

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE ALGAS CAFÉS SOBRE
LA RESPUESTA INMUNE EN CAMARÓN BLANCO**
Penaeus vannamei (BOONE, 1931)

POR

MYRIAM CECILIA IBARRA MARTÍNEZ

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN
CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

2025

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE ALGAS CAFÉS SOBRE LA
RESPUESTA INMUNE EN CAMARÓN BLANCO *Penaeus vannamei*
(BOONE, 1931)**

Comité de Tesis



DRA. MARTHA GUADALUPE NIETO LÓPEZ

Presidente



DRA. LUCÍA ELIZABETH CRUZ SUÁREZ

Secretario



DRA. MIREYA TAPIA SALAZAR

Vocal



DRA. MARIBEL MALDONADO MUÑIZ

Vocal



DRA. MYRIAM ELÍAS SANTOS

Vocal

DRA- KATIUSHKA ARÉVALO NIÑO

Subdirectora de Posgrado



DRA- MARTHA GABRIELA GAXIOLA CORTÉS

Asesor Externo

DERECHOS RESERVADOS© PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL Todo el material contenido en esta Tesis está protegido, el uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material contenido que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo mencionando al autor o autores.

Financiamiento Este trabajo fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT al presente proyecto Ciencia Básica. Clave: 238458

AGRADECIMIENTOS A:

El presente trabajo se realizó gracias al apoyo económico por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT al presente proyecto Ciencia Básica. Clave:

238458

♡Agradezco enormemente a las doctoras Elizabeth Cruz, Martha Nieto y Mireya Tapia, sin ustedes no tendría los conocimientos que actualmente poseo, gracias por apoyarme, enseñarme y ser una guía en el camino de todos los estudiantes, por buscar soluciones ante cualquier problema que se presente y la convivencia que día a día tenemos.

♡A mis compañeros y amigos del doctorado en ciencias y del laboratorio de Maricultura, a los chicos de servicio social y tesistas que colaboraron conmigo y con los proyectos, a los alumnos que llegue a enseñar en el proceso.

♡A todas las personas que me apoyaron con análisis y muestras, a la doctora Gaby Gaxiola y el personal de la UMDI en Sisal Yucatán.

♡A todos los recursos tecnológicos, organismos utilizados y equipos, facilitando el trabajo y las tareas.

♡A mis amigos por todos esos momentos de risas y decirme que comiera y durmiera bien después de tanto estrés y trabajo.

♡A mis padres y hermanos por su comprensión, ayuda y apoyo, por las llamadas telefónicas cuando estuve lejos de casa.

♡A Victorino Sepúlveda, gracias por estar en esta última parte y la más importante de mi doctorado y el inicio de nuestro camino juntos, por tu amor, compañía y comprensión, ser todo para mi.

DEDICATORIAS

♡ Dedico esté trabajo a mí misma, gracias por continuar, no rendirte en el camino, ni en la vida, por ponerte metas y darte ánimos en todo momento, cuando dejaste de hacer mucho por centrarte, cuando después de noches y días difíciles seguiste adelante, lo lograste. A mis padres y a mi amor, les dedico mis logros

Spinn spinn, viljen vinna

Songen vevjar andevind

Hugen veljer, hugen vinn

Tråden tvinnar, tråden bind

Under måne yver haug

Under galge talar daud

Vidt eg fér, vidt eg ser

Dulram, vart eg under hengd mann

Galdra vaken daud mann

Hamram, fór eg yver land

Fór eg som ein gand

Tvinna rangsols

Ragn-frod

Ser eg, er eg alt

Vil eg, vinn eg alt

Eg var og eg er vind

Eg er vinda, vevja,

hapt og tvinna

Índice

ÍNDICE DE FIGURAS.....	11
LISTA DE SIGNOS Y ABREVIATURAS.....	14
1. Introducción.....	1
2. Antecedentes.....	3
2.1 Importancia del cultivo de <i>P. vannamei</i>	3
2.2 El sistema inmune en el camarón blanco	5
2.3 <i>Vibrio parahaemolyticus</i> y su importancia como infección en el camarón blanco	7
2.4 Uso de inmunoestimulantes para la prevención de enfermedades	8
2.5 Uso de algas como nutraceutico en especies acuicolas	9
2.6 Expresión de genes de respuesta inmune en peneidos	14
3. Justificación:.....	19
4. Hipótesis	20
5. Objetivo general:.....	20
5.1 Objetivos específicos.....	20
6. Diseño experimental:	21
7. Material y métodos	22
7.1. Programa Maricultura (PM)	22
7.2 Organismos experimentales	24
7.3 UMDI SISAL UANL	25
7.4 Organismos experimentales (poslarvas) para desafío	27
7.5 Algas utilizadas, procedencia y origen.....	27
7.5.1 Procesamiento en el laboratorio.....	28
7.5.2 Identificación	28
7.5.4Elaboración del Extracto de las algas cafés	28
7.6 Dietas experimentales.....	31
7.7 Bioensayo previo nutricional y parámetros a evaluar	34
7.7 Bioensayos de inmunoestimulación, parámetros a evaluar.....	36
7.1.1 Toma de muestra de hemolinfa.....	36
7.1.2 Determinación de parámetros de respuesta inmune en hemolinfa.....	37
7.1.3 Análisis qPCR de los organismos inmunoestimulados.....	39
7.1.3.2 Aislamiento de RNA y obtención de RNA complementario.....	40

7.1.4	Desafío bacteriano.....	42
8.	Resultados.....	45
8.1	Selección y caracterización de las algas y sus extractos	45
8.2	Bioensayo nutricional y de rendimiento.....	53
8.3	Inmunoestimulación por inmersión con Ecklonia arborea y Silvetia compressa...53	
8.4	Inmunoestimulación oral mediante la dieta con harina de Ecklonia arborea y Silvetia compressa o sus extractos	68
8.5	Análisis de qPCR de genes relacionados a respuesta inmune de organismos alimentados con el extracto de E. arborea.....	75
8.6	Desafío bacteriano con Vibrio parahaemolyticu	78
9.	Discusión	85
9.1	Composición proximal de las algas.....	85
9.2	Bioensayo nutricional.....	86
9.3	Efecto inmunoestimulante de las algas E. arborea y S. compressa en el camarón blanco P. vannamei.....	87
9.4	Resistencia a Vibrio en camarón blanco P. vannamei que ha sido inmunoestimulado con E. arborea mediante la dieta.....	93
10.	Conclusión	95
11.	Bibliografía	95
	ANEXO.....	107

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Algas y/o sus extractos con propiedades inmunoestimulantes evaluadas en especies acuícolas.....	10
Tabla 2. Estudio de expresión de genes en organismos acuáticos con algas y/o sus extractos con propiedades inmunoestimulantes.....	15
Tabla 3. Dietas experimentales formuladas con el programa Nutrion 5 para camarón blanco <i>Penaeus vannamei</i>	33
Tabla 4. Parámetros de calidad del agua de los organismos mantenidos en el bioensayo.....	36
Tabla 5. Tratamientos evaluados durante el bioensayo infeccioso.....	43
Tabla 6. Rendimiento del extracto en agua caliente (rico en polisacáridos) de cada alga analizada.....	45
Tabla 7. Rendimiento del extracto en agua caliente (rico en polisacáridos) de cada alga analizada.....	46
Tabla 8. Composición química para <i>E. arborea</i> y <i>P. compressa</i>	50
Tabla 9. Composición química de <i>E. arborea</i> y <i>P. compressa</i> (% w/w).....	51
Tabla 10. Análisis proximal de las dietas experimentales.....	52
Tabla 11. Parámetros zootécnicos de los camarones alimentados con las dietas experimentales con inclusión de los extractos ricos en polisacáridos en condiciones controladas de laboratorio, evaluados a los 15 días del bioensayo.....	53
Tabla 12. Concentración celular de hemocitos (Hg, Hsg, Hh y CTH) en la hemolinfa de <i>L. vannamei</i> puestos en contacto con los diferentes tratamientos respecto al tiempo de muestreo (cel/ml). Valores expresados como media \pm DE. Distintas letras expresan diferencias significativas ($\alpha \leq 0.05$).....	57
Tabla 13. Actividad de la fenoloxidasas libre (FOL) y fenoloxidasas total (FOT) en la hemolinfa de <i>L. vannamei</i> puestos en contacto con los diferentes tratamientos respecto al tiempo de muestreo (DO. 492nm). Valores expresados como media \pm DE. Distintas letras expresan diferencias significativas ($\alpha \leq 0.05$).....	59
Tabla 14. Concentración celular de hemocitos (Hg, Hsg, Hh y CTH) en la hemolinfa de <i>L. vannamei</i> puestos en contacto con los diferentes tratamientos respecto al tiempo de muestreo (cel/ml). Valores expresados como media \pm DE. Distintas letras expresan diferencias significativas ($\alpha \leq 0.05$).....	64
Tabla 15. Actividad de la fenoloxidasas libre (FOL) y fenoloxidasas total (FOT) en la hemolinfa de <i>L. vannamei</i> puestos en contacto con los diferentes tratamientos respecto al tiempo de muestreo (DO. 492nm). Valores expresados como media \pm DE. Distintas letras expresan diferencias significativas ($\alpha \leq 0.05$).....	67
Tabla 16. Concentración celular de hemocitos (Hg, Hsg, Hh y CTH) en la hemolinfa de <i>L. vannamei</i> puestos en contacto con los diferentes tratamientos respecto al tiempo de muestreo (cel/mL). Valores expresados como media \pm DE. Distintas letras expresan diferencias significativas ($\alpha \leq 0.05$).....	71
Tabla 17. Actividad de la fenoloxidasas libre (FOL) y fenoloxidasas total (FOT) y Estallido Respiratorio (ER) en la hemolinfa de <i>P. vannamei</i> puestos en contacto con los	

diferentes tratamientos respecto al tiempo de muestreo. Valores expresados como media \pm DE. Distintas letras expresan diferencias significativas ($\alpha \leq 0.05$)74

Tabla 18. Organismos experimentales sobrevivientes y sus tractos digestivos disectados a las 120h de infección al término del bioensayo infeccioso.79

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Sala de bioensayos del Programa Maricultura (PM) UANL	24
Fig. 2. Recibo, mantenimiento y distribución de juveniles de <i>P. vannamei</i> en el Programa Maricultura.	25
Fig. 3. Organismos utilizados en el presente estudio correspondiente al camarón blanco del pacífico <i>Penaeus vannamei</i>	25
Fig. 4. Recibo y manejo de los organismos utilizados en la unidad Sisal UNAM en Yucatán.	26
Fig. 5. Instalaciones Sisal UNAM, Yucatán México	26
Fig. 6. Área de colecta de macroalgas pardas en La Escalera, Península de Baja California, México.	28
Fig. 7. Acuarios (10 L) y organismos experimentales utilizados para el bioensayo de inmunoestimulación por inmersión	35
Fig. 8. Muestreo y toma de hemolinfa de los organismos experimentales empleados.....	37
Fig. 9. Lector de microplacas utilizado en el laboratorio de Química Central Sisal UNAM en Yucatán.	37
Fig. 10. A) Tipos de hemocitos presentes en la hemolinfa del camarón blanco <i>P. vannamei</i> . Recurso obtenido de (Ching 2019). B) Conteo en cámara de Neubauer.....	39
Fig. 11. NanoDrop y termociclador utilizados para análisis, Laboratorio Molecular Unidad Sisal UNAM, Yucatán.....	41
Fig. 12. Acuarios experimentales utilizados en el experimento de desafío bacteriano....	44
Fig. 13. Rendimiento en peso seco de los extractos en agua caliente de las diferentes macroalgas.....	46
Fig. 14. Reducción del NBT en la prueba de estallido respiratorio para cada uno de los extractos evaluados, letras distintas representan diferencias significativas	47
Fig. 15. Composición de A) Aminoácidos, B) Ácidos grasos, C) Minerales y D) Azúcares en las harinas de las algas <i>E. arborea</i> y <i>S. compressa</i>	49
Fig. 16. Células granulosa (A), células semigranulosas (B), células hialinas (C) y cuenta total de hemocitos (D) de camarón blanco <i>Penaeus vannamei</i> que fueron inmersos durante un bioensayo de 5 horas en agua marina sintética conteniendo <i>E. arborea</i> en polvo a 100, 300 y 500ppm; y su extracto rico en polisacáridos a 50, 150 y 300ppm. ...	55
Fig. 17. Fenoloxidasa libre (FOL)(A), fenoloxidasa total (FOL) (B) de camarón blanco <i>Penaeus vannamei</i> que fueron inmersos durante un bioensayo de 5 horas en agua marina sintética conteniendo <i>E. arborea</i> en polvo a 100, 300 y 500ppm; y su extracto rico en polisacáridos a 50, 150 y 300ppm.	58
Fig. 18.. Células granulosa (A), células semigranulosas (B), células hialinas (C) y cuenta total de hemocitos (D) de camarón blanco <i>Penaeus vannamei</i> que fueron inmersos durante un bioensayo de 5 horas en agua marina sintética conteniendo <i>S. compressa</i> en polvo a 100, 300 y 500ppm; y su extracto rico en polisacáridos a 50, 150 y 300ppm.....	61
Fig. 19. Fenoloxidasa libre (FOL)(A), fenoloxidasa total (FOL) (B) de camarón blanco <i>Penaeus vannamei</i> que fueron inmersos durante un bioensayo de 5 horas en agua marina	

sintética conteniendo <i>S. compressa</i> en polvo a 100, 300 y 500ppm; y su extracto rico en polisacáridos a 50, 150 y 300ppm.....	66
Fig. 20. Células granulosa (A), células semigranulosas (B), células hialinas (C) y cuenta total de hemocitos (D) de camarón blanco <i>Penaeus vannamei</i> que fueron inmersos durante un bioensayo de 15 días de alimentación con las dietas experimentales.	69
Fig. 21. Fenoloxidasa libre (FOL)(A), fenoloxidasa total (FOL) (B) de camarón blanco <i>Penaeus vannamei</i> que fueron alimentados durante un bioensayo de 15 días de alimentación con dietas experimentales	72
Fig. 22. Estallido respiratorio en camarones blancos <i>Penaeus vannamei</i> que han sido alimentados con las dietas experimentales durante 15 días. Cada línea representa el valor promedio de 15 camarones con la desviación estándar. Los datos al mismo tiempo de exposición con letras diferentes indican diferencias significativamente ($p < 0.05$)	73
Fig. 23. Análisis de las curvas de disociación de los genes β -actina (A), SOD (B), Hemocianina (C) y ProFO (D) de <i>P. vannamei</i> por qPCR.	76
Fig. 24. Efectos del extracto de <i>E. arborea</i> en los niveles de expresión de mRNA en genes relacionados en respuesta inmune en hepatopáncreas de <i>P. vannamei</i> . Datos presentados como media \pm SD ($n = 9$ replicados, 3 camarones por replicado). Diferentes letras en las barras indican diferencias significativas ($P < 0.05$).	78
Fig. 25. Organismos muertos tomados de los acuarios experimentales en las primeras 20h del bioensayo, se observa el tracto intestinal medio vacío, melanización y hp pálido.	79
Fig. 26. Mortalidad acumulada de los camarones correspondientes a los tratamientos después del desafío con <i>Vibrio parahaemolyticus</i> número de organismos muertos se muestran en las líneas con los marcadores oscuros. Los valores son mostrados como promedio de las réplicas de acuarios \pm DE ($n=4$)	81
Fig. 27. Mortalidad acumulada y organismos muertos a través del tiempo correspondientes a los distintos tratamientos individuales después del desafío con <i>Vibrio parahaemolyticus</i> . Los valores son mostrados como promedio de las réplicas de acuarios \pm DE ($n=4$) A) Control, B) Testigo, C) Extracto rico en polisacáridos de <i>E. arborea</i> 1 g Kg ⁻¹ . D) Extracto rico en polisacáridos de <i>E. arborea</i> 2 g Kg ⁻¹	83
Fig. 28. Log de Sobrevivencia de los organismos desafiados con <i>V. parahaemolyticus</i> que recibieron las distintas dietas en el periodo de alimentación. Valores entre paréntesis indican sobrevivencia (%) \pm DE, letras distintas representan diferencias significativas estimadas por Holm Sidak ($\alpha < 0.001$).	84
Fig. 29. Células granulosa (A), células semigranulosas (B), células hialinas (C) y cuenta total de hemocitos (D) de camarón blanco <i>Penaeus vannamei</i> que fueron inmersos durante un bioensayo de 12 días de alimentación con dietas conteniendo <i>E. arborea</i> en 20 y 40 g Kg ⁻¹ ; y su extracto rico en polisacáridos a 1 y 2 g Kg ⁻¹	109
Fig. 30. Fenoloxidasa libre (FOL)(A), fenoloxidasa total (FOL) (B) de camarón blanco <i>Penaeus vannamei</i> que fueron alimentados durante un bioensayo de 12 días de alimentación con dietas conteniendo <i>E. arborea</i> en 20 y 40 g Kg ⁻¹ ; y su extracto rico en polisacáridos a 1 y 2 g Kg ⁻¹	110

Fig. 31. Estallido respiratorio en camarones blancos *Penaeus vannamei* que han sido alimentados con dietas que contenían *Ecklonia arborea* a 0 (control), 2%, 4% y su extracto a 1 g Kg⁻¹ y 2 g Kg⁻¹ después de 1, 3, 6, 9 y 12 días. Cada barra representa el valor promedio de 15 camarones con la desviación estándar. Los datos al mismo tiempo de exposición con letras diferentes indican diferencias significativamente ($p < 0.05$) entre los tratamientos solo a ese tiempo de muestreo.111

LISTA DE SIGNOS Y ABREVIATURAS

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AHPND	Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (Enfermedad de Necrosis Hepatopancreática Aguda)
ARN	Ácido Ribonucleico
CAIM	Collection of Aquacultural Important Microorganisms (Colección de Microorganismos Importantes en Acuicultura)
CDH	Cuenta Diferencial de Hemocitos
cDNA	Ácido Desoxirribonucleico complementario
CIAD	Centro de Investigación de Alimentos y Desarrollo AC
CTH	Conteo Total de Hemocitos
DE	Desviación Estándar
DO	Densidad Óptica
ExE	Extracto de <i>Ecklonia arborea</i>
ExS	Extracto de <i>Selvetia compressa</i>
Hc	Hemocianina
Hg	Hemocitos granulados
Hh	Hemocitos hialinos
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Cromatografía Líquida de Alta Eficacia)
Hsg	Hemocitos semigranulosos
L-DOPA	L-Dihidroxifenilalanina
NBT	Nitroblue Tetrazolium (Nitroazul Tetrazolium)
PM	Programa Maricultura
PO	Phenoloxidase (Fenoloxidasas)
PPA	Prophenoloxidase Activating Protein (Proteína Activadora de la Profenoloxidasas)
ProFO	Profenoloxidasas
RPM	Revoluciones Por Minuto
RTqPCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa Cuantificativa con Transcriptasa Inversa
SOD	Superóxido Dismutasa
TCBS	Agar Tiosulfato Citrato Bilis Sacarosa

TSA	Agar Soya Trypticasa
TSB	Caldo Soya Trypticasa
TSV	Taura Syndrome Virus (Virus Síndrome del Taura)
UFC	Unidades Formadoras de Colonia
UMDI	Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación
v/v	Volumen-Volumen
Vp	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
w/w	Weight – Weight (peso – peso)
WSSV	White Spot Syndrome Virus (Virus Síndrome de Mancha Blanca)
YHV	Yellow Head Virus (Virus de la Cabeza Amarilla)

RESUMEN

En la actualidad se sabe que las macroalgas tienen efectos positivos en parámetros de crecimiento y respuesta inmune en diversas especies de camarones y peces, mejorando la sobrevivencia después de ser sometidos a infecciones bacterianas o virales. Para el caso del camarón blanco *P. vannamei*, no existe suficiente información de los genes que se activan al administrar sustancias inmunoestimulantes provenientes de macroalgas. El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de varias algas mexicanas cafés realizando un screening y seleccionando a *E. arborea* y *S. compressa* para una evaluación sobre el mejoramiento del estado de salud y tolerancia a enfermedades del camarón blanco del Pacífico (*Penaeus vannamei*) en comparación a los camarones que no se les han sido administrados ningún inmunoestimulante. En la primera etapa se realizaron diversos análisis de caracterización química y actividad inmunoestimulante *in vitro* (estallido respiratorio) de las harinas de macroalgas y sus extractos, así como la elaboración de alimentos terminados. En una segunda fase se llevaron a cabo experimentos *in vivo* donde las especies de macroalgas y extractos seleccionados fueron evaluados en bioensayos de respuesta inmune en camarón mediante inmersión y por alimentación utilizando métodos de química analítica, los parámetros a analizar fueron concentración de enzimas relacionadas al estrés oxidativo, concentración de proteína en hemolinfa y enzimas del sistema fenoloxidasas; así como el análisis genético en la expresión de genes que codifican enzimas relacionadas con la respuesta inmune. Por último, se llevó a cabo un desafío contra el patógeno bacteriano *Vibrio parahaemolyticus* en poslarvas de *Penaeus vannamei* demostrando que el consumo a corto plazo (12 días) de alimentos peletizados con inclusión del mejor tratamiento (extracto rico en polisacáridos de *E. arborea* a 1 y 2 g Kg⁻¹) aumenta la sobrevivencia en comparación con los tratamientos control y con una notable recuperación a las 120h posteriores a la infección.

ABSTRACT

It is currently known that macroalgae have positive effects on growth parameters and immune response in various species of shrimp and fish, improving survival after being subjected to bacterial or viral infections. In the case of the white shrimp *P. vannamei*, there is not enough information on the genes that are activated when immunostimulant

substances from macroalgae are administered. The objective of the present study was to evaluate the effect of several Mexican brown algae by screening and selecting *E. arborea* and *S. compressa* for an evaluation on the improvement of the health status and disease tolerance of Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*) compared to shrimp that have not been administered any immunostimulant. In the first stage, several analyses of chemical characterization and *in vitro* immunostimulant activity (respiratory burst) of the macroalgae meals and their extracts were carried out, as well as the elaboration of finished foods. In a second phase, *in vivo* experiments were carried out where the macroalgae species and selected extracts were evaluated in bioassays of immune response in shrimp by immersion and by feeding using analytical chemistry methods. The parameters to be analyzed were concentration of enzymes related to oxidative stress, protein concentration in hemolymph and enzymes of the phenoloxidase system; as well as genetic analysis in the expression of genes that encode enzymes related to the immune response. Finally, a challenge against the bacterial pathogen *Vibrio parahaemolyticus* was carried out on *Penaeus vannamei* postlarvae showing that short-term consumption (12 days) of pelleted food with inclusion of the best treatment (polysaccharide-rich extract of *E. arborea* at 1 and 2 g Kg⁻¹) increases survival compared to control treatments and with a remarkable recovery at 120h post-infection.

