaxanthin on E/Z and R/S isomer composition, growth performance, and antioxidant capacity of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, in the nursery phase. *Invertebrate Survival Journal*, 15(1), 131–140. <https://doi.org/10.25431/1824-307X/isj.v15i1.131-140>
- López, N., Cuzon, G., Gaxiola, G., Taboada, G., Valenzuela, M., Pascual, C., Sánchez, A., & Rosas, C. 2003. Physiological, nutritional, and immunological role of dietary β 1-3 glucan and ascorbic acid 2-monophosphate in *Litopenaeus vannamei* juveniles. *Aquaculture*, 224(1–4), 223–243. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00214-X](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00214-X)
- López Galicia, M. (2020). *Crecimiento, supervivencia, composición bioquímica y expresión génica de enzimas digestivas en larvas de camarón Litopenaeus vannamei alimentadas con el nematodo Panagrolaimus sp., usando dos densidades y dos frecuencias de alimentación* [Tesis de licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México].

- López-Martínez, J. (Ed.). (2008). *Variabilidad Ambiental y Pesquerías de México*. México: Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca. <http://dspace.cibnor.mx:8080/handle/123456789/1694>
- Macey, B., & Coyne, V. (2005). Improved growth rate and disease resistance in farmed *Haliotis midae* through probiotic treatment, *Aquaculture*, 245, 249–261. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.11.031>
- Macey, B., & Coyne, V. (2006). Colonization of the gastrointestinal tract of farmed South African abalone *Haliotis midae* by the probionts *Vibrio midae* SY9, *Cryptococcus* sp. SS1, and *Debaryomyces hansenii* AY1. *Marine Biotechnology*, 8, 246–259. <https://doi.org/10.1007%2Fs10126-005-0113-9>
- Marques, M., & Barracco, M. (2000). Lectins, as non-self-recognition factors, in crustaceans. *Aquaculture*, 191(1–3), 23–44. [https://doi:10.1016/s0044-8486\(00\)00417-8](https://doi:10.1016/s0044-8486(00)00417-8)
- Martín, L., Castillo, N., Arenal, A., Rodríguez, G., Franco, R., Santiesteban, D., Sotolongo, J., Forrellat, A., Espinosa, G., Carrillo, O., & Cabrera, H. (2012). Ontogenetic changes of innate immune parameters from eggs to early postlarvae of white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda). *Aquaculture*, 358, 234–239. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.05.005>
- Martín-Manzo, M., Angulo, C., Zenteno-Galindo, E., Sierra-Beltrán, A., Agundis-Mata, C., Ascencio, F., Guzmán-Murillo, M., Luis-Villaseñor, I., Pereyra, A., & Campa-Córdova, Á. (2018). Eficiencia de lectinas como inmunoindicadores en juveniles de camarón blanco, *Litopenaeus vannamei* (Malacostraca:Penaeidae). *Hidrobiológica*, 28(3), 287–294. <https://doi.org/10.24275/uam/izt/dcbs/hidro/2018v28n3/campa>
- Medina López, G. (2012). *El recurso de Artemia de argentina: biodiversidad y uso en acuicultura* [Tesis doctoral, Universitat de València].
- Merdinger E., & Devine, E. (1965). Lipids of *Debaryomyces hansenii*. *Journal of Bacteriology*, 89, 1488–1493. <https://jb.asm.org/content/89/6/1488.short>
- Morelos, R., Ramírez, J., García-Gasca, A., & Ibarra, A. (2015). Expression of the myostatin gene in the adductor muscle of the Pacific lion-paw scallop *Nodipecten subnodosus* in association with growth and environmental conditions. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, 323(4), 239–255. <https://doi.org/10.1002/jez.1914>

- Muñoz, M., Cedeño, R., Rodríguez, J., van der Knaap, W., Mialhe, E., & Bachère, E. (2000). Measurement of reactive oxygen intermediate production in haemocytes of the penaeid shrimp, *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 191(1–3), 89–107. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(00\)00420-8](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(00)00420-8)
- Muñoz, J., & Pacios, F. (2010). Global biodiversity and geographical distribution of diapausing aquatic invertebrates: the case of the cosmopolitan brine shrimp, *Artemia* (branchiopoda, anostraca). *Crustaceana*, 83(4), 465–480. <https://doi.org/10.1163/001121610X489449>
- Nagaoka, M., Shibata, H., Kimura-Takagi, I., Hashimoto, S., Aiyama, R., Ueyama, S., & Yokokura, T. (2000). Anti-ulcer effects and biological activities of polysaccharides from marine algae. *Biofactors*, 12(1–4), 267–274.