1. Introducción

El cultivo del camarón o camaronicultura se ha se ha expandido en la última década, produciéndose aproximadamente 1 millón 300 mil toneladas anuales en todo el mundo, en 2021 el nivel de producción mundial fue un 8,9 % más alto que en 2020, y se pronosticó un crecimiento de más del 5 % para el 2022 (Chase 2022; Fletcher 2021). El sector acuícola ha tomado un papel importante en la industria mexicana logrando posicionarse como el séptimo productor de camarón a nivel mundial. En México, el estado de Sinaloa es el principal productor de camarón de cultivo con una participación del 40.3% en el mercado nacional, seguido de Sonora con el 39.7% (Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural 2020).

Sin embargo, este crecimiento ha traído consigo retos importantes ya que el incremento en la producción de granjas camaroneras con sistemas de siembra intensivo y semi-intensivo ha provocado que el riesgo de introducción y transmisión de enfermedades también se incremente, esto debido a la alta disponibilidad de nutrientes y óptimos factores de crecimiento para los microorganismos nocivos. En consecuencia, el cultivo de camarón blanco ha sido gravemente afectado en los últimos años por enfermedades tanto de origen viral, bacteriano y parasitario, causando cosechas prematuras y fuertes pérdidas económicas para este sector. Históricamente, en el año 2016 la producción mundial del cultivo de camarón se mantuvo estancada a niveles incluso más bajos que los obtenidos en 2015, debido a la aparición de la enfermedad de la Necrosis Hepatopancreática Aguda (AHPND, por sus siglas en inglés) (F.A.O 2017).

Actualmente, el uso de terapias con antibióticos para el control de enfermedades infecciosas en acuicultura se encuentra restringido, ya que su uso desmedido ha propiciado graves alteraciones en el ecosistema y un aumento en la resistencia bacteriana. Además, de acuerdo con los requerimientos de la agenda de la ONU 2030 es necesario implementar una producción sostenible y responsable para cumplir con la demanda de la producción de los alimentos acuáticos, además de abastecer de un alimento sano a la población (FAO, 2022). La búsqueda de tratamientos que ayuden a aumentar la sobrevivencia y la resistencia a enfermedades de los organismos de cultivo es un tema prioritario en la acuicultura, el uso de productos inmunoestimulantes representa una

alternativa potencial de tratamiento profiláctico, ya que estos alertan al sistema inmune de los organismos incrementando la respuesta a infecciones, haciendo a los organismos más resistentes a enfermedades.

Los camarones no poseen un sistema inmune específico ni capacidad de generar células de memoria; no obstante, poseen una respuesta inmune rápida y eficiente en donde se distinguen efectores celulares y humorales que actúan en conjunto para eliminar agentes extraños, la respuesta comienza con el reconocimiento de componentes de la pared celular microbiana por las proteínas patrón de reconocimiento (PPR) presentes en la hemolinfa, que posteriormente desencadenan la liberación de péptidos antimicrobianos activando la cascada de la profenoloxidasa llevando la reacción hasta la cicatrización de heridas, melanización y fagocitosis microbiana. Por otra parte, se ha demostrado que existen compuestos de origen fitoquímico y biológico que son capaces de incrementar la eficiencia del sistema inmune (inmunoestimulación), estas sustancias aumentan la resistencia frente a enfermedades infecciosas debido a que provocan una mejora en los mecanismos de defensa no específicos; además de aumentar significativamente la sobrevivencia de los organismos durante su cultivo (Kulkarni et al. 2021).

Recientes estudios en *P. vannamei* y otras especies de camarón de importancia comercial han demostrado que las algas marinas contienen compuestos bioactivos que mejoran la respuesta inmune, entre estos compuestos destacan los polisacáridos sulfatados presentes en las algas pardas como: el fucoidán y el alginato. Las algas marinas han sido evaluadas en forma de harina o bien aislando sus compuestos activos, estos han sido adicionados individualmente como ingrediente funcional en fórmulas de alimento balanceado o bien administrados directamente vía contacto (inmersión), además se ha reportado que estos productos son capaces de aumentar el crecimiento, la respuesta inmune y la resistencia a enfermedades infecciosas (Lee, Lee, et al. 2020; Pan and Yan 2020).

Las algas marinas en México son consideradas como un recurso natural económico que se encuentra disponible y en abundancia, además poseen un alto potencial para ser utilizadas como inmunoestimulantes en los cultivos de camarón, su uso como tal podría aumentar la resistencia a enfermedades causadas por patógenos y aumentar los niveles de producción de forma significativa. Sin embargo, actualmente no se han reportado estudios

previos que documenten el uso de las macroalgas pardas mexicanas de las especies *E. arborea* y *S. compressa*, ni de sus efectos sobre la respuesta inmune del camarón blanco (Abdel-Rahim et al. 2021; T.-G. Huynh et al. 2011; Immanuel et al. 2012), por lo que es importante generar información que sirva de base para el desarrollo de estrategias efectivas que ayuden en la producción sostenible de especies acuáticas.

Por lo cual, en el presente proyecto se realizó un estudio donde se evaluó la capacidad inmunoestimulante *in vitro* de 5 especies de macroalgas mexicanas y sus extractos ricos en polisacáridos sulfatados; posteriormente, las macroalgas y los extractos que presentaron los mejores resultados *in vitro* fueron seleccionados para ser evaluados *in vivo*; adicionados en alimentos balanceados y administrados en organismos *P. vannamei*, a fin de evaluar los efectos en la respuesta inmune a nivel celular y humoral, así como también se analizó la expresión de los genes relacionados con la respuesta inmune utilizando el mejor tratamiento, finalmente se evaluó la sobrevivencia de los organismos previamente alimentados con las dietas experimentales que presentaron mejor respuesta inmune frente a una infección con *Vibrio parahaemolyticus*.

2. Antecedentes

2.1 Importancia del cultivo de P. vannamei

El camarón blanco *Penaeus vannamei* (Boone, 1931) es un crustáceo decápodo de la familia de los peneidos nativo de la costa oriental del Océano Pacífico desde Sonora, al norte de México hacia centro y Sudamérica hasta Tumbes en Perú, en donde el agua se encuentra a temperaturas superiores a 20°C en todo el año.

El cultivo del camarón se inició a gran escala en diversos países del mundo en los años ochenta, a partir de entonces la producción ha ido creciendo hasta convertirse en la industria que es en la actualidad. Los principales mercados del camarón lo constituyen los Estados Unidos de Norteamérica y la Unión Europea (477 000 toneladas y 183 000 toneladas, respectivamente) (FAO, 2018).

La producción de camarón en México ha aumentado en los últimos años, siendo el 7° productor de camarón a nivel mundial, con una producción de 237 mil 647 toneladas. El principal estado productor de camarón en nuestro país es Sinaloa con más de 96 mil

toneladas, le sigue Sonora con 75 mil toneladas y Nayarit con 17 mil toneladas. En los últimos cinco años el volumen de captura y cosecha de este crustáceo ha tenido una propensión al alza; en 2019 continuó con esta tendencia, aumentando 3.2% respecto a años anteriores (Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural 2020).

La acuicultura ha fomentado la creación de empleos, ya sea directos o indirectamente, de acuerdo al Anuario Estadístico de Pesca (SAGARPA, 2003) la población registrada en la captura y acuicultura cuenta con 271 431 personas, de las cuales 222 744 personas se dedican a la captura y pesquerías acuiculturales y 48 687 personas a sistemas controlados (cifras estimadas por el método del porcentaje medio) (Montero-Rodríguez 2022). La industria de la pesca en el país genera más de 300 mil empleos directos y alrededor de 2 millones de indirectos, y es un aporte importante para la economía de México (Pesca con Ciencia 2019).

A pesar del incremento global en la producción de camarón en la última década se ha presentado una constante problemática causada por patologías dentro de las que destaca la infección con el virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV, por sus siglas en inglés) generando grandes pérdidas económicas para los camaronicultores (Morales-Covarrubias et al. 2011; Villalobos 2012). En 2008, Brock reportó 20 enfermedades virales como patógenas para especies de camarón silvestre o de cultivo y actualmente la Oficina Internacional de Epizootias (OIE), considera a la enfermedad del Síndrome de Taura (TS), la enfermedad de la mancha blanca (WSS), la enfermedad de la cabeza amarilla (YH), la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa (IHHN), la mionecrosis infecciosa (IMN) y la hepatopancreatitis necrotizante (NHP), como enfermedades de declaración obligatoria.

Además de la prevención de enfermedades, la nutrición adecuada es un factor crítico que afecta a la acuicultura. La producción acuícola exitosa depende de una dieta nutricionalmente balanceada y bajos costos de producción. La mayoría de los aditivos para alimentos no son nutritivos e incluyen antioxidantes, inmunoestimulantes y antibióticos, que se agregan al sistema de cultivo para mejorar el crecimiento y la calidad del agua. Desafortunadamente, estos componentes en los alimentos acuícolas también aumentan el costo de producción (El-Saadony et al. 2022).

Se busca incluir en la dieta de los animales acuáticos de importancia económica diversos componentes que mejoren además del crecimiento, la respuesta inmune y una resistencia mayor a enfermedades que les puedan llegar a afectar. Se han utilizado las macroalgas marinas y componentes de éstas en distintas investigaciones adicionadas a la dieta ya que contienen diversos compuestos como polisacáridos sulfatados, vitaminas, compuestos fenólicos, carotenoides y ácidos grasos y minerales en relaciones importantes.

2.2 *El sistema inmune en el camarón blanco*

Todos los crustáceos, incluyendo al camarón tienen como primer línea de defensa entre el medio ambiente y el interior del organismo a la cutícula, pero necesitan de la remoción y reemplazo periódico de su exoesqueleto rígido para seguir creciendo; éste proceso es una fuente intrínseca de variaciones etiológicas, fisiológicas e inmunitarias, dichas variaciones sumadas a la pérdida de cutícula son algunos factores que probablemente influyen en la resistencia y/o susceptibilidad de los crustáceos a los patógenos (Gómez-Gil, Roque, and Guerra-Flores 2001).

El sistema inmune interno de los camarones peneidos no se encuentra desarrollado de la misma manera que los organismos vertebrados superiores ya que carecen de la presencia de anticuerpos y de memoria inmunológica (Pascual et al. 2006), además de que cuentan con un sistema circulatorio abierto donde se encuentra la homocianina, la cual es responsable de transportar nutrientes, oxígeno, hormonas y componentes del sistema inmune. En la hemolinfa es posible identificar una fracción líquida denominada plasma que contiene la presencia de diferentes factores humorales y de las células circundantes llamadas hemocitos, mismos que son producidos en el tejido hematopoyético (Cerenius, Lee, and Söderhäll 2008; Söderhäll 2016) y éstas células que, de acuerdo con la presencia o ausencia de gránulos en su interior se clasifican en granulados, semigranulosos y hialinos (Chiu et al 2007); cuando partículas extrañas penetran esta cutícula y logran llegar hasta la cavidad corporal, se activa un rápido y eficiente proceso de defensa del animal. Los hemocitos presentan una capacidad citotóxica y de comunicación intercelular que les permite desarrollar diferentes funciones de coagulación, reconocimiento, fagocitosis, melanización, formación de nódulos y encapsulación (Aguirre-Guzman et al. 2009; S. Liu et al. 2020).

En diferentes investigaciones se han realizado conteos de hemocitos totales con valores que van de orden de miles (3.8×10^6) a millones (2×10^7) de células (conteo con hematocitómetro o en cámara) en camarones sanos y que además estos valores varían al alimentar con inmunoestimulantes o cuando los organismos son puestos en contacto con algún patógeno microbiano (Andrianti, Baihani, and Agency 2022; Ding et al. 2020; Song et al. 2003).

- A) Células hialinas: 80% de la hemolinfa, son pequeñas con un núcleo grande y tienen muy poco citoplasma, su función es la fagocitosis
- B) Células semi-granulosas: 13 a 10 % de la hemolinfa, son más grandes que las hialinas con presencia de algunos gránulos, sus núcleos son proporcionalmente más pequeños que los de las hialinas, sus funciones son encapsulación, fagocitosis (limitada), almacenamiento y liberación del sistema pro PO y citotoxicidad.
- C) Células granulares: 4 a 10% de la hemolinfa, son más grandes que las semi-granulares y por su contenido de gránulos son más refringentes bajo el microscopio, sus funciones son el almacenamiento y liberación del sistema proPO y citotoxicidad.

También el sistema inmune posee varios efectores humorales: a) componentes plasmáticos (péptidos antimicrobianos, histonas, enzimas lisosomales, lipopolisacáridos, proteínas de reconocimiento a glucanos); b) el sistema profenoloxidasa, y c) la cascada de coagulación que favorece la destrucción de los patógenos (Smith, Brown, and Hauton 2003). El uso de inmunoestimulantes en la producción de camarón es comúnmente utilizado para aumentar la resistencia a enfermedades causadas principalmente por agentes biológicos (Sung, Kou, and Song 1994).

El sistema fenoloxidasa (PO) al activarse, manifiesta una serie de reacciones en cascada, éste sistema se encuentra dentro de los gránulos de los hemocitos granulosos y semigranulosos y puede ser estimulado por sustancias como los peptidoglucanos, β -glucanos o lipopolisacáridos. Cuando es liberado el contenido granular, la enzima profenoloxidaza (proPO) es activada en fenol oxidasa (PO), siendo la enzima activadora una serinproteasa de tipo tripsina (Profenoloxidase Activating Protein PPA). Éste sistema se puede activar mediante el empleo de microorganismos y/o sus derivados (lipopolisacáridos, péptidoglicanos, laminarina, β glucanos etc.,) así como el uso de

extractos de plantas (Campa-Córdova et al. 2002), éstos productos pueden ser suministrados a los organismos a través del alimento o bien aplicados en forma directa (inyección, inmersión, bioencapsulación, o intubación), lo cual confirma una estrategia que permite mejorar o incrementar la resistencia a enfermedades que afectan a los organismos (Ding et al. 2020; Li and Xiang 2013; Nur et al. 2020).

2.3 *Vibrio parahaemolyticus* y su importancia como infección en el camarón blanco

Las especies del género *Vibrio* son muy abundantes en ambientes marinos, de agua dulce y estuarinos, estos microorganismos se encuentran asociados a varios organismos superiores (crustáceos, zooplancton, moluscos, etc). *Vibrio parahaemolyticus* es una bacteria que se desarrolla preferentemente en el ambiente marino, corresponde a un bacilo gramnegativo, levemente curvo, aerobio facultativo, halofílico, oxidasa positivo, fermentador de glucosa, y ureasa variable que requiere de medios selectivos para su desarrollo, en concentraciones de NaCl de 1 a 2%, es un patógeno humano que esta mundialmente distribuido y causa enfermedades entéricas, ya que es frecuentemente aislada de una variedad de mariscos particularmente moluscos por lo que el consumo de mariscos crudos o poco cocidos contaminados con *V. parahaemolyticus* puede provocar el desarrollo de gastroenteritis aguda (Su and Liu 2007).

En lo que respecta a la presencia de bacterias de este género en el cultivo de camarón, históricamente *Vibrio parahaemolyticus*, *V. alginolyticus* y *V. vulnificus* han causado problemas en estanques de engorda, mientras que *V. harveyi* y *V. splendidus* se reconocen como dominantes en el cultivo larvario. Sin embargo, muchas de estas especies también han sido encontradas en la hemolinfa y el hepatopáncreas de juveniles sanos de *P. vannamei* (Gomez-Gil, Roque, and guerra 2001). Así mismo distintas cepas de *V. parahaemolyticus* se han encontrado como el agente causante de la enfermedad de necrosis hepatopáncreática aguda conocida como AHPND por sus siglas en inglés o síndrome de mortalidad temprano (EMS) causando una descamación severa de las células epiteliales del hepatopáncreas, nado errático, pérdida de la capacidad de consumo de alimento y daños en el túbulo intestinal (Anaya-Rosas et al. 2019; Han, Tang, and Lightner 2015; Nunan et al. 2014) y se ha demostrado que la mortalidad causada es dosis

dependiente teniendo un umbral de densidad infectiva de concentración mínima de 10^4 CFU mL⁻¹ (Soto-Rodriguez et al. 2015) .

Se ha observado que junto con la intensificación de la industria del cultivo de camarones penaeidos, las enfermedades infecciosas atribuidas principalmente a especies de *Vibrio*, se han convertido en un gran problema y han causado graves pérdidas económicas (Wang et al. 2015), por lo que se buscan alternativas para lograr una mayor defensa del organismo frente a estas infecciones ya sea alternativas como el uso de probióticos y prebióticos (Duan et al. 2020; Trejo-Flores et al. 2018), inmunoestimulantes (Lee, Quan Tran, et al. 2020; Sakthivel et al. 2015), antibióticos (enrofloxacina, oxitetraciclina y florfenicol) (Shefat 2018; Varela-Mejías and Alfaro-Mora 2018) y otros (tecnologías de cultivo y líneas genéticas) (Castillo-Juárez et al. 2015; Romo-Quiñonez et al. 2020).

2.4 Uso de inmunoestimulantes para la prevención de enfermedades

Los inmunoestimulantes son moléculas que estimulan eficazmente la maquinaria de defensa no específica del huésped para combatir contra los microorganismos invasores, éstos compuestos podrían considerarse una opción prospectiva para el manejo de la salud del camarón, éstos compuestos son un grupo diverso de productos químicos que pueden aumentar el sistema de defensa biológica de un animal contra varias bacterias o virus patógenos.

Las sustancias inmunoestimulantes pueden derivarse de fuentes naturales o pueden sintetizarse químicamente. A menudo, estos compuestos pueden funcionar específicamente como antígenos que pueden inducir la producción de algún anticuerpo específico (p. ej., vacunas), así como también pueden promover la respuesta inmunitaria de otros antígenos de forma no específica (Kumar et al. 2022).

El mecanismo de la respuesta inmunitaria inespecífica de compuestos naturales extraídos de fuentes vegetales como los polisacáridos se basa en el análisis de la respuesta de fagocitosis, síntesis de anticuerpos, sistema de complemento, producción de interferón y propiedades de síntesis de linfocitos, etc.; estos compuestos (polisacáridos) son inmunoestimulantes de gran importancia porque muchos de los antibióticos existentes ya no son efectivos debido a la creciente resistencia de los patógenos. (Bala, Singha, and Patra 2019).

Se han evidenciado resultados positivos en parámetros relacionados a respuesta inmune de camarón blanco cuando han sido expuestos al contacto con sustancias inmunoestimulantes, aumentando el recuento total de hemocitos, hemocitos hialinos, granulados y semigranulosas, actividad de superóxido dismutasa y estallido respiratorio, dentro de los compuestos evaluados recientemente se encuentran *Sargassum polycystum*, *Padina australis*, *Eucheuma cottonii*, *Gracillaria verrucosa*, *Padina tetrastromatica* y *Sargassum ilicifolium*, entre otras (AftabUddin et al. 2021; Kilawati et al. 2021).

Sin embargo, informes anteriores sugieren los efectos inmunosupresores del uso excesivo de inmunoestimulantes, aplicación (más allá de la dosis óptima) en animales acuáticos, lo que indica la necesidad de optimizar la dosis con la frecuencia de aplicación. La administración adecuada del inmunoestimulante disminuiría el riesgo de fatiga inmunológica que podría disminuir la resistencia de los camarones juveniles contra las infecciones (Ojerio et al. 2018).

2.5 Uso de algas como nutracéutico en especies acuáticas

Las algas o sus extractos han sido usadas como suplementos en alimentos de varias especies marinas comercialmente importantes como langostinos de agua dulce (Agarwal et al. 2021), tilapia del nilo (Van Doan et al. 2018), mero (Yuan et al. 2007), dorada (Queiroz et al 2014) y desde luego en camarón blanco (S.-Y. Cheng and Chen 2002; T. G. Huynh et al. 2011; C. H. Liu et al. 2004; Yudiati et al. 2016) ya que contienen una gran variedad de compuestos activos que les permiten defenderse de condiciones medioambientales extremas o de patógenos oportunistas (Chojnacka 2012; Gupta and Abu-Ghannam 2011). También se ha encontrado que la suplementación de dietas para camarón con harina de Kelp, tal como *Macrocystis pyrifera* o *Ascophyllum nodosum*, mejoran las propiedades físicas de los alimentos en términos de estabilidad, capacidad de absorción de agua y textura, resultando en un mayor consumo de alimento y una mejor ganancia en peso para los organismos (Aguirre-Guzmán, Ricque-Marie, and Cruz-Suárez 2002; L. E. Cruz-Suárez et al. 2008; L. Cruz-Suárez and Ricque-Marie 2000; Rivas-Vega et al. 2006).

La mayoría de los estudios realizados con algas han utilizado bajos niveles de inclusión (menos de 80 g Kg⁻¹) para determinar su posible utilización como suplemento funcional

(aglutinante), nutricional (aumento en rendimiento) y nutracéutico (inmunoestimulantes). El nivel óptimo de inclusión varía dependiendo del alga y especie de organismo, siendo que además a dosis bajas se encuentra el mejor efecto (Tabla 1) (Aguirre-Guzmán, Ricque-Marie, and Cruz-Suárez 2002; L. E. Cruz-Suárez et al. 2008; L. Cruz-Suárez and Ricque-Marie 2000; Rivas-Vega et al. 2006).

Se han evaluado tanto algas verdes (Selvin, Huxley, and Lipton 2004), rojas (Wongprasert, Rudtanatip, and Praiboon 2014) y cafés (Sirirustananun et al. 2011a) encontrando actividad inmunoestimulante en los tres tipos de algas . Diversos estudios se han realizado utilizando distintas especies de algas o compuestos de éstas sobre la evaluación en parámetros de la respuesta inmune en camarón de importancia comercial (Van Doan et al. 2019). Diversos autores han trabajado con *P. vannamei* utilizando algas o sus extractos incluidos en la dieta o por inmersión en el agua, estos estudios muestran incremento en la actividad enzimática como la fenoloxidasa, la superóxido dismutasa, la producción de anión superóxido, aumento en el estallido respiratorio e incremento en la cuenta de hemocitos, así como también presentar una mayor sobrevivencia cuando los organismos son retados a infección bacteriana y/o viral (Ver tabla 1).

Tabla 1. Algas y/o sus extractos con propiedades inmunoestimulantes evaluadas en especies acuícolas.

<i>Organismo</i>	<i>Alga</i>	<i>Dosis/tiempo</i>	<i>Resultados</i>
<i>Penaeus monodon</i> ¹	Extracto de <i>Gracilaria verrucosa</i>	Inmersión: extracto de <i>G. verrucosa</i> a 1.0, 1.5 y 2.0 ppt durante tres horas	Se encontraron diferencias significativas en THC, enzima proteasa y anión superóxido para los organismos que fueron inmersos con el extracto a 2 ppt siendo este el mejor tratamiento. La mortalidad se redujo en un 40-60% en los organismos tratados con 2 ppt

<i>Penaeus monodon</i> ²	Galactanos sulfatados aislados de <i>Gracilaria fisheri</i>	Camarones alimentados con Artemia salina sola y enriquecida con diferentes concentraciones de (100 y 200 µg mL ⁻¹) GS (100 y 200 mg/ml por 7 días)	Incremento significativo en la CTH, PO y SOD, siendo mayor a más alta concentración de GS, menor mortalidad en los camarones alimentados con Artemia enriquecida
<i>Penaeus monodon</i> ³	Harina del alga wakame <i>Undaria pinnatifida</i>	Dietas con 7 niveles de inclusión (0, 1, 2, 3, 4, 5 y 6%) por 56 días	SOD significativamente mayor en los organismos con 6% de inclusión de wakame en comparación con la dieta de 0%, sin diferencias significativas entre los otros niveles de inclusión
<i>Oreochromis niloticus</i> ⁴	Extracto de <i>Sargassum cristafolium</i>	Inyección con el extracto del alga 0.1-0.4 mg/Kg	Se incrementó la actividad fagocítica, la proteína en plasma total y la cuenta de leucocitos en las tilapias que fueron inyectadas con el extracto de <i>S. cristafolium</i> en comparación con los controles
<i>P. vannamei</i> ⁵	<i>Cystoceira trinodis</i>	Dietas con fucoidán de <i>C. trinodis</i> a 0, 0.1, 0.2 y 0.4%, los organismos fueron alimentados por 60 días	Los organismos alimentados con las dietas con fucoidán presentaron un aumento significativo en el peso final, la ganancia en peso, tasa específica de crecimiento y una menor tasa de conversión alimenticia, los organismos fueron desafiados con WSSV, observando que los

camarones tratados con fucoidán aumentaron la sobrevivencia de 43.33 a 75.00% después de 20 días de alimentación; el consumo del fucoidán incremento significativamente el CTH y CDH, la expresión de genes relacionados a respuesta inmune (proPO I, SOD, LEC, PAP, y LYZ) se vieron aumentados por el consumo de fucoidán después de 60 días.

<i>Penaeus vannamei</i> ⁶	Extracto de agua de <i>Ulva intestinalis</i>	Dietas recubiertas con el extrato del alga a 0, 1, 5 y 10 g Kg ⁻¹ durante 28 días	El tratamiento a 5 g Kg ⁻¹ mejoró los parámetros de crecimiento así como también incremento la respuesta inmune (actividad fagocítica y clearance bacteriano) al ser desafiado contra <i>Vibrio parahemolyticus</i> AHPND, así como regulación positiva de genes relacionados a respuesta inmune, además de que la suplementación a 1 y 5 a los organismos aumenta la sobrevivencia a YHV
<i>Fenneropenaeus merguensis</i> ⁷	Polisacáridos de <i>Enteromorpha</i> sp.	Dietas con 0, 1, 2 y 3 g Kg ⁻¹ por 42 días	La suplementación en la dieta de 1 g Kg ⁻¹ aumenta la capacidad antioxidante total, superóxido dismutasa (SOD), Glutación peroxidasa (GPx), Glutación-S-Transferasa, lisozima, fosfatasa alcalina y PO, además de regular

			positivamente genes relacionados a respuesta inmune como FmLyz, FmSOD5, FmCLAP en hepatopáncreas e intestino
<i>Penaeus vannamei</i> ⁸	Extracto de <i>Sargassum cristaefolium</i>	Dietas con 0, 250, 500, 750 y 1000 mg Kg ⁻¹ del extracto por 12 días	Los organismos alimentados con las dietas conteniendo 500 y 750 mg Kg ⁻¹ del extracto presentaron un aumento significativo en el CTH y CDH, además de la capacidad fagocítica, la sobrevivencia (83-93% en prueba de estrés y 24-27% en desafío) fue significativamente más alta que en los organismos alimentados con la dieta control (77 y 33% respectivamente)
<i>Penaeus vannamei</i> ⁹	<i>Sargassum</i> sp.	Inmersión en 0, 150, 250, 350 ppm por 3 horas	Incrementan el CTH y CDH. Aumenta la sobrevivencia de los camarones inmersos en 150 y 250 ppm teniendo una sobrevivencia de 100% mientras que los organismos inmersos en 350 ppm presentan un 50% al ser desafiados contra <i>Vibrio alginolyticus</i> .
<i>Penaeus monodon</i>	<i>Padina tetrastromarica</i> <i>Sargassum ilicifolium</i>	Dietas con 2.5 y 5 g Kg ⁻¹ de extracto de las algas	Se obtuvieron mejora en los parámetros de crecimiento en los organismos alimentados con <i>P. tetrastromatica</i> extraída con metanol y etanol. Los extractos metanólicos de ambas algas presentaron actividad antimicrobiana contra <i>Vibrio parahaemolyticus</i> (20.25 ±1.00 y

22.00±0.50mm). Posterior a infección con *V. parahaemolyticus* aumenta el THC de los organismos tratados con el extracto de *P. tetrastromatica* a g Kg⁻¹ (5.42 x 10⁵) pero sin presentar diferencias entre las dietas.

CTH: Conteo Total de Hemocitos, RB: Estallido Respiratorio, PO: Fenoloxidasa, SOD: Superóxido Dismutasa, GPx: Glutación Peroxidasa, GS: Galactanos Sulfatados, WSSV: Virus del Síndrome de la Mancha Blanca.

(Maftuch et al. 2013)¹, (Wongprasert, Rudtanatip, and Praiboon 2014)², (Niu et al. 2015)³, (Yudiati et al. 2016)⁴, (Salehpour et al. 2021)⁵, (Klongklaew et al. 2021)⁶, (W. C. Liu et al. 2020)⁷, (Sudaryono, Chilmawati, and Susilowati 2018)⁸, (Mulyadi et al. 2020)⁹, (AftabUddin et al. 2021)¹⁰

2.6 Expresión de genes de respuesta inmune en peneidos

El análisis de la expresión de genes de peneidos se ha estudiado en las últimas dos décadas con el fin de elucidar el modo de acción de moléculas intermediarias, genes y proteínas implicadas en la defensa y reacciones de la cascada de enzimas relacionadas a la respuesta inmune en distintas especies de camarón frente a enfermedades infecciosas utilizando diversos métodos (Robalino et al. 2009). Por ello existen investigaciones que revelan información importante de cambios a nivel de transcritos tanto en hemolinfa como hepatopáncreas en los camarones cuando han sido expuestos a una infección viral o bacteriana (Wilson W. et al., 2015; Nayak, S. et al., 2016; Deris, Z. M. et al 2020).

Sin embargo, existen pocos estudios de nutrigenómica que relacionen la expresión de genes con el consumo de un ingrediente funcional como los son las algas y/o sus extractos, en el 2016 Elizondo-Reyna y colaboradores, realizaron un análisis de expresión diferencial utilizando secuenciación masiva a nivel de transcriptoma en *P. vannamei* al ser alimentados con *Ulva clathrata* en donde encontraron un total de 396 transcritos expresados diferencialmente los cuales fueron clarificados en 4 grupos según su función: respuesta inmune (12 %), metabolismo de lípidos (34 %), procesos REDOX (34 %), y respuesta al estrés (20 %), demostrando que el consumo del alga realiza cambios a nivel

genómico, y además que los genes expresados al consumir el alga están involucrados en diferentes rutas metabólicas y de respuesta inmune, con lo que se puede esperar una relación entre el consumo de macroalgas y la generación de mensajeros en rutas de distintos procesos fisiológicos. Posteriormente, en varios de los estudios en los que se ha propuesto el uso de algas como estimulantes del sistema inmune, se han llevado a cabo análisis de cambios en la expresión relativa de diversos genes (tabla 2); es por ello que, en años recientes, se han publicado varios estudios en los que se ha determinado la expresión diferencial de genes ocasionados por el consumo de algas y/o sus extractos.

Tabla 2. Estudio de expresión de genes en organismos acuáticos con algas y/o sus extractos con propiedades inmunoestimulantes.

<i>Organismo</i>	<i>Alga</i>	<i>Dosis</i>	<i>Resultados</i>
<i>P. vannamei</i> ¹	<i>Sargassum wightii</i>	Dietas incorporadas con fucoidán de <i>Sargassum wightii</i> a 0.1, 0.2 y 0.3%, alimentando a los organismos por 60 días	La cuantificación relativa del gen de la profenoloxidasa de los grupos experimentales sobre el grupo de control se analizó mediante RT-PCR y osciló entre 2,13 y 7,95 veces de aumento dentro de 33,52–34,61 ciclos de umbral, respectivamente, a concentraciones de fucoidán de 0,1–0,3 %.
<i>Penaeus vannamei</i> ²	<i>Sargassum binderi</i>	Dietas incorporadas con fucoidán con 0 y 0.3% de fucoidán durante 15 días	El nivel transcripcional de los genes relacionados con la inmunidad se encontró más alto después de alimentar a los camarones infectados con fucoidan purificado y HMW. En particular, todas las formas de fucoidan aumentaron la

			transcripción del gen de la fenoloxidasa, lo que sugiere que el fucoidan tiene un papel importante en la producción de fenoloxidasa.
<i>Penaeus vannamei</i> ³	<i>Sargassum siliquosum</i>	Dietas conteniendo alginato aislado de <i>Sargassum siliquosum</i> (ácido, sodio y de calcio) a 1 y 2 g Kg ⁻¹ durante 15 días	La suplementación de alginato de sodio a 2 g Kg ⁻¹ aumentó significativamente la expresión de los transcritos de genes relacionados a respuesta inmune (Lectin, ProPO, LGBP, Toll, β-actin) Las transcripciones de los genes LGBP y Toll fueron las transcripciones de genes más altas con expresiones relativas de 4,99 y 5,58 veces para el alginato ácido y de sodio, respectivamente.
<i>Mugil cephalus</i> ⁴	<i>Ulva lactuca</i> o <i>Caulerpa prolifera</i>	Dietas conteniendo 10%, 20% y 30% de cada alga alimentados durante 8 semanas	Mejora la reparación del DNA del pez, inhibiendo las enfermedades del organismo. Al aumentar la expresión de los genes de crecimiento GH e IGF-1 siendo regulados positivamente por el consumo de las dietas con algas
<i>Penaeus vannamei</i> ⁵	<i>Sargassum horneri</i>	Dietas conteniendo extracto de <i>S. horneri</i> a 0, 2.5, 5 y 10 g Kg ⁻¹ ,	El análisis de expresión génica reveló que los organismos alimentados con dietas que contenían 0.5 % del extracto

		alimentando los organismos durante 4 semanas	durante 28 días mostraron una modulación significativa de 11 genes relacionados con respuesta inmune , incluidos profenoloxidasa I, profenoloxidasa II, peroxinectina, α 2macroglobulina, proteína de coagulación, lisozima, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, penaidina2 -4, y crustina..
<i>Penaeus vannamei</i> ⁶	<i>Sargassum</i> sp. <i>Padina</i> sp. <i>Turbinaria</i> sp.	Dietas recubiertas con fucoidán a 250 y 500 mg Kg ⁻¹ de cada alga, alimentando los organismos por 12 días	El fucoidán de <i>Sargassum</i> sp. exhibió una mayor actividad inmunomoduladora en los organismos que el fucoidán de <i>Padina</i> sp. <i>Turbinaria</i> sp. El análisis de CT mostró que la administración oral de fucoidan de <i>Sargassum</i> logró regular los genes de LGBP, Lectin, Toll, proPO Sin embargo, hubo una disminución considerable en la expresión del gen proPO en camarones tratados con 500 mg Kg ⁻¹ . El gen Toll se mostró como el gen que más se transcribió en este estudio, particularmente en camarones

			<p>alimentados con 500 mg Kg⁻¹. En general, los camarones que se alimentaron con 500 mg Kg⁻¹ de fucoidán de <i>Sargassum</i> sp, mostraron una expresión génica más alta que la de los camarones alimentados con 250 mg Kg⁻¹ de fucoidán d <i>Sargassum</i> sp.</p>
<i>Penaeus vannamei</i> ⁷	<i>Cystoseira trinodis</i>	<p>Dietas con inclusión de fucoidán de <i>C. trinodis</i> a 0, 0.1, 0.2, y 0.4% alimentando a los organismos por 60 días y 20 días de infección con WSSV</p>	<p>La expresión de genes relacionados con la inmunidad en los camarones alimentados con el fucoidán mejoraron considerablemente (p < 0.01) sobre el control antes del desafío (0 días) y después del desafío en los días 5, 10, 15 y 20. Después de 60 días de prueba de alimentación se produjo un aumento considerable (p < 0,05) en la expresión de los genes proPO I, SOD y LYZ en hemocitos de camarones alimentados con dietas enriquecidas con fucoidán de <i>C. trinodis</i> (0.2–0.4 %) en comparación con el grupo de control y los individuos alimentados con d 0.1% de fucoidán</p>

(Sivagnanavelmurugan et al. 2014)¹, (Sinurat et al. 2016)², (Yudiati et al. 2016)³, (Abu Zinadah et al. 2013)⁴, (Lee, Quan Tran, et al. 2020)⁵, (Setyawan et al. 2018)⁶, (Salehpour et al. 2021)⁷

Como se indicó anteriormente el progreso mundial de la cría del camarón se enfrenta a un aumento de las enfermedades infecciosas, es por ello que prevenir y controlar la propagación de patógenos se ha convertido en una prioridad para la industria camaronera, lo cual ha traído consigo un aumento en los estudios sobre el uso de inmunoestimulantes naturales como una terapia más saludable/segura que la administración de antibióticos y/o vacunas para controlar los patógenos acuícolas (Meenakshi, S. et al., 2019; Abdel-Rahim et al., 2021). Han sido diversas especies de algas tanto verdes como cafés y rojas o extractos de estas incluidas ya sea vía oral, por inmersión o por inyección las que se han utilizado para incrementar la respuesta inmune en diferentes especies de camarón y aunque los resultados son muy variados, siempre se observan respuestas positivas en diferentes parámetros (tabla 1 y 2). Sin embargo, hasta la fecha las especies de alga mexicanas *Ecklonia arborea* y *Silvetia compressa* no han sido evaluadas con la finalidad de determinar si el alga entera o algún extracto de estas pudiera ser utilizado como un inmunoestimulante y ayudar a los camarones a resistir alguna infección bacteriana, es por ello que el presente trabajo pretende generar la información necesaria para responder a esta interrogante.

3. Justificación:

El cultivo de camarón es una actividad muy importante a nivel mundial, de la cual México se encuentra en el puesto 7 a nivel mundial contando con alrededor de 900 granjas camaroneras, 45 criaderos y más de 40 plantas procesadoras, sin embargo la industria camaronícola mexicana se ha afectado por la emergencia y reemergencia de infecciones bacterianas y virales, las cuales ocasionan mortalidades y enormes pérdidas económicas debido a que los camarones no poseen mecanismos de respuesta inmune de memoria. El uso de antibióticos como medida preventiva no es adecuado debido a la capacidad de las bacterias de desarrollar resistencia y al impacto contaminante negativo que éstos provocan en los ecosistemas. Pero por otro lado, los camarones poseen mecanismos de defensa innatos con efectores celulares y humorales que les ayudan a enfrentar una infección, estos pueden ser incrementados con la administración de sustancias inmunoestimulantes (β -glucanos, mananos, lipopolisacáridos, microorganismos completos, laminarén, etc.), las cuales han demostrado su eficiencia no solo aumentando los parámetros celulares y humorales en los camarones sino aumentando la sobrevivencia ante desafíos bacterianos

y virales. En muchos estudios se ha demostrado que las macroalgas y/o sus extractos aumentan los parámetros de respuesta inmune tanto en peces como en crustáceos por lo que se les considera buenos inmunoestimulantes, no obstante, hasta el momento las algas *Ecklonia Arborea* y *Silvetia compressa* (presentes en México, pero que no son explotadas comercialmente), no han sido estudiadas con esta finalidad por lo que son buenos candidatos para su uso como inmunoestimulantes en alimentos para camarones, lo que podría contribuir no solo a incrementar su uso, sino también a incrementar la producción de camarón y el desarrollo de las zonas costeras.

4. Hipótesis

La administración vía oral o por inmersión de harina o extractos ricos en polisacáridos de las algas cafés seleccionadas (*E. arborea* y *S. compressa*), aumenta significativamente los parámetros de respuesta inmune tanto celular como humoral y provoca cambios significativos en la expresión de genes relacionados con el sistema inmune del camarón *Penaeus vannamei*, generando una mayor resistencia y una sobrevivencia estadísticamente más elevada ante la infección con *Vibrio parahaemolyticus* que los organismos que no son tratados con las algas.

5. Objetivo general:

Evaluar el efecto de las algas mexicanas cafés seleccionadas (*E. arborea* y *S. compressa*), sobre el incremento en los parámetros de respuesta inmune y la expresión diferencial de genes relacionados con la misma, así como su efecto en la tolerancia a la infección con *Vibrio parahaemolyticus* en el camarón blanco del Pacífico (*Penaeus vannamei*)

5.1 Objetivos específicos

- 5.1.1 Evaluar la capacidad inmunoestimulante *in vitro* (ER) de extractos acuosos rico en polisacáridos de algas cafés presentes en México (*E. arborea*, *S. compressa*, *Macrocystis pyrifera*, *Egregia menzeisii*, *Pterigophora californica*, *Cystoseira osmundaceae*) (2011) y seleccionar las dos mejores.
- 5.1.2 Elaborar y caracterizar dietas balanceadas con la inclusión de las algas seleccionadas (*E. arborea* y *S. compressa*) en polvo o con el extracto rico en polisacáridos de estas que cumplan con los requerimientos nutricionales para camarón blanco *P. vannamei*

- 5.1.3 Evaluar la capacidad inmunoestimulante *in vivo* mediante la inmersión de los camarones en agua marina adicionada con harina del alga (100, 300 y 500ppm) y extracto (50, 150 y 300ppm) de *E. arborea* y *S. compressa* a las 0, 1, 3 y 5 horas sobre la concentración de fenoloxidasa libre y total y conteo de hemocitos total y diferencial en hemolinfa.
- 5.1.4 Determinar la mejor dosis y tiempo de muestreo para incrementar la capacidad inmunoestimulante *in vivo* en la hemolinfa de *P. vannamei* mediante el consumo de dietas suplementadas con harina *E. arborea* o *S. compressa* (20 y 40 g/kg) a los 0, 3, 6, 9, 12 y 15 días de alimentación.
- 5.1.5 Identificar los cambios en la expresión genética relativa de genes relacionados en respuesta inmune (Profenoloxidasa [ProPO], Superóxido dismutasa [SOD] y Hemocianina [Hc] de los organismos alimentados con el tratamiento (EXE 2 g Kg⁻¹) y al tiempo (12 días) que mostraron una respuesta inmune más incrementada.
- 5.1.6 Comprobar una mejora en la resistencia del camarón (*Penaeus vannamei*) a la infección contra Vp AHPND+, mediante un desafío después del consumo durante 12 días de dietas adicionadas con EXE 1 o 2 g Kg⁻¹.

6. Diseño experimental:

Se trabajó en tres periodos, inmunoestimulación por inmersión, inmunoestimulación oral mediante la dieta y bioensayo de sobrevivencia de organismos inmunoestimulados en desafío contra *Vibrio parahaemolyticus*. En el bioensayo de inmunoestimulación por inmersión se utilizaron los siguientes tratamientos; *E. arborea* alga en polvo (100, 300 y 500 ppm) y el extracto rico en polisacáridos de *E. arborea* (50, 150 y 300 ppm); y, *S. compressa* del alga en polvo (100, 300 y 500 ppm) y del extracto rico en polisacáridos de *S. compressa* (50, 150 y 300 ppm), cada tratamiento se aplicó por triplicado a acuarios de 10 L conteniendo 10 juveniles de camarón blanco *P. vannamei* 500 ± 0.043 mg, se extrajo hemolinfa por triplicado a cada tiempo de muestreo (1, 3 y 5 h) para analizar parámetros de respuesta inmune (Conteo total y diferencial de hemocitos, proteína en hemolinfa y actividad de la fenoloxidasa) comparando entre tiempo y tratamiento mediante un ANOVA multifactorial (SPSS v.22); en el segundo periodo se trabajó en las instalaciones del PM de la FCB UANL y en las instalaciones de UMDI Sisal UNAM, se formularon 9

distintas dietas con inclusión de la harina del alga *E. arborea* y *S. compressa* así como sus extractos ricos en polisacáridos a concentraciones de 20 y 40 g Kg⁻¹ para la harina (ESM1, ESM2, PSM1, PSM2) y 20 y 40 g Kg⁻¹ para el extracto rico en polisacáridos (EXE1, EXE2, EXS1 y EXS2) y una dieta control sin inmunoestimulantes (CD), alimentando durante 15 días a juveniles de *P. vannamei* (5.1g±0.05) distribuidos en 27 tanques de 120 L (triplicado por dieta) con 20 camarones c/u alimentando a saciedad, se extrajeron muestras de hemolinfa a los días 0, 3, 6, 9 y 12 (100 µL en 200 µL de solución Alsever) y se determinaron parámetros de RI (CTH y CDH, FOL, FOT y ER), asimismo se llevó a cabo un segundo bioensayo bajo las mismas condiciones del anterior utilizando solo las dietas seleccionadas (EXE1 y EXE2) durante el mejor tiempo de administración (12 días), al finalizar se extrajeron muestras de hepatopáncreas (3 organismos por acuario) para analizar mediante RTqPCR la expresión de genes relacionados a respuesta inmune (Hemocianina, SOD, Fenoloxidasa y β-actina como normalizador). Y como tercera parte fueron probados los mejores tratamientos resultantes de los experimentos descritos en las secciones anteriores los cuales correspondieron a las dietas EXE1 y EXE2; con estos tratamientos fueron alimentados 150 organismos (0.250 ± 0.02 g peso promedio) en tanques de alimentación de 120 L con recambio de agua y aireación constante, dichos organismos fueron alimentados 4 veces al día con las dietas experimentales, así como un acuario con la dieta control sin inmunoestimulante y una dieta testigo proveída por el laboratorio de larvas Fitmar. Los organismos fueron alimentados con los distintos tratamientos durante un periodo de 12 días, y posteriormente fueron transferidos a acuarios de 10L (20 camarones/tanque, 6 repeticiones por tratamiento) para la prueba de desafío con *Vibrio parahaemolyticus*, 4 repeticiones infectadas (+) y 2 repeticiones no infectadas (-), cada acuario con flujo cerrado y aireación constante (33 ppm de salinidad, 29°C, NO₂=0,32, NO₃=0,45, NH₄=8,3), las observaciones de camarones muertos, moribundos y sobrevivientes fueron registradas por un periodo de 72 horas finalizando con un análisis de sobrevivencia Kruskal Wallis usando Sigma Plot 11.0

7. Material y métodos

7.1. Programa Maricultura (PM)

El Programa Maricultura cuenta con una sala para realizar bioensayos (Figura 1) la cual consta de un sistema de recirculación de agua marina sintética, 4 tanques de pre-engorda

de 500 L, cada uno con doble fondo y sistema de recirculación, dos tanques colectores que funcionan como tanques de sedimentación de 1500 L, los cuales se encuentran en la parte inferior del sistema, un tanque de succión que se encuentra entre los dos colectores, y recibe el agua de ellos; en la parte superior del sistema se encuentran dos tanques con un sistema de regulación de temperatura por contacto con ayuda de un serpentil y que suministra de agua al sistema por medio de gravedad, un filtro de perlas, filtro de luz UV, filtro de carbón activado, filtros de cartucho de 50 micras, y espumadores. Las unidades experimentales para los distintos bioensayos constan de acuarios de 60 y 120 L de fibra de vidrio (tasa de recirculación de 300% d-1), conectados al sistema de recirculación de agua marina sintética, y un sistema de recirculación interna. En todos los experimentos realizados en el laboratorio del Programa Maricultura se monitoreó la calidad del agua (Fluval Test Fluvalaquatics, Canadá) manteniendo los parámetros en los siguientes rangos: temperatura $29\pm 2^{\circ}\text{C}$, salinidad 35 ± 2 ppt, pH 8.0 ± 0.5 , $\text{N-NH}_3 < 0.1$ ppm, $\text{N-NO}_2 < 0.1$ ppm y $\text{NO}_3 < 20$ ppm. El fotoperiodo durante los experimentos en este laboratorio fue de 12:12 horas luz: oscuridad.