- Nelson, T., & Lewis, B. (1974). Separation and characterization of the soluble and insoluble components of insoluble laminaran. *Carbohydrate Research*, 33(1), 63–74. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)82940-7](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)82940-7)
- Nimrat, S., Boonthai, T., & Vuthiphandchai, V. (2011). Effects of probiotic forms, compositions of and mode of probiotic administration on rearing of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) larvae and postlarvae. *Animal Feed Science and Technology*, 169, 244–258. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2011.07.003>
- Novak, M., & Vetvicka, V. (2008). β -Glucans, history, and the present: immunomodulatory aspects and mechanisms of action. *Journal of Immunotoxicology*, 5(1), 47–57. <https://doi.org/10.1080/15476910802019045>
- Ōnishi, H. (1963). Osmophilic yeasts. *Advances in Food Research*, 12, 53–94. [https://doi.org/10.1016/S0065-2628\(08\)60006-3](https://doi.org/10.1016/S0065-2628(08)60006-3)
- Ortuño, J., Cuesta, A., Rodríguez, A., Esteban, M., & Meseguer, A. (2002). Oral administration of yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, enhances the cellular innate immune response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 85, 41–50. [https://doi.org/10.1016/S0165-2427\(01\)00406-8](https://doi.org/10.1016/S0165-2427(01)00406-8)
- Pacheco, M., Campa, C., Aguirre, G., Luna, G., Guzmán M., & Ascencio, F. (2012). Efecto de *Debaryomyces hansenii* en la respuesta antioxidante de juveniles de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. *Revista MVZ Córdoba*, 17, 2820–2826. <https://doi.org/10.21897/rmvz.249>

- Pacheco, R., Ascencio, F., Zarain, M., Gómez, G., & Campa, Á. (2011). Enhancement of superoxide dismutase and catalase activity in juvenile brown shrimp, *Farfantepenaeus californiensis* (Holmes, 1900), fed β -1.3 glucan vitamin E, and β -carotene and infected with white spot syndrome virus. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 39(3), 534–543. <https://doi.org/10.3856/vol39-issue3-fulltext-13>
- Page, A., & Johnstone, I. (2007) The cuticle. In J. Kramer & G. Moerman. (Eds), *The C. elegans Research Community* (pp. 2–12), WormBook. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.138.1>
- Pérez Farfante, I. (1988). *Illustrated key to penaeid shrimps of commerce in the Americas*. <http://aquaticcommons.org/id/eprint/2757>
- Pérez-Farfante, I., & Kensley, B. (1997). Keys and diagnoses for the families and genera Penaeoid and sergestoid shrimps and prawns of the world. *Muséum National d'Histoire Naturelle*, 175, 23.