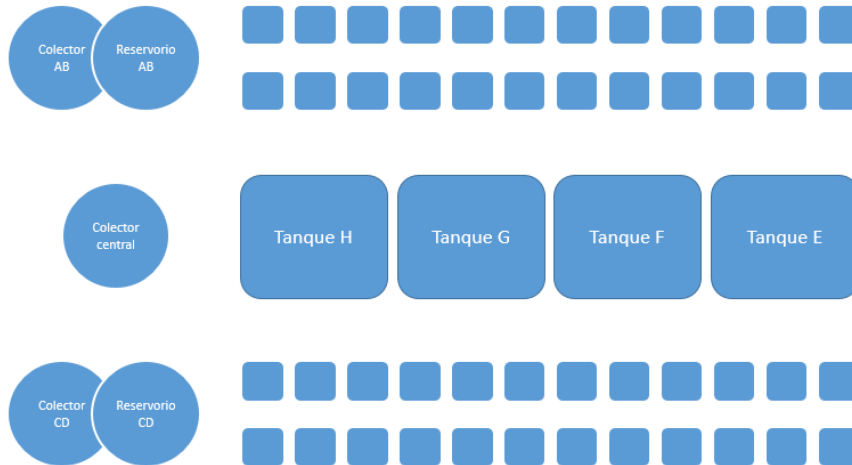




Fig. 1. Sala de bioensayos del Programa Maricultura (PM) UANL

7.2 Organismos experimentales

Los organismos experimentales que se utilizaron en los diferentes experimentos *in vitro* e *in vivo* corresponden a juveniles de la especie de camarón blanco *P. vannamei*, los cuales fueron proporcionados por la empresa Fitmar, S.A. de C. V., procedentes de Rosario, Sinaloa, con un peso aproximado de 6g. Para su envío se colocaron en bolsas grandes de plástico con saturación de oxígeno dentro de hieleras y se enviaron por avión hasta el aeropuerto de Monterrey, para posteriormente trasladarlos a la sala de bioensayos del programa Maricultura de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL. En estas instalaciones los organismos se aclimataron a las condiciones de temperatura, pH y salinidad, de los estanques de 500 L conectados a un sistema de recirculación. Una vez aclimatados, fueron monitoreados y alimentados durante los días previos al inicio del bioensayo.



Fig. 2. Recibo, mantenimiento y distribución de juveniles de *P. vannamei* en el Programa Maricultura.



Fig. 3. Organismos utilizados en el presente estudio correspondiente al camarón blanco del pacífico *Penaeus vannamei*

7.3 UMDI SISAL UANL

Se trabajó en el área de Engorda de camarón de la UMDI- Sisal, Facultad de Ciencias (Sisal, Yucatán, México) con organismos pertenecientes a la especie de *P. vannamei* cultivados previamente en estanques circulares cubiertos de geomembrana (capacidad de 20,000 L y 1 m de profundidad), los organismos utilizados fueron pesados (peso promedio 15 g) y trasladados a los acuarios experimentales del iglú de nutrición, una vez colocados en los acuarios experimentales para su aclimatación, fueron alimentados durante 7 días con el tratamiento control sin inmunoestimulantes para poder limpiar el tracto intestinal. Las variables medioambientales durante este periodo de cultivo se mantuvieron dentro de los rangos permisibles (DO = 5.20 mg L⁻¹; temperatura = 28.5°C; pH = 7.20; salinidad = 35 ppm).





Fig. 4. Recibo y manejo de los organismos utilizados en la unidad Sisal UNAM en Yucatán.

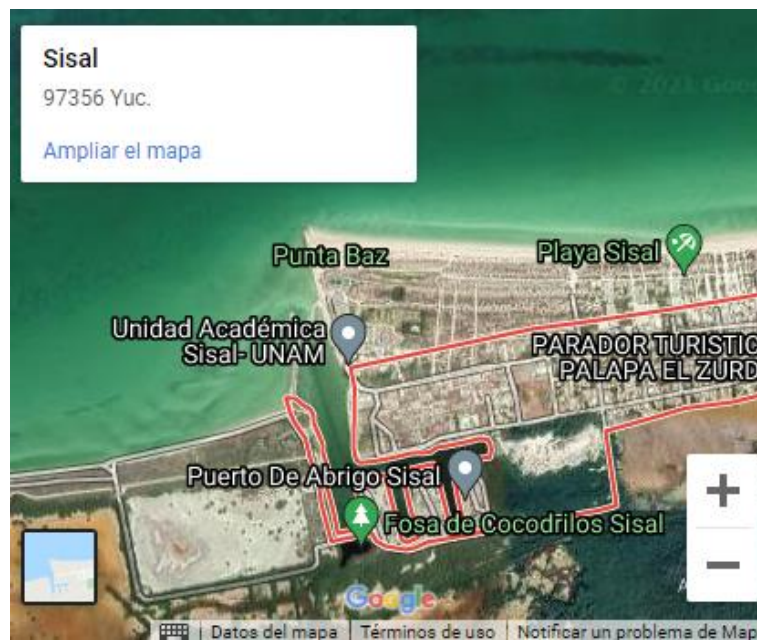


Fig. 5. Instalaciones Sisal UNAM, Yucatán México

7.4 Organismos experimentales (poslarvas) para desafío

Para la última fase del trabajo se utilizaron poslarvas de camarón blanco *P. vannamei*, los cuales fueron proporcionados por la empresa Fitmar, S.A. de C. V., procedentes de Rosario, Sinaloa, con un peso aproximado de 100 mg. Para su envío se colocaron en bolsas grandes de plástico con saturación de oxígeno dentro de hieleras y se enviaron por avión hasta el aeropuerto de Monterrey, para posteriormente trasladarlos a la sala de bioensayos del programa Maricultura de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL. Primeramente, los organismos fueron distribuidos y colocados en acuarios de 10 L con el agua con la que fueron enviados y poco a poco realizando recambio con el agua de la sala de bioensayos de Maricultura. Los acuarios se mantuvieron en baño maría para conservar la temperatura del agua en 29 °C, después de 15 días los organismos fueron distribuidos en acuarios de 60 L con recirculación y aireación constante, se mantuvieron en estas condiciones hasta el día de su distribución a los tanques de alimentación.

7.5 Algas utilizadas, procedencia y origen

Las algas fueron proporcionadas por la empresa Baja Kelp. La colecta fue realizada en la Escalera, Baja California Sur, México (31°30' 59.1" N-116°38' 51.1" W) entre los meses de diciembre del 2014 y enero del 2015, el método de cosecha se realizó a mano, utilizando sólo ejemplares adultos y usando podas selectivas para cada especie de alga.

El alga fue enjuagada con agua de mar para eliminar residuos de arena o conchas, posteriormente, se erradicó toda forma de epibiontes y fauna asociada al entorno natural de la planta. El secado se llevó a cabo al aire libre y se empacó en sacos de polipropileno.

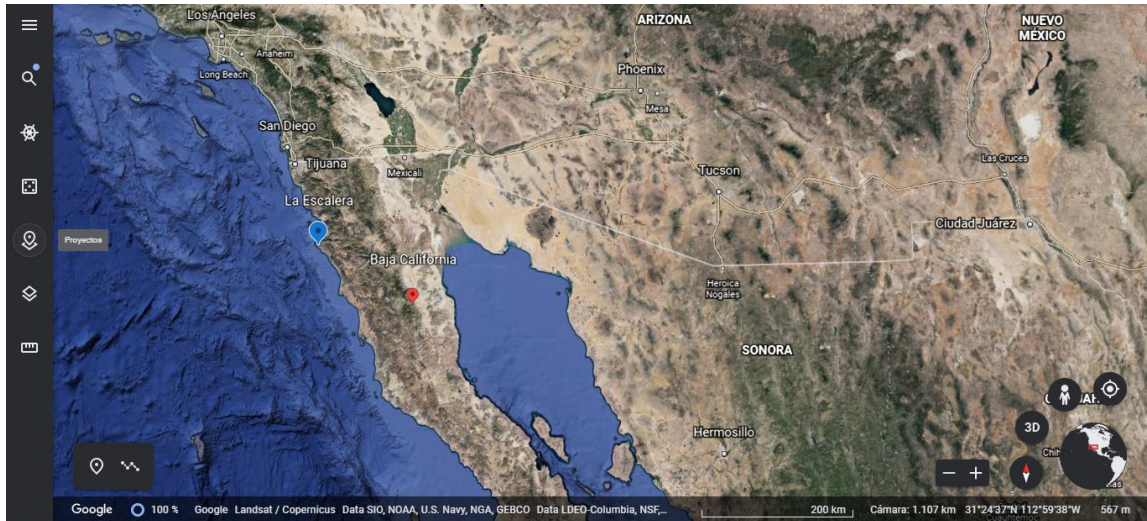


Fig. 6. Área de colecta de macroalgas pardas en La Escalera, Península de Baja California, México.

7.5.1 Procesamiento en el laboratorio

Las algas fueron cortadas en tamaños de entre 2-3 cm de largo, posteriormente fueron molidas en molino (Pulvex 2000, México) a un tamaño de partícula de $\approx 500 \mu\text{m}$. Fueron empacadas en bolsas de plástico al vacío y almacenadas a temperatura ambiente hasta su uso.

7.5.2 Identificación

Las características morfológicas y anatómicas del alga fueron observadas con en el estereoscopio (Leica-TS1232W26, México). Basado en las características morfométricas y el patrón de distribución ecológica, la identificación taxonómica de los especímenes fue realizada con la ayuda del Dr. Sergio M. Salcedo del Departamento de Biología Vegetal de la Facultad de Ciencias Biológicas, UANL usando como referencias claves taxonómicas escritas por Gabrielson (2006).

7.5.4 Elaboración del Extracto de las algas cafés

7.5.4.1 Pretratamiento

Para la elaboración del extracto, primero se realizó un pretratamiento con la finalidad de eliminar compuestos lipídicos del alga por medio del método delipidación Blich-Dyer de la siguiente manera: se colocaron los 10 g del alga en un vaso de precipitado a temperatura ambiente y se adicionó una mezcla de Metanol/Cloroformo/Agua (4/2/1) (v/v/v), se

procedió a macerar por 5 minutos en el homogeneizador de tejidos, se traspasó la mezcla a un embudo de separación y se dejó reposar hasta que se separaron las 3 capas (capa superior: metanol agua y polisacáridos solubles, capa media: agua proteína y polisacáridos no solubles y capa inferior: cloroformo y compuestos lipídicos). Se recuperó la capa superior (metanol, agua y polisacáridos solubles) y la capa intermedia (polisacáridos estructurales y proteínas).

7.5.4.2 Obtención del extracto acuoso

Para la obtención del extracto acuoso rico en polisacáridos, se utilizó la técnica propuesta por Ale y colaboradores en el 2012, y como se describe a continuación: por cada gramo (1g) de alga pre-tratada se adicionaron 20 mL de HCl (0.03M) y se colocaron en ebullición durante 1 hora. La suspensión del alga más el ácido se centrifugó a 3500 RPM por 15 minutos y se almacenó el sobrenadante (a). El residuo precipitado se lavó con 5 mL de agua MilliQ (por g de alga pretratada) y se centrifugó de nuevo a 1,600 g por 10 min., y el sobrenadante de esta etapa (b) se almacenó junto con el de la etapa anterior (sobrenadante a). La fracción líquida (Sobrenadante a+b), se precipitó con etanol acuoso 60% (v/v). Se centrifugó a 3500 RPM por 15 minutos para separar los polisacáridos, y se almacenó a -80°C. para finalmente liofilizarlo.

7.5.4.3 Caracterización de extracto

Rendimiento: Se pesó el extracto después de liofilizar y se calculó el rendimiento por diferencia del peso inicial del alga. Rendimiento (%) = (Peso extracto liofilizado / Peso inicial 100g) x 100

Azúcares totales por el método de Antrona: en una primera fase se dió un tratamiento a las muestras por hidrólisis ácida, se pesaron 50 mg de muestra (extracto acuoso del alga), se agregaron 100 mL de H₂SO₄ 1M grado HPLC y se colocó en ebullición por 3 horas. Posteriormente se preparó una curva de calibración de fucosa, para ello se preparó una solución stock de fucosa de 5 mg mL⁻¹. Se agregaron 0.5 g de fucosa en 100 mL de agua destilada y se realizaron estándares (0.05, 0.10, 0.15, 0.20 y 0.40 mg/ml). Se leyó la absorbancia a 630 nm y se realizó la gráfica de la curva de calibración. Para la determinación de los azúcares totales, se tomó 1 mL del extracto diluido y adicionaron 5 mL del reactivo de Antrona, se colocó en baño María por 12 minutos y se enfrió a

temperatura ambiente, para posteriormente leer la absorbancia a 630 nm y comparó con la curva de calibración.

7.5.4.4 Inmunoestimulación in vitro (Estallido respiratorio)

Se tomaron 5 organismos provenientes de la sala de bioensayos del programa maricultura (alimentados con una dieta control, mantenidos bajo condiciones óptimas y sin lesiones evidentes) de los cuales se obtuvo una muestra de hemolinfa. Para poder tomar las muestras de hemolinfa, se preparó una solución Alsever como anticoagulante y se preservó a 4° C, preparando jeringas de 1 mL con 200 µL de la solución anticoagulante. Se extrajo cuidadosamente la muestra de la región ventral del camarón entre el último par de pereiópodos y el primer par de pléopodos (seno ventral) un volumen de hemolinfa (~100 µL) en relación 2:1 a la cantidad de anticoagulante usada. Posteriormente se depositó la hemolinfa extraída de los 5 camarones en un microtubo siliconizado de 1.7 mL manteniéndolo en hielo, para ello se deslizó cuidadosamente la muestra de cada jeringa por la pared del tubo para no producir la lisis de los hemocitos y prevenir la activación y ruptura celular. Esta muestra (pool de 5 organismos) se utilizó para determinar parámetros hemáticos. Los parámetros medidos fueron medición del anión superóxido y medición de reducción de Nitro Blue Tetrazolium (NBT) en los hemocitos.

La medición de anión superóxido (O_2^-) en hemocitos (Estallido respiratorio) se realizó como se describe a continuación:

Preparación de la microplaca: Una suspensión de 5×10^5 hemocitos fue depositado por triplicado (para cada muestra) en una microplaca de 96 pocillos (en 100 µL de medio MHBSS, Sigma). Se incubó en condiciones de humedad, durante 30 minutos a temperatura ambiente (para la adherencia de los hemocitos). El sobrenadante se descarta y se adiciona 50 µL de medio MHBSS

La medición de la reducción de NBT se llevó a cabo como se describe a continuación: Se agregaron 50µL de laminarín (60mg/mL MHBSS) y 50µL de solución de NBT a 0.3% en medio MHBSS (stock 1mg/100µL se diluye en 3µL/10mL), se incubaron durante 2h, retirando el sobrenadante y los hemocitos se fijaron por adición de 200µL de metanol absoluto. Se lavó la placa dos veces con metanol al 70% y se secó al aire por 30min. Los depósitos de formazán se disolvieron en 120µL de KOH 2M y 140µL de DMSO. Después

de homogenizar el contenido en los pocillos se determinó la ABS a 620nm en el espectrofotómetro.

Finalmente, los datos fueron sometidos a un análisis de varianza de una vía y a una prueba de comparación múltiple de medias por el método de Tukey para comprobar si existen diferencias significativas entre los datos y entre cada extracto y por el método de Dunnett, el cual trata un grupo como un control (Laminarán, control positivo, polisacárido extraído de *Laminaria japonica*), y su comparación.

7.6 Dietas experimentales

Se formuló una dieta control (Dieta 1), la cual no contiene harina de krill, harina de alga o de levadura que son ingredientes con posible actividad inmunoestimulante. A partir de ésta se formularon 4 alimentos con la inclusión con 20 y 40 g Kg⁻¹ de harina del alga *E. arborea* seca y molida (Dietas 2 y 3); o con la inclusión 1 y 2 g Kg⁻¹ de extracto rico en polisacáridos de *E. arborea* (Dietas 4 y 5); y con 20 y 40 g Kg⁻¹ de harina del alga *S. compressa* seca y molida (Dietas 6 y 7); o con la inclusión de 1 y 2 g Kg⁻¹ de extracto rico en polisacáridos de *S. compressa* (Dietas 8 y 9). El nivel de inclusión de la harina de trigo fue cambiado considerando el nivel de inclusión de los ingredientes experimentales (Tabla 3).

Ingrediente	Control D1	<i>Eisenia 20</i> <i>g D2</i>	<i>Eisenia 40</i> <i>D3</i>	<i>ExE 1 g/kg</i> <i>D4</i>	<i>ExE 2 g/kg</i> <i>D5</i>	<i>SSilvetia 20</i> <i>g D6</i>	<i>SSilvetia 40</i> <i>g D7</i>	<i>ExS 1 g/kg</i> <i>D8</i>	<i>ExS 2g/kg</i> <i>D9</i>	<i>total</i>
Harina trigo	341.85	319.1	299.1	338.1	337.1	319.1	299.1	338.1	337.1	2928.65
Harina de Pescado	213.65	216.4	216.4	216.4	216.4	216.4	216.4	216.4	216.4	1944.85
Pasta de soya	210	210	210	210	210	210	210	210	210	1890
Gluten de trigo	40	40	40	40	40	40	40	40	40	360
CMC 50000	40	40	40	40	40	40	40	40	40	360
Gluten de maíz	31.5	31.5	31.5	31.5	31.5	31.5	31.5	31.5	31.5	283.5
Harina de Calamar	26	26	26	26	26	26	26	26	26	234
Soluble de pescado	22.3	22.3	22.3	22.3	22.3	22.3	22.3	22.3	22.3	200.7
Lectina de soya	27.5	27.5	27.5	27.5	27.5	27.5	27.5	27.5	27.5	247.5
Aceite de pescado	27.6	27.6	27.6	27.6	27.6	27.6	27.6	27.6	27.6	248.4
Carbonato de calcio	10	10	10	10	10	10	10	10	10	90
Ortofosfato	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	35.1
Mezcla Vitaminica	2	2	2	2	2	2	2	2	2	18
Premix minerales	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	13.5
Cloruro de colina	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9
Amonex aquadry	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9
Vitamina C	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	1.8
Harina Eisenia arborea	---	20	40	---	---	---	---	---	---	60

Extracto Eisenia	---	---	---	1	2	---	---	---	---	3
Harina <i>Silvetia compressa</i>	---	---	---	---	---	20	40	---	---	60
Extracto <i>Silvetia</i>	---	---	---	---	---	---	---	1	2	3

Tabla 3. Dietas experimentales formuladas con el programa Nutrion 5 para camarón blanco *Penaeus vannamei*

7.7 Bioensayo previo nutricional y parámetros a evaluar

Para determinar el efecto del consumo de las dietas adicionadas con el extracto rico en polisacáridos en contraste con el tratamiento control se llevó a cabo un bioensayo con duración de 15 días en las instalaciones de la sala de bioensayos del PM, en el cual se evaluaron dos tratamientos experimentales pertenecientes a los extractos de las algas que fueron seleccionadas como mejores extractos inmunoestimulantes (*E. arborea* y *S. compressa*). Se utilizaron las dietas con EXE2 y EXS2 (2 g Kg⁻¹ del extracto rico de polisacáridos) así como un tratamiento control sin aditivos (CD).

El experimento se llevó a cabo utilizando 3 acuarios replicados por tratamiento, conteniendo 15 camarones *P. vannamei* por acuario (0.35g±0.05) alimentados en raciones tres veces por día con el 5% de biomasa ajustando a cantidad de restos por acuario.

Los parámetros zootécnicos evaluados en el experimento fueron registrados a los al inicio y final del bioensayo.

Peso individual (W): los camarones fueron pesados individualmente en una balanza digital con precisión de un miligramo, después de haber sido ligeramente secados en una toalla húmeda.

Biomasa del acuario (BA): es la suma de los pesos individuales de los camarones presentes en un acuario. Esta variable refleja los efectos en conjunto del crecimiento y de la sobrevivencia.

Ganancia en peso individual (GP): es el incremento en peso con respecto al peso individual promedio inicial expresado en gramos. Esta variable se calcula para cada acuario a partir del peso promedio inicial y del peso promedio final. Ganancia en peso individual = peso individual promedio final - peso individual promedio inicial.

Tasa de sobrevivencia (%S): el número final de camarones en cada acuario en porcentaje del número inicial. Tasa de sobrevivencia = (Número final / Número inicial) x 100.

Tasa de crecimiento (TC): es el porcentaje de crecimiento por camarón con respecto al peso promedio inicial. TC= (ganancia en peso (g) / peso inicial promedio) x 100

Tasa de conversión alimenticia (TCA): se determinó para los animales que solo consumieron alimento artificial, es el alimento artificial (base húmeda) consumido por

unidad de peso ganado. TCA = consumo individual estimado en un acuario/ incremento en peso individual promedio en este mismo acuario.

Previo al inicio del bioensayo y durante el mismo la calidad del agua marina fue monitoreada, registrando temperatura, salinidad y niveles de agua. Para el bioensayo se utilizaron acuarios con capacidad de 10L colocados en baño maría, dentro de tanques de 60 L con sistema de recirculación interna de aire (air lift), los cuales estaban conectados al sistema de recirculación de agua salada recibiendo flujo continuo de entre 330-360 mL/min, con la finalidad de mantener constante la temperatura del agua (Fig. 7).



Fig. 7. Acuarios (10 L) y organismos experimentales utilizados para el bioensayo de inmunoestimulación por inmersión.

Se utilizaron acuarios de 10L cada uno con 10 organismos de 500 ± 0.043 mg manteniéndose aeración, salinidad, y temperatura constante; antes de iniciar el bioensayo, los camarones fueron colocados dentro de los acuarios y se aclimataron durante 12 horas. Se alimentaron los camarones por una hora (con alimento comercial) antes de adicionar las dosis de la harina de alga o del extracto, y se retiró los restos de alimento y heces el acuario, así mismo al tiempo 0 se tomó una muestra de 6 organismos para extraer hemolinfa que serían tomadas como el valor base.

Parámetro	Rango
Temperatura	28 – 31 °C
Salinidad	32 – 34 g/L

pH	7.8 – 8
N – NH₃	0.2 mg/L
N – NO₂	0.2 mg/L
N – NO₃	< 500 mg/L

Tabla 4. Parámetros de calidad del agua de los organismos mantenidos en el bioensayo.

7.7 Bioensayos de inmunoestimulación, parámetros a evaluar

7.1.1 Toma de muestra de hemolinfa

Para la toma de muestra de hemolinfa, se preparó solución anticoagulante Alsever (Schleder et al. 2017) y se enfrió previamente a 4° C, con esta solución se prepararon jeringas de capacidad de 1 mL que contenían 200 µL de la solución anticoagulante.

Se extrajo cuidadosamente la muestra de la región ventral del camarón entre el último par de pereiópodos y el primer par de pléopodos (seno ventral); posteriormente el volumen de hemolinfa (~100 µL) en relación a la cantidad de anticoagulante se depositó en viales Eppendorf siliconizados de 1.7 mL previamente etiquetados los cuales se colocaron en hielo para evitar degradación de la muestra, la cual fue colocada deslizando el contenido por la pared del tubo para no producir la lisis de los hemocitos y prevenir la activación y ruptura celular. La cantidad de hemolinfa extraída de cada organismo se registró, para posteriormente calcular el factor de dilución. Esta muestra se utilizó para determinar parámetros hemáticos.



Fig. 8. Muestreo y toma de hemolinfa de los organismos experimentales empleados.



Fig. 9. Lector de microplacas utilizado en el laboratorio de Química Central Sisal UNAM en Yucatán.

7.1.2 Determinación de parámetros de respuesta inmune en hemolinfa

Se tomaron 100 μ L de hemolinfa a 0, 1, 3 y 5 horas para el bioensayo de inmunoestimulación por inmersión y a 0, 1, 3, 6, 9, 12 y 15 días para el bioensayo de inmunoestimulación oral mediante la dieta, con las muestras se realizaron las siguientes determinaciones: conteo total de hemocitos (CTH) y determinación de la actividad fenoloxidasas siguiendo la metodología de Hernández-López, Gollas-Galván, & Vargas-Albores (1996) y Cheng (2005), respectivamente.

7.1.2.1 Actividad de la Fenoloxidasa

Para determinar la actividad de la fenoloxidasa total se empleó el método en microplaca (Gollas-Galván et al. 2003; Hernández-López, Gollas-Galván, and Vargas-Albores 1996) Se depositaron 5 mg de tripsina para después colocarse en un matraz volumétrico de 50 mL y aforar con agua destilada. La solución L-DOPA se elabora con 150 mg de L-3,4 dihidroxifenilalanina, colocados en un matraz volumétrico de 50 mL y aforado con agua destilada. Para la determinación se depositan 10 μ L de tripsina (1mg/mL) a cada pozo y fueron añadido 10 μ L de la muestra, incubando durante 10min. Transcurrido el tiempo de incubación, se adicionó 250 μ L L-DOPA (1 mg mL⁻¹) y se toma la lectura de la absorbancia exactamente después de 20 min a 490 nm en el lector de microplacas.

Para determinar la fenoloxidasa libre se añaden 250 μ L de L-DOPA (1 mg/mL) directamente a 10 μ L de muestra de hemolinfa y se determina la absorbancia después de 20min. Se procede de igual forma que para la fenoloxidasa total. La actividad pro-fenoloxidasa se calculó por la diferencia entre las actividades fenoloxidasa medidas con o sin tratamiento con tripsina. Todos los análisis se realizaron por duplicado.

7.1.2.2 Estallido respiratorio

Para determinar la actividad del estallido respiratorio en los hemocitos se utilizó el método en microplaca colorimétrico midiendo la reducción de Nitroazul tetrazolio (NBT) a formazán como una medida del anión superóxido siguiendo el método de Auclair y Voisin (1985), la metodología se encuentra indicada en la sección 6.2.7.4.

7.1.2.3 Conteo total y diferencial de hemocitos

Para la cuantificación del número de hemocitos, se siguió la metodología citada en Hernández-López, Gollas-Galván y Vargas-Albores (1996). De manera general, se adicionaron 100 μ L de hemolinfa colectada y diluida en solución Alsever 2:1. Se realizó una segunda dilución con 200 μ L el anticoagulante y 10 μ L de hemolinfa, mezclando cuidadosamente para colocar 10 μ L en la cámara de Neubauer (hematocitómetro). Reposando por unos segundos y se contabilizó la cantidad total de hemocitos presentes en los 4 cuadrantes exteriores en cada una de las muestras en un microscopio compuesto a 40X, colectadas por cuádruple.

La concentración de las células totales se calculó empleando la siguiente fórmula:

Células de hemocitos totales/mL= $(((C1+C2+C3+C4/4)*10,000))$ *factor de dilución1*factor de dilución 2].

Además, se diferenciaron y cuantificaron los diferentes tipos celulares en cada muestra: hemocitos hialinos, semi-granulosos y granulosos.

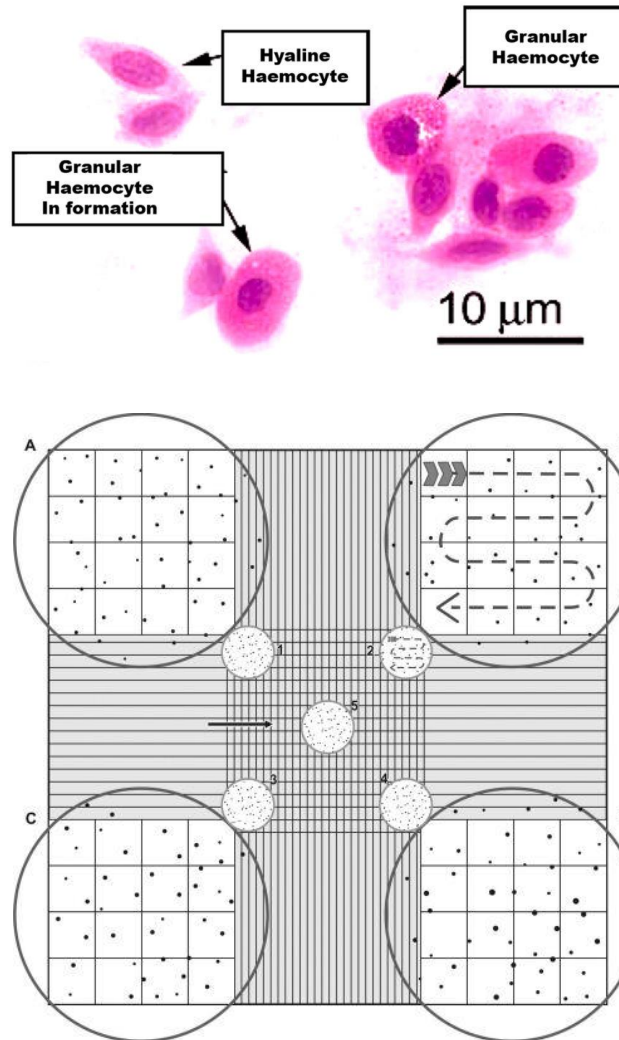


Fig. 10. A) Tipos de hemocitos presentes en la hemolina del camarón blanco *P. vannamei*. Recurso obtenido de (Ching 2019). B) Conteo en cámara de Neubauer

7.1.3 Análisis qPCR de los organismos inmunoestimulados

Se seleccionaron los mejores tratamientos y tiempos para inmunoestimulación basado en los resultados de conteo celular, actividad de la Fenoloxidasa y estallido respiratorio de la primera parte realizada en las instalaciones Sisal, UNAM, una vez conociendo dónde

existía una mayor actividad, fueron alimentados los organismos durante 12 días con las dietas 1 y 2 g Kg⁻¹ con extracto rico en polisacáridos de *E. arborea*.

7.1.3.1 Toma de muestra

Se colectaron muestras de hepatopáncreas que fueron preservadas y almacenadas a -80°C en una solución estabilizadora de ARN (RNAlater®, Sigma-Aldrich, R0901) para el posterior análisis de expresión de los genes hemocianina (Hc), super óxido dismutasa (SOD), profenoloxidasa (proFO) relacionados con la respuesta inmune de camarones.

Previo a muestrear los organismos para la extracción de hepatopáncreas, se revisó el estadio de muda para disminuir la variabilidad en los análisis, el cual fue identificado para observar si existía algún estrés por muda reciente y para eliminar camarones recién mudados de los análisis de parámetros en hemolinfa. Para ello se les cortó la región distal del urópodo y se colocó en tubos Eppendorf conteniendo solución salina, éstos fueron almacenados en refrigeración para su posterior análisis. Se identificaron los estadios de muda de cada organismo haciendo observaciones de los urópodos utilizando un estereoscopio de la marca Leica, determinando el estadio por la observación del exoesqueleto siguiendo el protocolo descrito por Robertson *et al.* (1987), existiendo las diferentes nomenclaturas: Exuviación (E), Post muda (A), Inter muda (B, C), Premuda temprana (D0), Premuda tardía (D2, D3). Solo los organismos que estén en intermedia fueron seleccionados para posteriores análisis.

7.1.3.2 Aislamiento de RNA y obtención de RNA complementario

Se utilizaron 100 mg de hepatopáncreas conservado en RNAlater para la extracción de ARN (ANEXO 2), el cual fue cuantificado a 260 y 280 nm utilizando un espectrofotómetro NanoDrop (ThermoScientific, Wilmington, DE, EUA) y posteriormente tratado con DNasa I libre de RNasa® (ThermoScientific, Wilmington, DE, EUA) para eliminar posible contaminación por ADN. El cDNA fue generado a un volumen de reacción de 10 µL compuesto por 4 µg de ARN, buffer RT 10X, dNTP Mix 25X (10 mM), Primers Random RT 10X y transcriptasa reversa (Enhanced Avian RT First Strand Synthesis Enhanced Avian RT First Strand Synthesis (Sigma-Aldrich®, Spruce St Louis, MO, EUA). La reacción fue hecha a 37°C durante 80 minutos.

Los primers utilizados fueron proporcionados por el laboratorio de análisis molecular de la Unidad Sisal UNAM. La reacción de qPCR fue realizada en un termociclador fluorométrico IQ5 (BIO-RAD®, Philadelphia, PA, EUA), utilizando SYBR Green Supermix (BIO-RAD®, Filadelfia, PA, EUA). La amplificación fue llevada a cabo en placas de 96 pozos con un volumen de reacción de 15 µL, el cual se conformó por 7.5 µL de IQ SYBR Green Super Mix (Bio-Rad, Hércules, California, EUA), 0.5 µL de cada juego de oligonucleótidos, 4.5 µL de agua libre de pirógenos y 2 µL de cDNA. El perfil térmico del qPCR se programó a 95°C por 3 minutos, seguido de 40 ciclosde 95°C por 30 segundos y 60°C por 30 segundos.



Fig. 11. NanoDrop y termociclador utilizados para análisis, Laboratorio Molecular Unidad Sisal UNAM, Yucatán

Para cada oligonucleótido se incluyó un control negativo, omitiendo la adición de cDNA.

Se obtienen los valores de ΔCt (Ct gen – Ct endógeno)(Livak y Schmittgen 2001):

$$R = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

$$\Delta Ct (\text{trat}) = Ct (\text{gen estudio 1 -tratamiento}) - Ct (\text{gen Referencia 2-tratamiento})$$

$$\Delta Ct (\text{ctrl}) = Ct (\text{gen estudio 1-control}) - Ct (\text{gen Referencia 2-control})$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{tratamiento}) - \Delta Ct (\text{control})$$

$$\text{Nivel de expresión del gen estudio normalizada} = 2^{(-\Delta\Delta Ct)}$$

7.1.4 Desafío bacteriano

Fueron probados los mejores tratamientos resultantes de los experimentos descritos en las secciones anteriores los cuales correspondieron a las dietas con 1 y 2 g Kg⁻¹ del extracto rico de polisacáridos de *E. arborea*, con estos tratamientos fueron alimentados 150 organismos en tanques de alimentación de 120 L con recambio de agua y aireación constante (0.250 ± 0.02 g peso promedio), los organismos fueron alimentados 4 veces al día con las dietas experimentales, así como un acuario con la dieta control sin inmunoestimulante y una dieta testigo proveída por el laboratorio de larvas Fitmar. El periodo de alimentación con las dietas experimentales fue de 12 días, ya que fue el tiempo donde mostraron un aumento en los parámetros de respuesta inmune evaluados en los experimentos anteriores (inmunoestimulación oral); los organismos fueron trasladados a la sala de desafíos a los 11 días de alimentación en tanques.

7.1.4.1 Cepa bacteriana

Las cepas de *Vibrio* evaluadas durante este proyecto de investigación fueron obtenidas de la Collection of Aquacultural Important Microorganisms (CAIM) a cargo del Dr. Bruno Gómez-Gil del CIAD unidad Mazatlán, Sinaloa (<https://www.ciad.mx/caim/CAIM>). Se evaluó la cepa de *V. parahaemolyticus* AHPND+ (M9-04) la cual fue aislada de estómago y hepatopáncreas de camarones de granjas afectadas con AHPND en el noroeste de México.

La activación de la cepa para este ensayo fue modificada, la cepa Vp. M09-04 (previamente criopreservada de forma individual) fue sembrada en agar TSA al 2.5 % de NaCl, dispersando el contenido líquido y la cuenta de vidrio por todo el agar, con el objetivo de lograr un crecimiento bacteriano uniforme por toda la caja. La placa se incubó a 30 °C durante 24 h. Una vez observado el crecimiento bacteriano en la caja con agar TSA se divide en 4 partes y con la ayuda de un asa bacteriológica estéril se tomó la biomasa de una (¼) y posteriormente fue transferida a un tubo con 3 ml de TSB al 2.5 % de NaCl, se incubó por 45 min con el fin de obtener un pre-inóculo, seguido se tomó 1 mL y se adicionó a un matraz con 150 ml de caldo TSB al 2.5 % de NaCl, que contenía perlas de vidrio (30) para ayudar al proceso de agitación, posteriormente se incubó a 29°C a 150 rpm (Unimax 1010, Heidolph), durante 9 h y 30 min (o dependiendo de la prueba),

asimismo se corroboró la absorbancia a una longitud de onda 610 nm en el espectrofotómetro (Beckman Du 650), y posteriormente se realizó la técnica de cuenta viable para conocer la concentración de bacterias para el inóculo utilizado y la muestra de los acuarios infectados.

7.1.4.2 Infección y registro de muertes

Fueron distribuidos los organismos de los tanques de alimentación a los acuarios de 10 L de la sala de desafíos después de 11 días y en el día 12 se aclimataron a las condiciones de la sala de desafíos donde siguieron alimentándose con las dietas experimentales; fueron colocados seis acuarios para cada tratamiento, teniendo 4 acuarios infectados y 2 acuarios no infectados, éstos fueron mantenidos con aireación constante, registrando también los parámetros fisicoquímicos del agua (33ppm salinidad, 29°C, NO₂=0.32, NO₃=0.45, NH₄=8.3).

Tabla 5. Tratamientos evaluados durante el bioensayo infeccioso

Tratamiento	Réplicas	Infección
T1 Control (0 g Kg ⁻¹)	4	+
T2 TEST	4	+
T3 (ExE 1 g Kg ⁻¹)	4	+
T4 (ExE 2 g Kg ⁻¹)	4	+
T1 Control (0 g Kg ⁻¹)	2	-
T2 TEST	2	-
T3 (ExE 1 g Kg ⁻¹)	2	-
T4 (ExE 2 g Kg ⁻¹)	2	-

En la etapa de infección (día 12), los organismos de los tratamientos positivos (infectados +) fueron infectados con 15 mL de un inóculo de 4 x 10⁹ UFC de Vp M9- 04 AHPND+ y los tratamientos negativos (no infectados -) con 15 mL de caldo TSB sin bacteria. Durante las horas post-infección (hpi) se registró tiempo y número de organismos muertos o moribundos, desarrollo de signos clínicos de la enfermedad, consumo de alimento, mudas, heces y parámetros de calidad de agua (NH₃, NO₂, y NO₃, pH y temperatura).



Fig. 12. Acuarios experimentales utilizados en el experimento de desafío bacteriano.

Para el análisis estadístico se comparó la sobrevivencia (% S) entre los tratamientos, donde los datos fueron sometidos a un Kaplan-Meier (Log), realizando comparación de medias entre tratamientos por Holm-Sidak y Kruskal Wallis utilizando el paquete estadístico Sigma Plot 11.0.

8. Resultados

8.1 Selección y caracterización de las algas y sus extractos

De las 6 algas seleccionadas (*E. arborea*, *S. compressa*, *Macrocystis pyrifera*, *Egrecia menzeisii*, *Pterigophora californica*, *Cystoseira osmundaceae*) se realizaron extractos ricos en polisacáridos y se analizaron para elegir a los dos mejores candidatos para ser evaluados como inmunoestimulantes administrados al camarón blanco *P. vannamei*.

De los extractos evaluados se encontró que el extracto de *P. californica* mostró el mejor rendimiento (12.092 %) seguido de *S. compressa* (11.29 %) mientras que el menor fue para el extracto de *E. menzeisii* con un valor de 4.75 %. El porcentaje de pureza de las muestras ricas en polisacáridos obtenidas resultaron en que *E. arborea* fue el alga con mayor grado de pureza con el 96% de pureza y *E. menzeisii* la de menor pureza (17.4%).

Muestra	Rendimiento (%)
<i>Silvetia</i>	11.299 ± 0.1189
<i>Cystiseira</i>	8.176 ± 0.1602
<i>Macrocystis</i>	7.475 ± 0.0454
<i>Egrecia</i>	4.7505 ± 0.0078
<i>Pterygophora</i>	12.092 ± 0.1888
<i>Eisenia</i>	7.3325 ± 0.0245

Tabla 6. Rendimiento del extracto en agua caliente (rico en polisacáridos) de cada alga analizada.

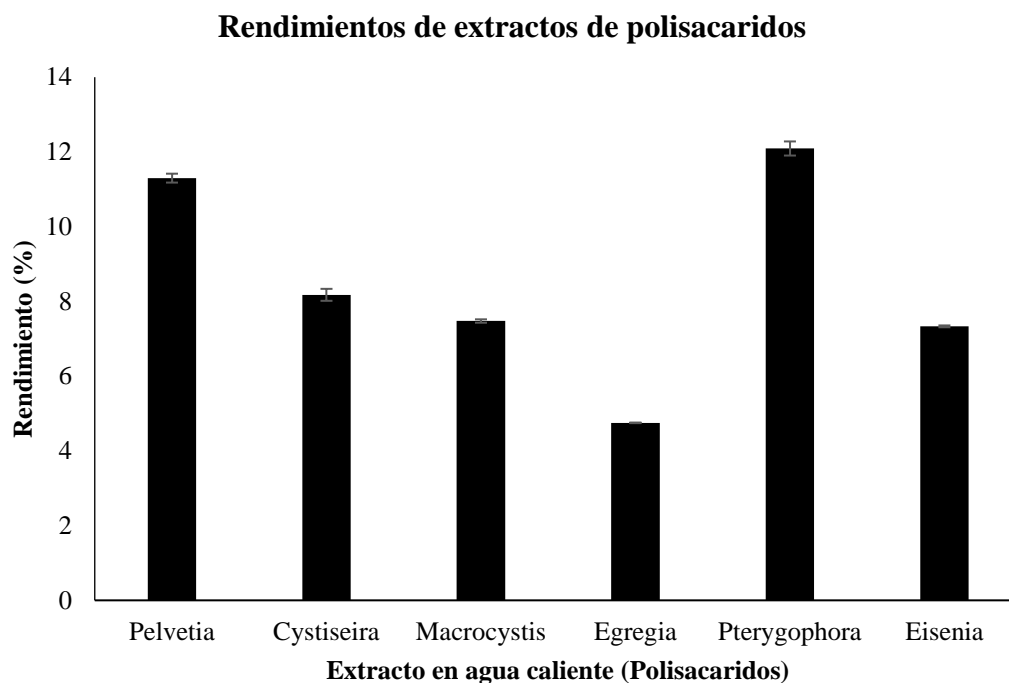


Fig. 13. Rendimiento en peso seco de los extractos en agua caliente de las diferentes macroalgas

Muestra	Peso de las muestras (mg)	mg de azucares	% Pureza
<i>Egregia</i>	50.36	8.77	17.4
<i>Cystoseira</i>	50.47	11.32	22.4
<i>Macrocystis</i>	50.81	32.74	64.4
<i>Silvetia</i>	50.67	11.32	22.3
<i>Eisenia</i>	50	48.30	96.6
<i>Pterygophora</i>	50.16	11.08	22.1

Tabla 7. Rendimiento del extracto en agua caliente (rico en polisacáridos) de cada alga analizada

Para la determinación de la capacidad inmunoestimulante de los extractos se evaluó la capacidad de estallido respiratorio en hemolinfa de camarón, en la cual el análisis de varianza demostró que existe diferencia significativa ($P=0.003$) en la capacidad

inmunoestimulante de los extractos de las algas, siendo en extracto de *E. arborea* el que presento el valor más elevado de DO a 620nm seguido del extracto de *S. compressa* (0.125 y 0.122 respectivamente), el extracto que presentó la menor capacidad fue el del alga *M. pyrifera* con un valor de 0.101 ± 0.012 .