- Raa, J. (1996). The use of immunostimulatory substances in fish and shellfish farming. *Reviews in Fisheries Science*, 4(3), 229–288. <https://doi.org/10.1080/10641269609388587>
- Rajkumar, T., Taju, G., Majeed, S., Sajid, M., Kumar, S., Sivakumar, S., Thamizhvanan, S., Vimal, S., & Hameed, A. (2017). Ontogenetic changes in the expression of immune related genes in response to immunostimulants and resistance against white spot syndrome virus in *Litopenaeus vannamei*. *Developmental & Comparative Immunology*, 76, 132–142. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2017.06.001>
- Rees, J., Curé, K., Piyatiratitivorakul, S., Sorgeloos, P., & Menasveta, P. (1994). Highly unsaturated fatty acid requirements of *Penaeus monodon* postlarvae: an experimental approach based on *Artemia* enrichment. *Aquaculture*, 122(2–3), 193–207. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(94\)90510-X](https://doi.org/10.1016/0044-8486(94)90510-X)
- Reeve, M. (1963). The filter-feeding of *Artemia*: II. In suspensions of various particles. *Journal of Experimental Biology*, 40(1), 207–214. <https://jeb.biologists.org/content/40/1/207.short>
- Reyes-Becerril, M., Tovar-Ramírez, D., Ascencio-Valle, F., Civera-Cerecedo, R., Gracia-López, V., & Barbosa-Solomieu, V. (2008a). Effects of dietary live yeast *Debaryomyces hansenii* on the immune and antioxidant system in juvenile leopard grouper *Mycteroperca rosacea* exposed to stress. *Aquaculture*, 280, 39–44. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.03.056>

- Reyes-Becerril, M., Salinas, I., Cuesta, A., Meseguer, J., Tovar-Ramírez, D., & Ascencio-Valle, F. (2008b). Oral delivery of live yeast *Debaryomyces hansenii* modulates the main innate immune parameters and the expression of immune-relevant genes in the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish and Shellfish Immunology*, 25, 731–739. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2008.02.010>
- Reyes-Becerril, M., Tovar-Ramírez, D., Ascencio-Valle, F., Civera-Cerecedo, R., Gracia-López, V., & Barbosa-Solomieu, V. (2011a). Effects of dietary supplementation with probiotic live yeast *Debaryomyces hansenii* on the immune and antioxidant systems of leopard grouper *Mycteroperca rosacea* infected with *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture Research*, 42, 1676–1686.
- Reyes-Becerril, M., Esteban, M., Tovar-Ramírez, D., & Ascencio-Valle, F. (2011b). Polyamine determination in different strains of the yeast *Debaryomyces hansenii* by high pressure liquid chromatography. *Food chemistry*, 127, 1862–1865. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.02.006>
- Reyes-Becerril, M., Ascencio-Valle, F., Meseguer, J., Tapia-Paniagua, S., Moriñigo, M., & Esteban, M. (2012). *Debaryomyces hansenii* L2-enriched diet enhances the immunity status, gene expression and intestine functionality in gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Aquaculture Research*, 43, 1107–1118. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2011.02914.x>
- Rioux, L-E., Turgeon, S., & Beaulieu, M. (2010). Structural characterization of laminaran and galactofucan extracted from the brown seaweed *Saccharina longicuris*. *Phytochemistry*, 71(13), 1586–1595. <https://doi:10.1016/j.phytochem.2010.05.021>
- Ririe, K., Rasmussen, R., & Wittwe, C. (1997). Product Differentiation by Analysis of DNA Melting Curves during the Polymerase Chain Reaction. *Analytical Biochemistry*, 245(2),154-160. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.9916>
- Robinson, C., Samocha, T., Fox, J., Gandy, R., & McKee, D. (2005). The use of inert artificial commercial food sources as replacements of traditional live food items in the culture of larval shrimp, *Farfantepenaeus aztecus*. *Aquaculture*, 245, 135–147. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.11.051>
- Roch, P. (1999). Defense mechanisms and disease prevention in farmed marine invertebrates. *Aquaculture*, 172(1–2), 125–145. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(98\)00439-6](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00439-6)

- Rouse, D., Webster, C., & Radwin, I. (1992). Enhancement of the fatty acid composition of the nematode *Panagrellus redivivus* using three different media. *Journal of the World Aquaculture Society*, 23(1), 89–95. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.1992.tb00755.x>
- Sajeevan, T., Philip, R., & Singh, I. (2009). Dose/frequency: a critical factor in the administration of glucan as immunostimulant to Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus*. *Aquaculture*, 287(3–4), 248–252. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.10.045>
- Sarlin, P., & Philip, R. (2011). Efficacy of marine yeasts and baker's yeast as immunostimulants in *Fenneropenaeus indicus*: A comparative study. *Aquaculture*, 321, 173–178. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.08.039>
- Schlechtriem, C., Ricci, M., Focken, U., & Becker, K. (2004). The suitability of the free-living nematode *Panagrellus redivivus* as live food for first-feeding fish larvae. *Journal of Applied Ichthyology*, 20(3), 161–168. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2004.00542.x>
- Seychelles, L., Mercier, L., Holmer, M., Wittke, M., & Ehlers R-U. (2017). A desiccation-tolerant nematode as live feed for *Litopenaeus vannamei* (Boone) larvae. *Aquaculture Research*, 48, 5146–5149. <https://doi.org/10.1111/are.13177>
- Seychelles, L., Happe, S., Palacios, E., Ludwig, M., Hollmer, S., Ehlers, R.-U., & Mercier, L. (2018). Successful rearing of whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* larvae fed a desiccation-tolerant nematode to replace *Artemia*. *Aquaculture Nutrition*, 24(2), 903–910. <https://doi.org/10.1111/anu.12626>
- Seychelles, L., Ayala-Aguilar, J., Estrada, N., López, M., Ayala-Perez, V., Ludwig, M., & Mercier, L. (2021, artículo sometido). Zootechnical performance, biochemical composition and gene expression of digestive enzymes in *Litopenaeus vannamei* post-larvae fed the nematode *Panagrolaimus* sp. (NFS 24-5).