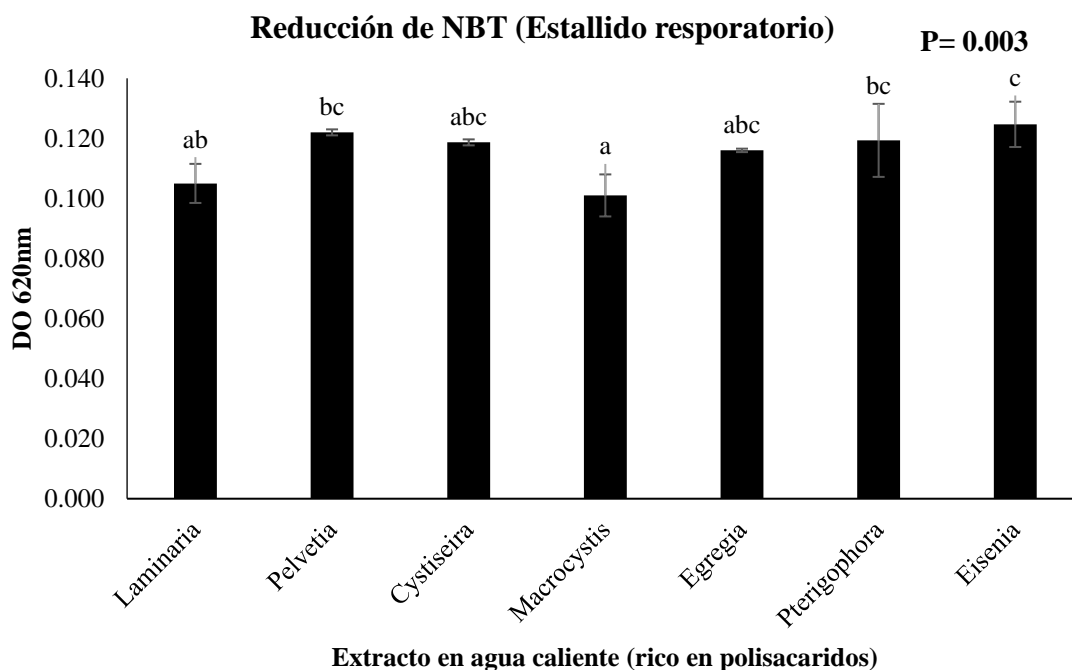
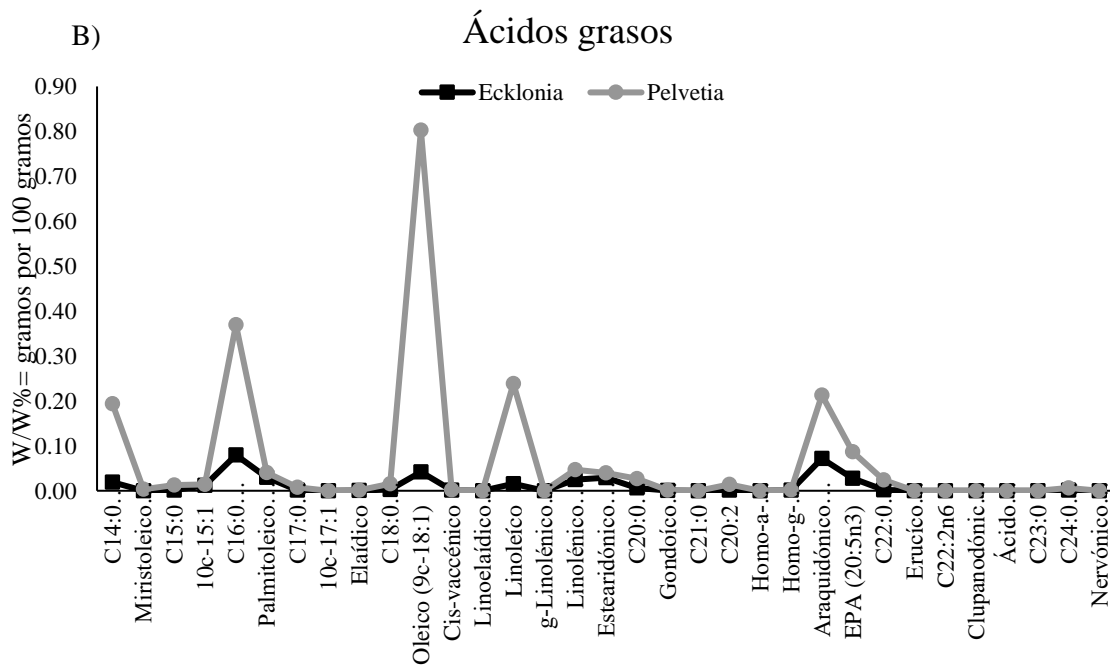
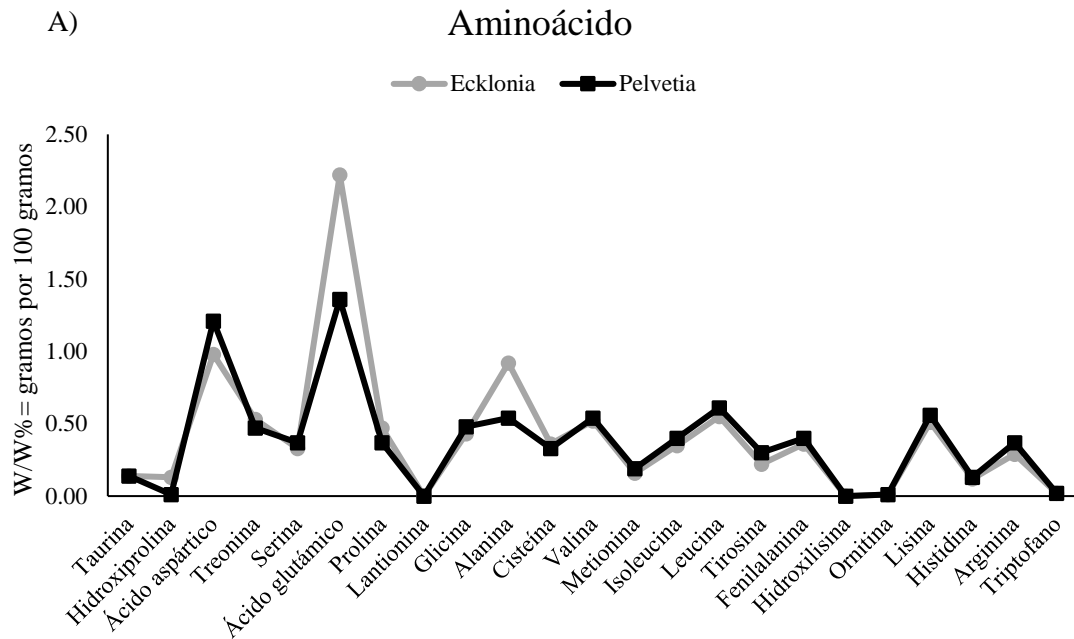


Fig. 14. Reducción del NBT en la prueba de estallido respiratorio para cada uno de los extractos evaluados, letras distintas representan diferencias significativas

Una vez seleccionadas las dos algas con las mejores características de rendimiento y con la mayor capacidad inmunoestimulante *in vitro* (*E. arborea* y *S. compressa*), se realizó el análisis proximal del alga y adicionalmente, estas dos algas se enviaron a analizar al laboratorio de “Agricultural Experiment Station Chemical Laboratories” (AESCL) en la Universidad de Missouri (UM), en donde se evaluó su contenido de aminoácidos, minerales, perfil de ácidos grasos y perfil de carbohidratos.

El alga *E. arborea* presentó el contenido proteico más alto (9.68%) mientras que *S. compressa* presentó el contenido lipídico más elevado (1.08%). Las dos algas son ricas como fuente de Ca (de 0.716 a 1.0 g/100g), K (de 3.28 a 3.70 g/100g) y Zn (de 58.8 a 12 ppm), datos para *S. compressa* y *E. arborea*, respectivamente. El aminoácido más abundante fue el ác. glutámico (1.36-2.22g/100g de materia seca), seguidos por el ác. Aspártico (1.21-

0.98g/100g de materia seca) y alanina (0.54-0.92g/100g de materia seca), estos resultados confirman tener una buena composición para ser utilizadas en los bioensayos.



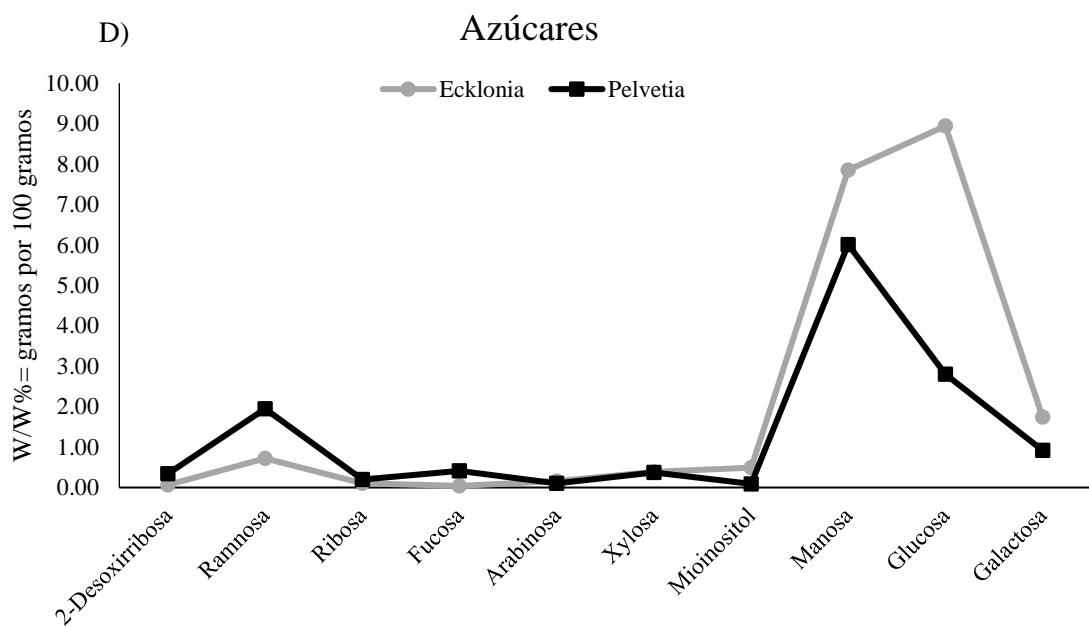
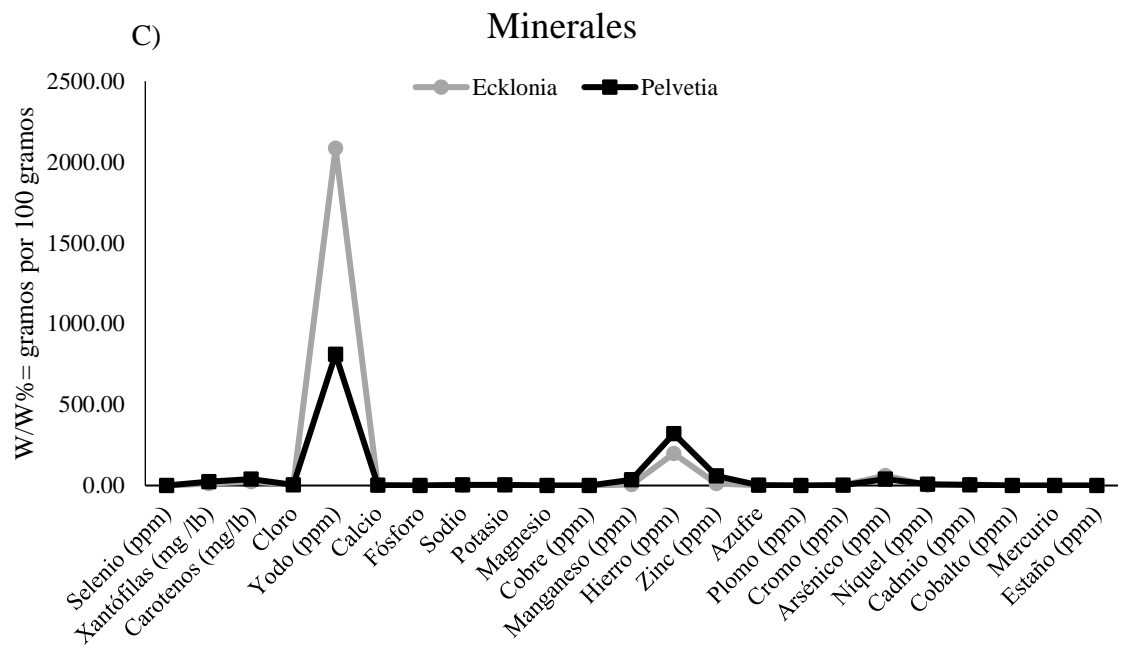


Fig. 15. Composición de A) Aminoácidos, B) Ácidos grasos, C) Minerales y D) Azúcares en las harinas de las algas *E. arborea* y *S. compressa*

Tabla 9. Composición química de *E. arborea* y *S. compressa* (%w/w)

	Harina <i>E.</i> <i>arborea</i>	Extracto <i>E.</i> <i>arborea</i>	Harina <i>S.</i> <i>compressa</i>	Extracto <i>S.</i> <i>compressa</i>
%Humedad	13.02	9.19	10.88	10.88
%Proteína	6.66	7.67	6.39	7.17
F=4.3				
%Proteína	9.68	11.11	9.29	10.42
F=6.25				
%Lípidos	0.45	0.56	1.08	2.93
%Ceniza	23.00	22.96	22.25	24.88
%Fibra	6.00	-	8.30	-
% Rendimiento		7.33		11.30
% Pureza		96.6		22.3
mg azúcares		48.30		11.32

*Promedio de tres análisis

De las algas seleccionadas se formularon 5 dietas, un control, 4 con extracto de polisacárido del alga y 4 con inclusión de harina de las algas. El análisis bromatológico de los 5 tratamientos fue realizado, siendo isoproteicas (38%) e isolipídicas (8%) y con 7% contenido de humedad, 2% fibra y pellet con 10%PMS.

Tabla 10. Análisis proximal de las dietas experimentales

	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9
%Humedad	5.84	7.04	7.13	7.13	8.08	7.67	6.76	6.56	8.73
%Humedad	8.04	6.71	6.36	7.23	5.88	7.86	7.15	7.95	7.86
Pellets									
%Lípidos	7.56	8.38	7.86	7.64	8.28	5.28	8.52	7.68	7.58
%Lípidos	8.59	9.23	8.58	8.54	9.05	9.17	8.62	8.35	8.36
BS									
%Proteína	39.83	39.47	38.81	38.71	37.58	35.56	39.04	38.51	36.9
BS									
%Cenizas	8.12	8.37	8.51	7.76	7.80	8.37	8.72	7.93	8.25
%Fibra	1.44	2.78	2.28	2.11	2.39	2.88	2.90	2.19	2.26

8.2 Bioensayo nutricional y de rendimiento

Los valores obtenidos en el análisis proximal de las dietas se resumen en la tabla 4. De acuerdo con los resultados obtenidos en las dietas el rango de proteína va de 37.58% a 39.47% y los lípidos varían de 8.54% a 9.23%.

	D1 Control	D2 ExE 2g/Kg	D3 ExS2g/Kg
%S	86.33±9.8	86.33±9.8	94.67±4.6
%GP	29.86±0.99	30.63±2.48	31.17±1.84
TCA	1.74±0.04	1.77±0.16	1.70±0.11
%TEC	84.64±2.43	86.68±7.96	87.74±5.29

Tabla 11. Parámetros zootécnicos de los camarones alimentados con las dietas experimentales con inclusión de los extractos ricos en polisacáridos en condiciones controladas de laboratorio, evaluados a los 15 días del bioensayo.

El rendimiento biológico de los juveniles de *Penaeus vannamei* son mostrados en la Tabla 7. La sobrevivencia de los organismos en el bioensayo realizado fue en un rango de entre 86 a 94% de los cuales el valor más alto fue presentado en los organismos que fueron alimentados con la dieta con inclusión del extracto rico en polisacáridos de *S. compressa* (ExS). No se obtuvieron diferencias significativas en los parámetros evaluados, ganancia en peso (GP), tasa de conversión alimenticia (TCA) o tasa específica de crecimiento (TEC), sin embargo, los mejores valores se obtuvieron en general para la dieta adicionada con el extracto de *S. compressa*.

8.3 Inmunoestimulación por inmersión con *Ecklonia arborea* y *Silvetia compressa*

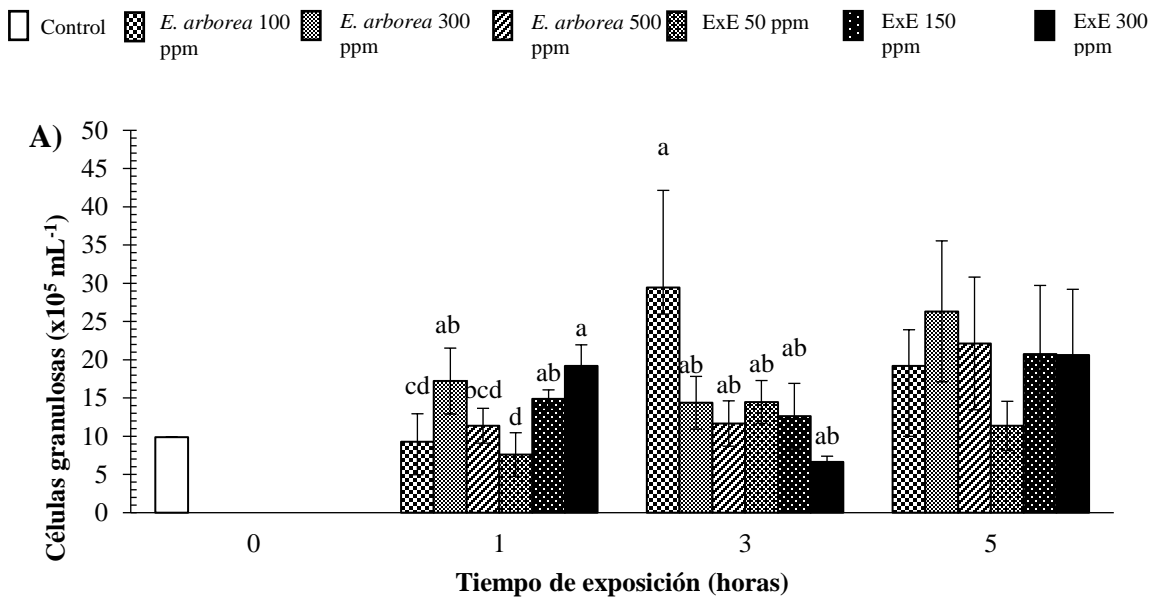
Para evaluar la capacidad inmunoestimulante de las algas seleccionadas se trabajó con juveniles de *P. vannamei* colocados en acuarios de 10 L sin recambio de agua, los cuales fueron puestos en contacto con el alga molida de *E. arborea* y *S. compressa* (100, 300 y 500 ppm) y su extracto durante un tiempo de exposición de 5 horas para observar los cambios en conteo de hemocitos y concentración de la enzima fenoloxidasas.

8.3.1 Resultados *E. arborea*

La fenoloxidasas total (DO=0.2177nm) y la cuenta diferencial para los hemocitos semigranulosos ($11.9 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$) fue significativamente más alta para el tratamiento *E.*

arborea a 500 ppm mientras que para los demás parámetros evaluados existe un incremento para los tratamientos del alga en polvo a concentraciones de 300 y 500 ppm, y un menor efecto sobre la respuesta inmune para el tratamiento control. Cabe destacar que en todos los acuarios experimentales se tuvo un 100% de sobrevivencia.

Existen diferencias significativas para el conteo de células granulosas y para la cuenta total de hemocitos comparando los organismos que estuvieron contacto con el alga o su extracto rico en polisacáridos contra el tratamiento control, donde se tienen diferencias significativas ($p < 0.05$) para los hemocitos granulosos a la 1 y 3 horas de inmersión con los tratamientos del alga, observando una concentración significativamente mayor a las 3 horas de inmersión para los organismos que estuvieron en contacto con el alga a 100 ppm, sin embargo no se encontraron diferencias significativas entre tiempo o tratamientos para el caso de los hemocitos hialinos.



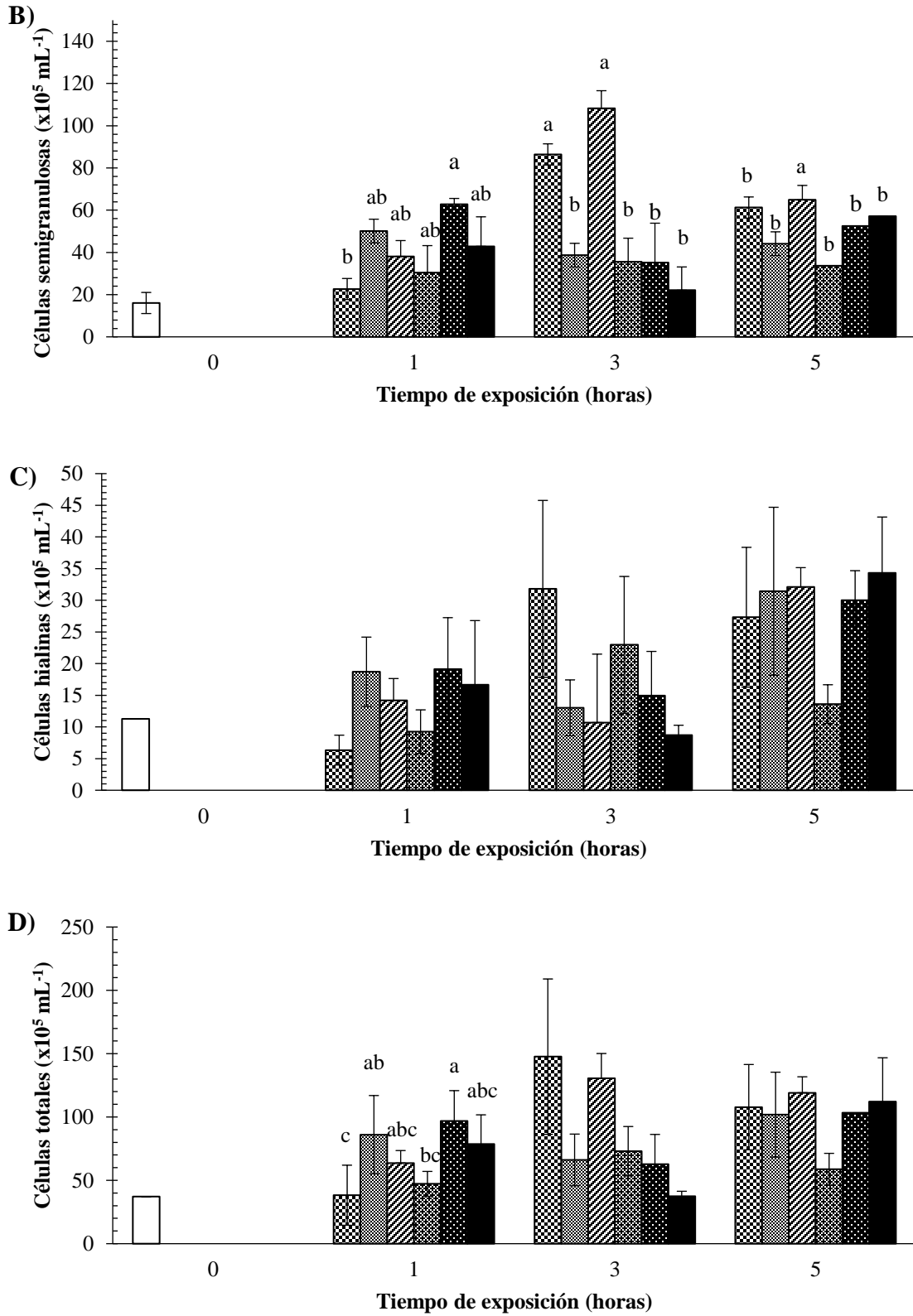


Fig. 16. Células granuladas (A), células semigranulosas (B), células hialinas (C) y cuenta total de hemocitos (D) de camarón blanco *Penaeus vannamei* que fueron inmersos durante

un bioensayo de 5 horas en agua marina sintética conteniendo *E. arborea* en polvo a 100, 300 y 500ppm; y su extracto rico en polisacáridos a 50, 150 y 300ppm.