- Shannon, A., Browne, J., Boyd, J., Fitzpatrick, D., & Burnell, A. (2005). The anhydrobiotic potential and molecular phylogenetics of species and strains of *Panagrolaimus* (Nematoda, Panagrolaimidae). *Journal of Experimental Biology*, 208(12), 2433–2445. <https://doi.org/10.1242/jeb.01629>
- Sies H. 1993. Strategies of antioxidant defense. *European Journal of Biochemistry*, 215, 213–9.
- Söderhäll, K., & Cerenius, L. (1992). Crustacean immunity. *Annual Review of Fish Diseases*, 2, 3–23. [https://doi.org/10.1016/0959-8030\(92\)90053-Z](https://doi.org/10.1016/0959-8030(92)90053-Z)

- Sorgeloos, P. (1980). The use of the brine shrimp *Artemia* in aquaculture. In G. Persoone, P. Sorgeloos, O. Roles, & E. Jaspers (Eds). *The Brine Shrimp Artemia* (pp. 25–45).
- Sritunyalucksana, K., & Söderhäll, K. (2000). The proPO and clotting system in crustaceans. *Aquaculture*, 191(1–3), 53–69. [https://doi:10.1016/s0044-8486\(00\)00411-7](https://doi:10.1016/s0044-8486(00)00411-7)
- Stock, C., & Gervais, N. (2011). Aquaculture's *Artemia* addiction—Commercial alternatives offer benefits over wild *Artemia*. *Global Aquaculture Advocate*, 14(1), 44–45.
- Sugumar, V. (2010). Reproduction in the brine shrimp *Artemia* Leach, 1819 (Branchiopoda, Anostraca) from South India: Laboratory cross fertility tests and mating behaviour. *North-Western Journal of Zoology*, 6(2), 162-171. <http://www.biozoojournals.ro/nwjz/content/v6.2/nwjz.061115.Sugumar.pdf>
- Sukumaran, V., Lowman, D., Sajeevan, T., & Philip, R. (2010). Marine yeast glucans confer better protection than that of baker's yeast in *Penaeus monodon* against white spot syndrome virus infection. *Aquaculture Research*, 41, 1799–1805. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2010.02520.x>
- Tovar-Ramírez, D., Zambonino Infante, J., Cahu, C., Gatesoupe, F., & Vázquez-Juárez, R. (2004). Influence of dietary live yeast on European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larval development. *Aquaculture*, 234, 415–427. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.01.028>
- Tovar-Ramírez, D., Mazurais, D., Gatesoupe, F., Quazuguel, P., Cahu, C., & Zambonino-Infante, J. (2010). Dietary probiotic live yeast modulates antioxidant enzyme activities and gene expression of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Aquaculture*, 300, 142–147. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.12.015>
- Treece, G., & Yates, M. (1988). *Laboratory Manual for the Culture of Penaeid Shrimp Larvae*. Texas A&M University.
- Vandenberghe, J., Verdonck, L., Robles-Arozarena, R., Rivera, G., Bolland, A., Balladares, M., Gómez-Gil, B., Calderón, J., Sorgeloos, P., & Swings, J. (1999). Vibrios associated with *Litopenaeus vannamei* larvae, postlarvae, broodstock, and hatchery probionts. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(6), 2592–2597. <https://doi.org/10.1128/AEM.65.6.2592-2597.1999>

- Vanhaecke, P., Tackaert, W., & Sorgeloos, P. (1987). The biogeography of *Artemia*: an updated review. In P. Sorgeloos, D. A. Bengtson, W. Declair, & E. Jaspers (Eds). *Artemia Research and its Applications* (pp.129–155).
- Vargas-Albores, F., Gollas-Galván, T., & Hernández-López, J. (2005). Functional characterization of *Farfantepenaeus californiensis*, *Litopenaeus vannamei* and *L. stylirostris* haemocyte separated using density gradient centrifugation. *Aquaculture Research*, 36, 352–360. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2004.01207.x>
- Velázquez Lizárraga, A. (2016). *Identificación de genes relacionados con las rutas de señalización del sistema inmune de Litopenaeus vannamei (Boone, 1931) expuesto a un fertilizante enriquecido con silicio orgánico*. [Tesis de maestría, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste].
- Ventura-López, C., Gómez-Anduro, G., Arcos, F., Llera-Herrera, R., Racotta, I., & Ibarra, A. (2016). A novel CHH gene from the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* was characterized and found highly expressed in gut and less in eyestalk and other extra-eyestalk tissues. *Gene*, 582, 148–160. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2016.02.011>
- Vinh, H. (2017). *Contribution of natural plankton to the diet of white leg shrimp Litopenaeus vannamei (Boone, 1931) post-larvae in fertilized pond conditions*. [Master of Science in Aquaculture, Ghent University].
- Wang, X., & Qi, C. (2010). Effect of dose and feeding frequency of glucan as immunostimulant to Chinese *Fenneropenaeus chinensis* from zoea to postlarvae. *Journal of Applied Animal Research*, 38(1), 123–128. <https://doi.org/10.1080/09712119.2010.9707170>
- Wang, P., Wan, D., Gu, Z., Deng, X., Weng, S., Yu, X., & He, J. (2011). *Litopenaeus vannamei* tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6) responds to *Vibrio alginolyticus* and white spot syndrome virus (WSSV) infection and activates antimicrobial peptide genes. *Developmental & Comparative Immunology*, 35(1), 105–114. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2010.08.013>
- Wang, D., Li, F., Li, S., Wen, R., & Xiang, J. (2012). Expression profiles of antimicrobial peptides (AMPs) and their regulation by Relish. *Chinese journal of oceanology and limnology*, 30(4), 611–619. <https://doi.org/10.1007/s00343-012-1195-7>

- Wang, X., & Wang, J. (2013). Diversity and multiple functions of lectins in shrimp immunity. *Developmental & Comparative Immunology*, 39(1–2), 27–38. <http://doi:10.1016/j.dci.2012.04.009>
- Warner, H. (1994). Superoxide dismutase, aging, and degenerative disease. *Free Radical Biology and Medicine*, 17(3), 249–258. [http://doi:10.1016/0891-5849\(94\)90080-9](http://doi:10.1016/0891-5849(94)90080-9)
- Wickins, J., & Lee, D. (2002). *Crustacean farming: ranching and culture* (2nd ed.). Blackwell Science Ltd.
- Xie, C., Zhang, Y., Chen, J., Liu, C., Zhou, W., Li, Y., Zhang, M., Zhang, R., Wei, L., & Li, C. (2012). Hominoid-specific de novo protein-coding genes originating from long non-coding RNAs. *PLoS Genetics*, 8(9), e1002942. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002942>
- Zar, J. (1999). *Biostatistical Analysis* (4th ed.). Prentice Hall.
- Zhao, H., Cao, J., Wang, A., Du, Z., Ye, C., Huang, Y., Lan, H., & Li, G. (2012). Effect of long-term administration of dietary β -1, 3-glucan on growth, physiological, and immune responses in *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). *Aquaculture International*, 20(1), 145–158. <https://doi.org/10.1007/s10499-011-9448-6>