		Control		<i>Ecklonia arborea</i> 100 ppm		<i>Ecklonia arborea</i> 300 ppm		<i>Ecklonia arborea</i> 500 ppm		Ex <i>E. arborea</i> 50 ppm		Ex <i>E. arborea</i> 150 ppm		Ex <i>E. arborea</i> 300 ppm		ANO VA
1 hora	H.	9.88E	1.33E	9.88E	3.67E _c	9.88E	4.31E _a	9.88E	2.28E _b	9.88E	2.86E	9.88E	1.18E _a	9.88E	2.75E	
	G/mL	+05 ±	-02 _b	+05 ±	+05 _d	+05 ±	+05 _b	+05 ±	+05 _d	+05 ±	+05 _d	+05 ±	+05 _c	+05 ±	+05 _a	0.005
	H.	1.61E	5.03E	2.27E	1.77E	5.01E	2.23E _a	3.81E	1.70E _a	3.04E	7.48E _a	6.28E	4.02E	4.29E	1.10E _a	
	SG/mL	+06 ±	+04 _b	+06 ±	+06 _b	+06 ±	+06 _b	+06 ±	+06 _b	+06 ±	+05 _b	+06 ±	+06 _a	+06 ±	+06 _b	0.041
	H.	1.13E	5.03E	6.34E	2.36E	1.87E	5.48E	1.42E	8.17E	9.25E	3.45E	1.91E	8.13E	1.67E	1.01E	
	H/mL	+06 ±	+04	+05 ±	+05	+06 ±	+05	+06 ±	+05	+05 ±	+05	+06 ±	+05	+06 ±	+06	0.153
3 horas	H.	3.72E	5.30E	3.83E	2.37E	8.61E	3.09E _a	6.37E	2.28E _b	4.72E	9.83E _b	9.68E	4.04E	7.88E	2.30E _a	
	L	+06 ±	+05 _b	+06 ±	+06 _c	+06 ±	+06 _b	+06 ±	+06 _c	+06 ±	+05 _c	+06 ±	+06 _a	+06 ±	+06 _c	0.011
	H.	9.88E	1.33E	2.94E	1.27E	1.44E	3.45E _a	1.17E	2.96E _a	1.45E	2.81E _a	1.26E	4.29E _a	6.65E	7.43E _a	
	G/mL	+05 ±	-02 _b	+06 ±	+06 _a	+06 ±	+05 _b	+06 ±	+05 _b	+06 ±	+05 _b	+06 ±	+05 _b	+05 ±	+04 _b	0.036
	H.	1.61E	5.03E	8.64E	3.53E	3.87E	1.30E	1.08E	9.11E	3.55E	8.31E	3.52E	1.28E	2.21E	2.78E	
	H/mL	+06 ±	+04 _b	+06 ±	+06 _a	+06 ±	+06 _b	+07 ±	+06 _a	+06 ±	+05 _b	+06 ±	+06 _b	+06 ±	+05 _b	0.037
5 horas	H.	1.13E	5.03E	3.18E	1.40E	1.30E	4.40E	1.07E	4.83E	2.30E	1.08E	1.50E	6.97E	8.70E	1.57E	
	H/mL	+06 ±	+04	+06 ±	+06	+06 ±	+05	+06 ±	+05	+06 ±	+06	+06 ±	+05	+05 ±	+05	0.257
	H.	3.72E	5.30E	1.48E	6.13E	6.61E	2.04E	1.31E	1.05E	7.30E	1.95E	6.27E	2.40E	3.74E	3.93E	
	L	+06 ±	+05	+07 ±	+06	+06 ±	+06	+07 ±	+07	+06 ±	+06	+06 ±	+06	+06 ±	+05	0.387
	H.	9.88E	1.33E	1.92E	4.72E	2.63E	9.22E	2.21E	8.68E	1.14E	3.22E	2.08E	8.97E	2.06E	8.59E	
	H/mL	+05 ±	-02	+06 ±	+05	+06 ±	+05	+06 ±	+05	+06 ±	+05	+06 ±	+05	+06 ±	+05	0.557
5 horas	H.	1.61E	5.03E	6.13E	1.80E	4.42E	1.31E	6.49E	1.95E	3.38E	6.80E	5.25E	1.12E	5.72E	1.87E	
	SG/mL	+06 ±	+04 _b	+06 ±	+06 _b	+06 ±	+06 _b	+06 ±	+06 _a	+06 ±	+05 _b	+06 ±	+06 _b	+06 ±	+06 _b	0.033
	H.	1.13E	5.03E	2.73E	1.10E	3.14E	1.33E	3.21E	9.15E	1.36E	3.06E	3.00E	4.68E	3.43E	8.84E	
	H/mL	+06 ±	+04	+06 ±	+06	+06 ±	+06	+06 ±	+05	+06 ±	+05	+06 ±	+05	+06 ±	+05	0.383
5 horas	H.	3.72E	5.30E	1.08E	1.08E	1.02E	1.02E	1.19E	1.19E	5.87E	5.87E	1.03E	1.03E	1.12E	1.12E	
	L	+06 ±	+05	+07 ±	+07	+07 ±	+07	+07 ±	+07	+06 ±	+06	+07 ±	+07	+07 ±	+07	0.574

Tabla 12. Concentración celular de hemocitos (Hg, Hsg, Hh y CTH) en la hemolinfa de *L. vannamei* puestos en contacto con los diferentes tratamientos respecto al tiempo de muestreo (cel/ml). Valores expresados como media ± DE. Distintas letras expresan diferencias significativas ($\alpha \leq 0.05$)

Para el caso de las mediciones de la fenoloxidasa, solo se observan diferencias significativas para el caso de la fenoloxidasa total ($p < 0.05$), teniendo un aumento a las 3 horas de inmersión para los organismos que fueron puestos en contacto con el alga a 500 ppm y mayor en todos los tratamientos en comparación con el tratamiento control.

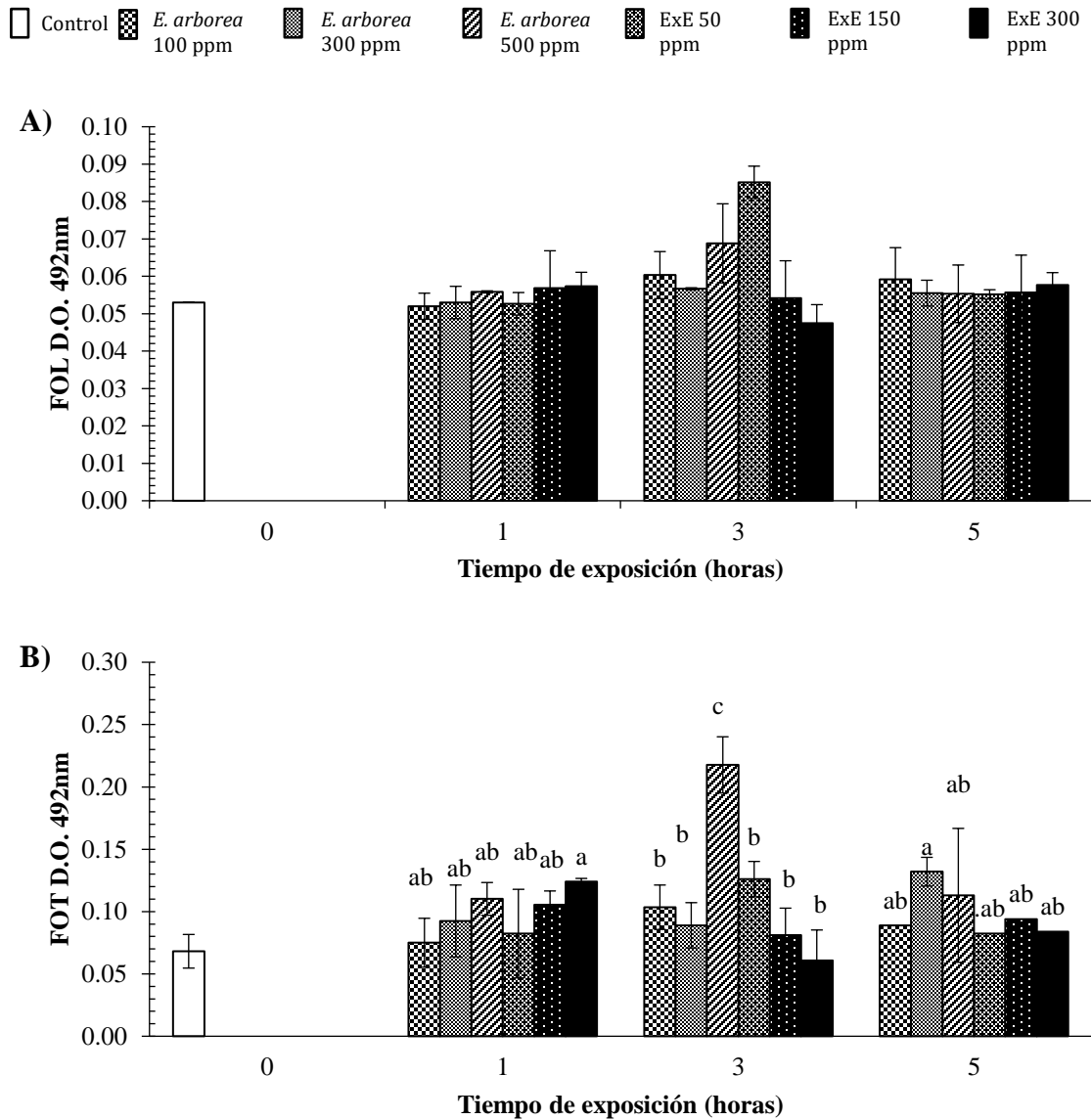


Fig. 17. Fenoloxidasa libre (FOL)(A), fenoloxidasa total (FOL) (B) de camarón blanco *Penaeus vannamei* que fueron inmersos durante un bioensayo de 5 horas en agua marina sintética conteniendo *E.arborea* en polvo a 100, 300 y 500ppm; y su extracto rico en polisacáridos a 50, 150 y 300ppm.

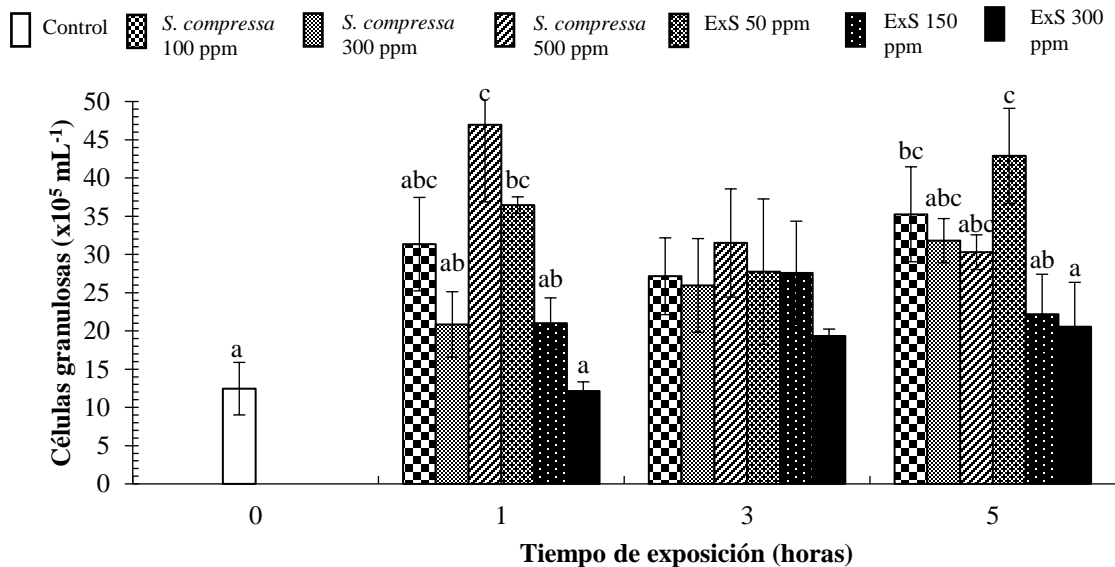
		Control		<i>Ecklonia arborea</i> 100 ppm		<i>Ecklonia arborea</i> 300 ppm		<i>Ecklonia arborea</i> 500 ppm		ExE <i>E. arborea</i> 50 ppm		ExE <i>E. arborea</i> 150 ppm		ExE <i>E. arborea</i> 300 ppm		ANOVA
		FO	L	FO	L	FO	L	FO	L	FO	L	FO	L	FO	L	
1 hora	FO	0.05	0.0	0.05	0.0	0.05	0.0	0.05	0.0	0.05	0.0	0.05	0.0	0.05	0.0	0.88
	L	3 ±	1	2 ±	0	3 ±	0	6 ±	0	3 ±	0	7 ±	0	7 ±	1	
	T	8 ±	1 b	5 ±	1 b	3 ±	3 b	0 ±	1 b	2 ±	1 b	6 ±	3 b	4 ±	5 a	
3 horas	FO	0.06	0.0	0.07	0.0 a	0.09	0.0 a	0.11	0.0 a	0.08	0.0 a	0.10	0.0 a	0.12	0.0	0.14
	L	3 ±	1	0 ±	1	7 ±	0	9 ±	1	5 ±	0	4 ±	0	8 ±	0	
	T	8 ±	1 b	4 ±	2 b	9 ±	2 b	8 ±	2 b	6 ±	4 b	1 ±	1 b	1 ±	0 b	
5 horas	FO	0.05	0.0	0.05	0.0	0.05	0.0	0.05	0.0	0.05	0.0	0.05	0.0	0.05	0.0	0.23
	L	3 ±	1	9 ±	1	6 ±	0	5 ±	1	5 ±	0	6 ±	0	8 ±	0	
	T	8 ±	1 b	9 ±	2 b	2 ±	1 a	3 ±	5 b	3 ±	1 b	4 ±	2 b	4 ±	2 b	
	FO	0.06	0.0	0.08	0.0 a	0.13	0.0	0.11	0.0 a	0.08	0.0 a	0.09	0.0 a	0.08	0.0 a	0.029
	L	3 ±	1	9 ±	1	6 ±	0	5 ±	1	5 ±	0	6 ±	0	8 ±	0	
	T	8 ±	1 b	9 ±	2 b	2 ±	1 a	3 ±	5 b	3 ±	1 b	4 ±	2 b	4 ±	2 b	

Tabla 13. Actividad de la fenoloxidasa libre (FOL) y fenoloxidasa total (FOT) en la hemolinfa de *L. vannamei* puestos en contacto con los diferentes tratamientos respecto al tiempo de muestreo (DO. 492nm). Valores expresados como media ± DE. Distintas letras expresan diferencias significativas ($\alpha \leq 0.05$)

8.3.2 Resultados *S. compressa*

Se observaron los efectos del contacto por inmersión para el alga *S. compressa* y su extracto rico en polisacáridos durante un periodo de exposición de 5 horas, encontrando diferencias significativas ($p < 0.05$) en conteo celular y en actividad de la enzima fenoloxidasa

Se encuentran diferencias significativas en el conteo total y diferencial de hemocitos a 1 y 5 horas de inmersión, donde existe un aumento en la concentración para el tratamiento de 500 ppm del alga y de 100 ppm del extracto rico en polisacáridos en hemocitos granuloso en las tres horas de muestreo realizadas y aumento significativo en comparación con el tratamiento control, de igual manera se observó un comportamiento similar para el caso del conteo de las células semigranulosas, siendo de igual manera significativamente más altas las muestras de los organismos que se pusieron en contacto con el alga a 500 ppm (6.78×10^6) seguido a los que recibieron el extracto rico en polisacáridos a 50 ppm (5.88×10^6). Contrario a lo encontrado con las células granuloso no se observaron diferencias significativas para los hemocitos hialinos.



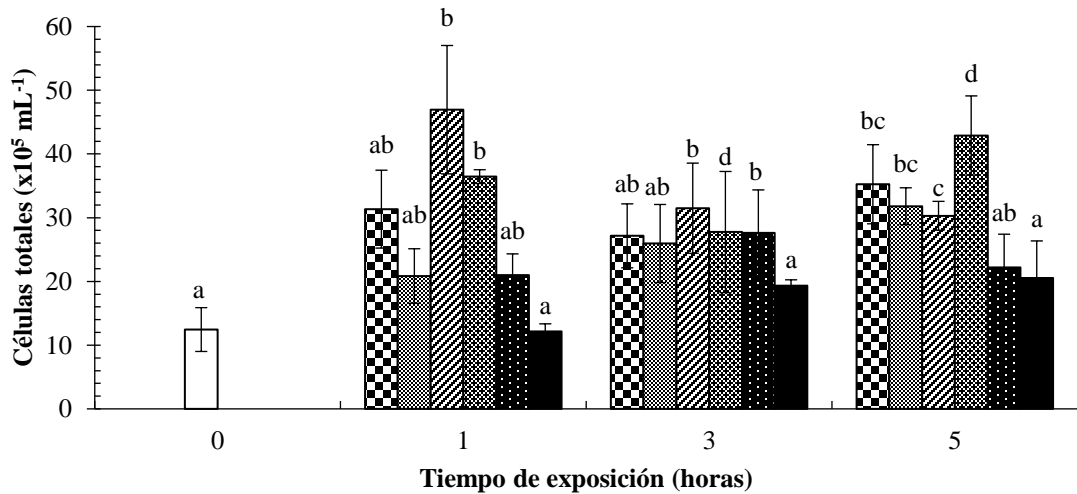
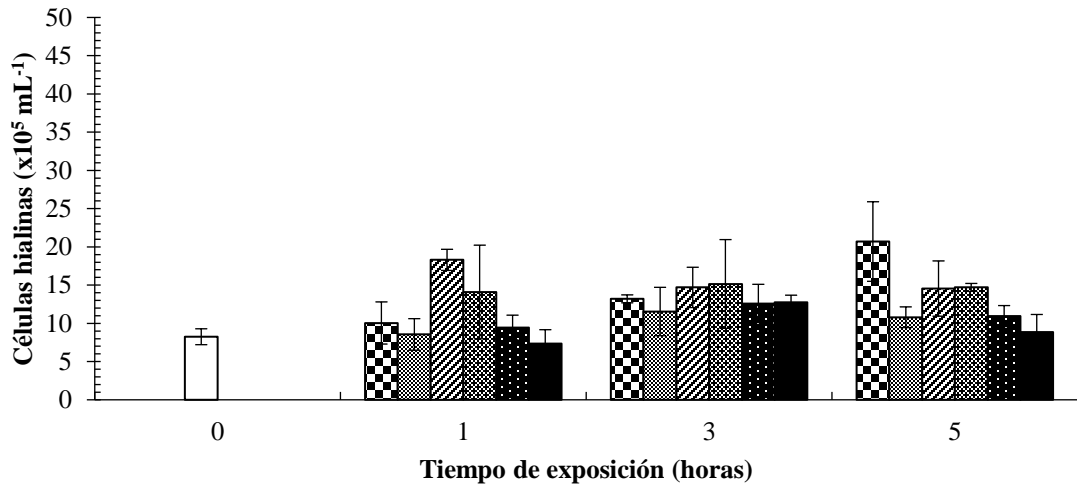
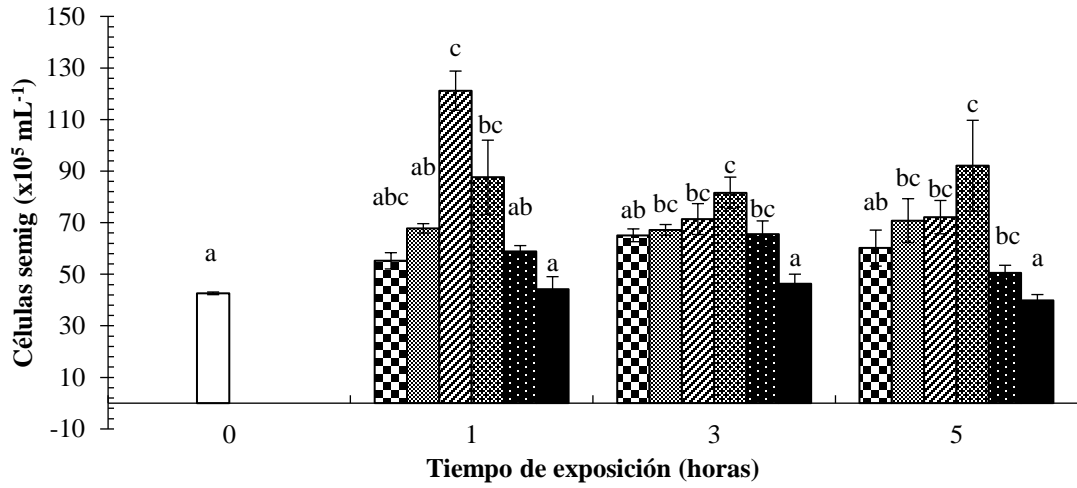


Fig. 18.. Células granulosa (A), células semigranulosa (B), células hialina (C) y cuenta total de hemocitos (D) de camarón blanco *Penaeus vannamei* que fueron inmersos durante un bioensayo de 5 horas en agua marina sintética conteniendo *S.*

compressa en polvo a 100, 300 y 500ppm; y su extracto rico en polisacáridos a 50, 150 y 300ppm.

	Control	<i>Selvetia compressa</i> 100mg/L		<i>Selvetia compressa</i> 300mg/L		<i>Selvetia compressa</i> 500mg/L		ExS. <i>S. compressa</i> 50mg/L		ExS <i>S. compressa</i> 150mg/L		ExS <i>S. compressa</i> 300mg/L		ANO VA				
1 hora	H.	1.25E	3.44E	2.60E	4.28E ^a	2.72E	6.11E ^a	2.33E	4.73E	2.76E	3.32E ^b	2.78E	1.08E ^a	3.15E	1.01E	0.001		
	G/mL	+06 ±	+05	+06 ±	+05 ^c	+06 ±	+05 ^b	+06 ±	+05 ^c	+06 ±	+05 ^c	+06 ±	+05 ^b	+06 ±	+06 ^a			
	H.	4.26E	5.20E	4.35E	1.82E ^b	5.52E	3.16E ^a	6.78E	4.03E	5.88E	2.31E ^b	8.76E	1.44E ^a	1.21E	7.61E		0.04	
	SG/mL	+06 ±	+04 ^a	+06 ±	+05 ^c	+06 ±	+05 ^b	+06 ±	+05 ^c	+06 ±	+05 ^c	+06 ±	+06 ^b	+07 ±	+05 ^a			
	H.	8.25E	1.04E	8.55E	2.06E	1.01E	2.75E	4.35E	1.70E	9.45E	1.62E	1.41E	6.13E	1.83E	1.38E			0.142
	H/mL	+05 ±	+05	+05 ±	+05	+06 ±	+05	+05 ±	+05	+05 ±	+05	+06 ±	+05	+06 ±	+05			
H.	TOT/m	6.33E	4.94E	9.72E	4.76E ^a	9.66E	5.37E ^a	6.66E	8.33E	8.93E	3.77E ^b	1.38E	3.62E ^a	1.86E	1.60E	0.019		
L	+06 ±	+05 ^a	+06 ±	+05 ^b	+06 ±	+05 ^b	+06 ±	+05 ^b	+06 ±	+05 ^c	+07 ±	+06 ^b	+07 ±	+06 ^a				
H.	1.25E	3.44E	2.60E	6.13E	2.72E	5.02E	2.33E	3.93E	2.76E	6.75E	2.78E	9.51E	3.15E	7.07E	0.373			
G/mL	+06 ±	+05	+06 ±	+05	+06 ±	+05	+06 ±	+05	+06 ±	+05	+06 ±	+05	+06 ±	+05				
H.	4.26E	5.20E	6.72E	2.08E ^a	6.51E	2.48E ^b	5.81E	2.38E ^b	6.56E	5.12E	8.16E	6.08E ^b	7.14E	5.99E			0	
SG/mL	+06 ±	+04 ^a	+06 ±	+05 ^b	+06 ±	+05 ^c	+06 ±	+05 ^c	+06 ±	+05 ^c	+06 ±	+05 ^c	+06 ±	+05 ^a				
H.	8.25E	1.04E	1.16E	3.16E	1.32E	5.20E	1.16E	4.18E	1.26E	2.51E	1.52E	5.80E	1.47E	2.64E		0.76		
H/mL	+05 ±	+05	+06 ±	+05	+06 ±	+04	+06 ±	+05	+06 ±	+05	+06 ±	+05	+06 ±	+05				
H.	TOT/m	6.33E	4.94E	1.05E	4.62E ^a	1.05E	3.38E ^a	9.29E	1.01E	1.06E	1.33E	1.25E	2.08E ^b	1.18E	1.41E			0.006
L	+06 ±	+05 ^a	+07 ±	+05 ^b	+07 ±	+05 ^b	+06 ±	+06 ^b	+07 ±	+06 ^d	+07 ±	+06 ^c	+07 ±	+06 ^a				
H.	1.25E	3.44E	3.18E	2.89E ^b	3.53E	6.21E ^b	3.33E	3.68E ^b	2.22E	5.22E	4.29E	6.21E ^a	3.03E	2.26E	0.001			
G/mL	+06 ±	+05 ^a	+06 ±	+05 ^c	+06 ±	+05 ^c	+06 ±	+05 ^c	+06 ±	+05 ^c	+06 ±	+05 ^b	+06 ±	+05 ^a				
H.	4.26E	5.20E	7.08E	8.49E ^a	6.02E	6.98E ^b	5.61E	3.00E	5.06E	2.93E	9.21E	1.76E ^b	7.22E	6.46E		0		
SG/mL	+06 ±	+04 ^a	+06 ±	+05 ^b	+06 ±	+05 ^c	+06 ±	+05 ^c	+06 ±	+05 ^c	+06 ±	+06 ^c	+06 ±	+05 ^a				
H.	8.25E	1.04E	1.08E	1.35E	2.07E	5.20E	1.43E	4.60E ^b	1.10E	1.37E	1.47E	5.20E	1.46E	3.61E			0.384	
H/mL	+05 ±	+05	+06 ±	+05	+06 ±	+05	+06 ±	+05 ^c	+06 ±	+05	+06 ±	+04	+06 ±	+05				
H.	TOT/m	6.33E	4.94E	1.13E	1.05E ^b	1.16E	1.76E ^b	1.04E	4.32E	8.37E	9.48E	1.50E	1.56E ^a	1.17E	9.10E			0
L	+06 ±	+05 ^a	+07 ±	+06 ^c	+07 ±	+06 ^c	+07 ±	+05 ^c	+06 ±	+05 ^d	+07 ±	+06 ^b	+07 ±	+05 ^a				

Tabla 14. Concentración celular de hemocitos (Hg, Hsg, Hh y CTH) en la hemolinfa de *L. vannamei* puestos en contacto con los diferentes tratamientos respecto al tiempo de muestreo (cel/ml). Valores expresados como media \pm DE. Distintas letras expresan diferencias significativas ($\alpha \leq 0.05$)

Para la medición de la fenoloxidasa, se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) tanto para la determinación de la enzima libre y total como se puede mostrar en las gráficas, donde se encuentra un aumento en la fenoloxidasa libre para los tiempos 1 y 3 de muestreo siendo los valores más elevados para los organismos con el tratamiento a 500 ppm (DO= 0.05 y 0.047nm) del alga y 150 ppm (DO=0.05 y 0.049 nm) del extracto de polisacáridos; para la enzima total se presentan diferencias significativas en la primera hora de contacto con el alga, siendo significativamente mayor la actividad para los organismos que recibieron el extracto a una dosis de 150 ppm (DO=0.273nm).

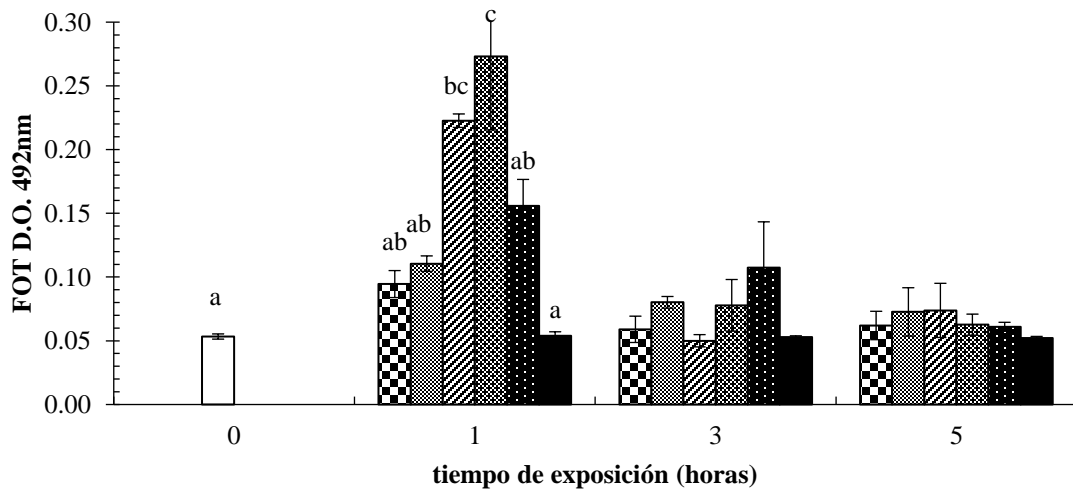
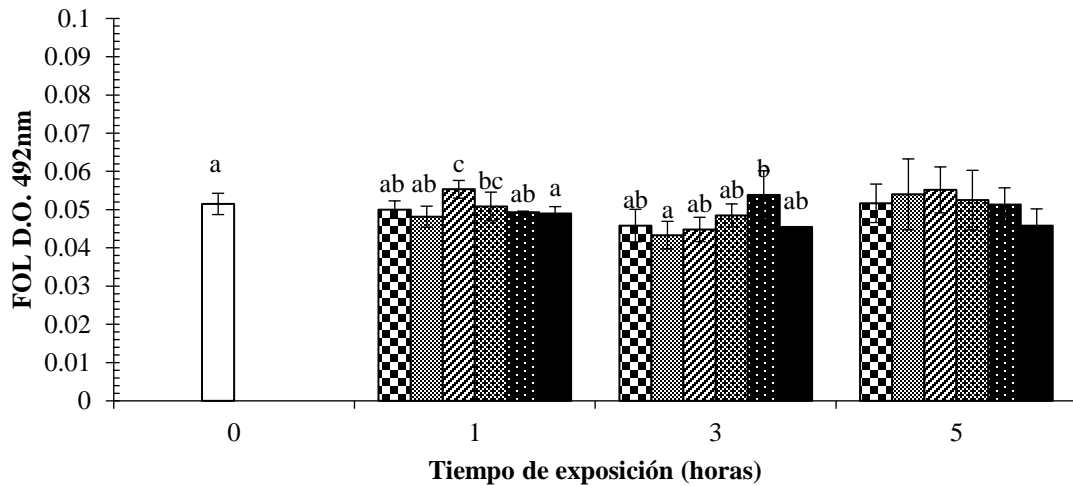


Fig. 19. Fenoloxidasa libre (FOL)(A), fenoloxidasa total (FOL) (B) de camarón blanco *Penaeus vannamei* que fueron inmersos durante un bioensayo de 5 horas en agua marina sintética conteniendo *S. compressa* en polvo a 100, 300 y 500ppm; y su extracto rico en polisacáridos a 50, 150 y 300ppm

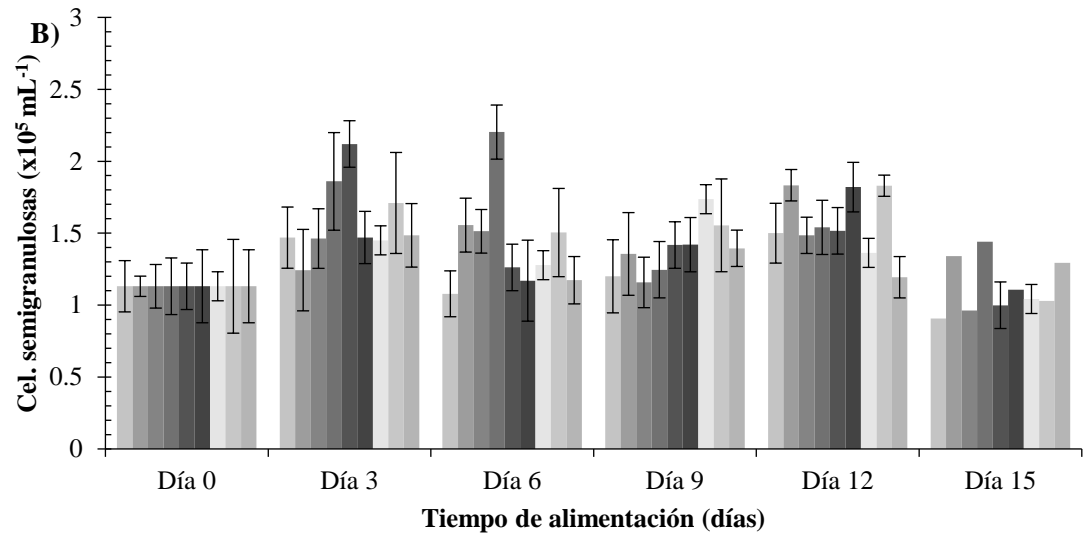
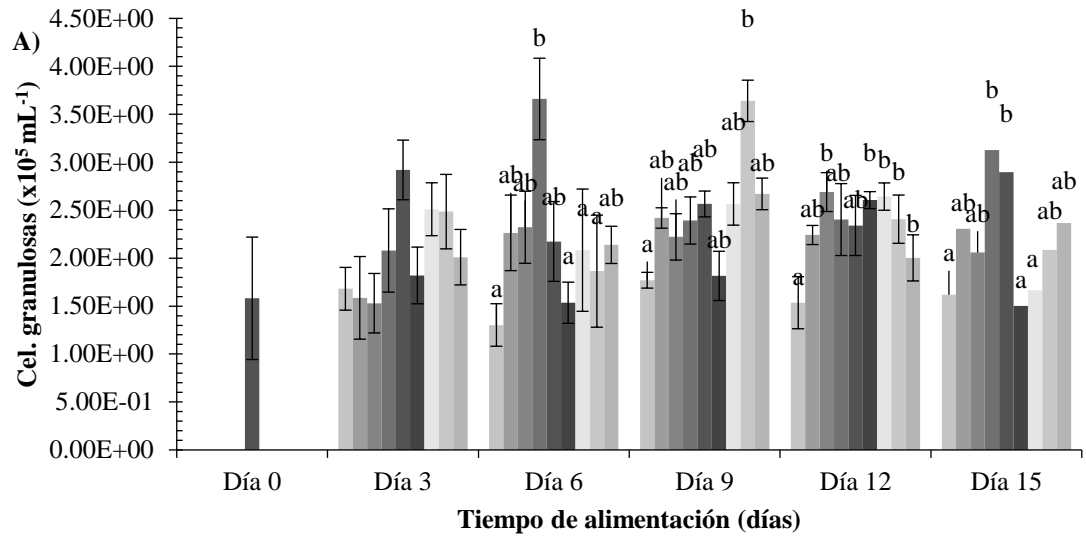
		Control	<i>Silvetia compressa</i> 100mg/L		<i>Silvetia compressa</i> 300mg/L		<i>Silvetia compressa</i> 500mg/L		ExS <i>S. compressa</i> 50mg/L		ExS <i>S. compressa</i> 150mg/L		ExS <i>S. compressa</i> 300mg/L		ANOVA	
1 hora	FOL	0.052 ± 0.00	a	0.048 ± 0.00	ab	0.050 ± 0.00	ab	0.050 ± 0.00	c	0.049 ± 0.00	bc	0.050 ± 0.00	ab	0.055 ± 0.00	a	0.07
	FOT	0.053 ± 0.01	a	0.111 ± 0.01	ab	0.095 ± 0.01	a	0.137 ± 0.01	bc	0.016 ± 0.02	c	0.273 ± 0.06	ab	0.223 ± 0.01	a	0.00
3 horas	FOL	0.052 ± 0.00	a	0.043 ± 0.00	ab	0.046 ± 0.00	ab	0.047 ± 0.00	ab	0.052 ± 0.01	ab	0.049 ± 0.00	b	0.044 ± 0.00	ab	0.06
	FOT	0.053 ± 0.01		0.080 ± 0.00		0.059 ± 0.01		0.066 ± 0.01		0.107 ± 0.04		0.078 ± 0.02		0.050 ± 0.00		0.12
5 horas	FOL	0.052 ± 0.00		0.054 ± 0.01		0.052 ± 0.01		0.048 ± 0.00		0.051 ± 0.00		0.052 ± 0.01		0.055 ± 0.01		0.52
	FOT	0.053 ± 0.01		0.073 ± 0.02		0.062 ± 0.01		0.059 ± 0.01		0.061 ± 0.00		0.063 ± 0.01		0.074 ± 0.02		0.39

Tabla 15. Actividad de la fenoloxidasa libre (FOL) y fenoloxidasa total (FOT) en la hemolinfa de *L vannamei* puestos en contacto con los diferentes tratamientos respecto al tiempo de muestreo (DO. 492nm). Valores expresados como media ± DE. Distintas letras expresan diferencias significativas ($\alpha \leq 0.05$)

8.4 Inmunoestimulación oral mediante la dieta con harina de *Ecklonia arborea* y *Silvetia compressa* o sus extractos

En la presente sección se evaluó el efecto de *E. arborea* y *S. compressa* así como sus extractos ricos en polisacáridos cuando son incluidos en la dieta a 20 y 40 g Kg⁻¹, y 1 y 2 g Kg⁻¹ respectivamente. El bioensayo fue realizado en la UMDI Sisal UNAM donde se trabajó con juveniles de *P. vannamei*, en el cual el experimento demostró que el consumo de dietas adicionadas con *E. arborea* y *S. compressa* aumenta significativamente los parámetros de inmunidad celular y humoral en hemolinfa, además de existir una interacción respecto al tiempo de administración (p = 0.00). Encontrando que la inclusión del extracto del alga *E. arborea* a 2 g kg⁻¹ en la dieta aumenta significativamente FOT (DO = 0.4815±0.03), ER (DO = 0.37822 ± 0.04), CTH (1.4 x 10⁷ células mL⁻¹) y de hemocitos granulados (2.3 x 10⁶ células mL⁻¹), respecto al tratamiento control (FOT = 0.2273±0.01, ER = 0.1532±0.02, CTH = 8.4 x 10⁶ células mL⁻¹, CDH = 5.3 x 10⁵ células mL⁻¹). Se observó un aumento en los parámetros evaluados en los organismos que fueron alimentados con las dietas con inclusión del ExE (2 g kg⁻¹) a partir del tercer día de administración siendo el día 12 de alimentación cuando se tiene un aumento significativo (p < 0.05), siendo para la FOT (DO = 0.2736 día 3 – 0.4815 día 12), ER (DO = 0.183 día 3 – 0.3782 día 12) y conteo de hemocitos (H. granulados = 2.96 x 10⁶ día 3 – 2.3 x 10⁶ día 12; H. semigranulosos 8.3 x 10⁶ día 3 – 9.7 x 10⁶ día 12).

■ Control ■ 20 g Kg⁻¹ *E. arborea* ■ 40 g Kg⁻¹ *E. arborea* ■ 1 g Kg⁻¹ ExE ■ 2 g Kg⁻¹ ExE ■ 20 g Kg⁻¹ *P. compressa* ■ 40 g Kg⁻¹ *P. compressa* ■ 1 g Kg⁻¹ ExP ■ 2 g Kg⁻¹ ExP



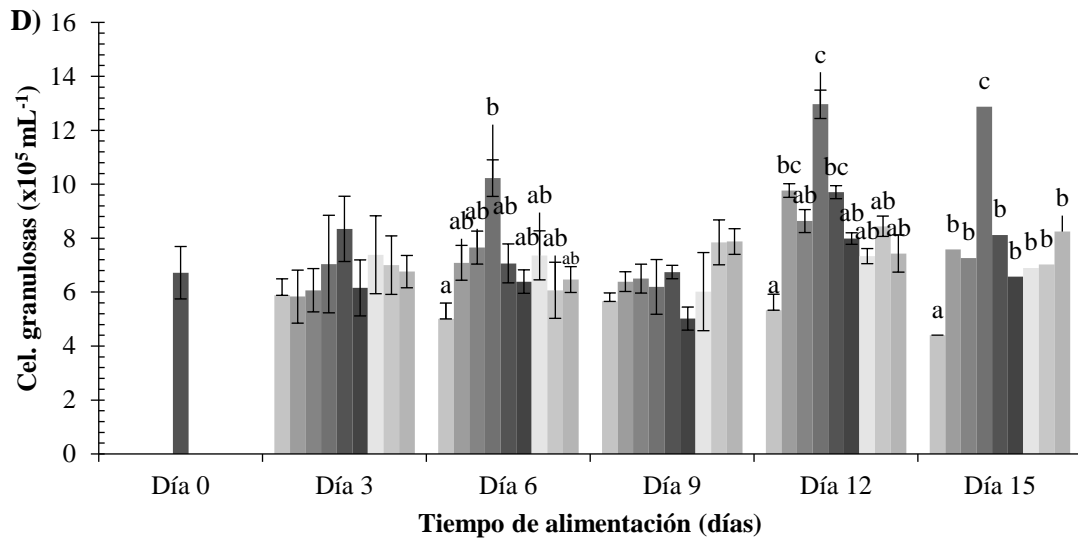
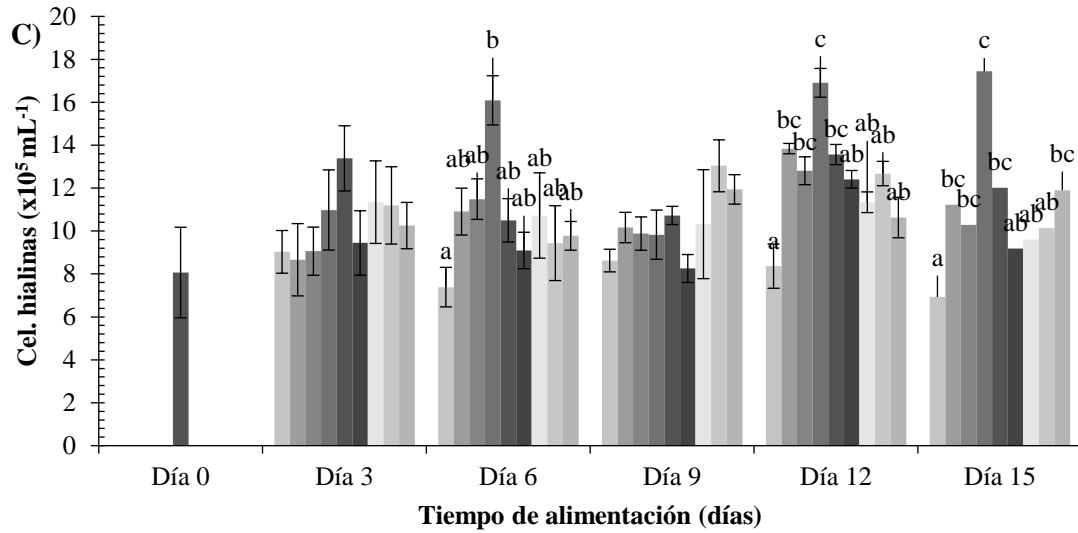


Fig. 20. Células granulosa (A), células semigranulosa (B), células hialinas (C) y cuenta total de hemocitos (D) de camarón blanco *Penaeus vannamei* que fueron inmersos durante un bioensayo de 15 días de alimentación con las dietas experimentales.

Parámetros	Días tos (kg en alimento)										ANOVA								
	Control	<i>E. aeroborea</i> 20		<i>E. aeroborea</i> 40		ExE 1		ExE 2		<i>P. compressa</i> 20		<i>P. compressa</i> 40		ExP 1	ExP 2				
Hemocitos granulados ($\times 10^5 \text{ mL}^{-1}$)	0	1.6E+06 ± 1.6E+05	1.6E+06 ± 1.6E+05	1.6E+06 ± 1.6E+05	1.6E+06 ± 1.6E+05	1.6E+06 ± 1.6E+05	1.6E+06 ± 1.6E+05	1.6E+06 ± 1.6E+05	1.6E+06 ± 1.6E+05	1.6E+06 ± 1.6E+05	1.6E+06 ± 1.6E+05	1.6E+06 ± 1.6E+05	1.6E+06 ± 1.6E+05	1.6E+06 ± 1.6E+05	1.6E+06 ± 1.6E+05	1.6E+06 ± 1.6E+05			
	3	1.7E+06 ± 6.0E+04	1.6E+06 ± 8.7E+04	1.5E+06 ± 1.1E+05	2.1E+06 ± 4.3E+05	2.9E+06 ± 6.4E+05	2.5E+06 ± 4.6E+05	2.5E+06 ± 4.6E+05	2.5E+06 ± 4.6E+05	2.5E+06 ± 4.6E+05	2.5E+06 ± 4.6E+05	2.5E+06 ± 4.6E+05	2.5E+06 ± 4.6E+05	2.5E+06 ± 4.6E+05	2.5E+06 ± 4.6E+05	2.5E+06 ± 4.6E+05	2.5E+06 ± 4.6E+05	0.097	
	6	1.3E+06 ± 2.2E+05 a	2.3E+06 ± 4.3E+05 ab	2.3E+06 ± 3.1E+05 ab	3.7E+06 ± 4.3E+05 b	2.2E+06 ± 3.1E+05 ab	1.5E+06 ± 3.0E+05 a	2.1E+06 ± 2.8E+05 a	1.9E+06 ± 3.9E+05 a	2.1E+06 ± 2.8E+05 a	1.9E+06 ± 3.9E+05 a	2.1E+06 ± 2.8E+05 a	1.9E+06 ± 3.9E+05 a	2.1E+06 ± 2.8E+05 a	1.9E+06 ± 3.9E+05 a	2.1E+06 ± 2.8E+05 a	2.1E+06 ± 2.8E+05 a	2.1E+06 ± 2.8E+05 a	0.012
	9	1.8E+06 ± 2.2E+05 a	2.4E+06 ± 3.9E+05 ab	2.2E+06 ± 3.8E+05 ab	2.4E+06 ± 4.2E+05 ab	2.6E+06 ± 4.2E+05 ab	1.8E+06 ± 2.2E+05 ab	2.6E+06 ± 4.2E+05 ab	2.6E+06 ± 4.2E+05 ab	2.6E+06 ± 4.2E+05 ab	1.8E+06 ± 2.2E+05 ab	2.6E+06 ± 4.2E+05 ab	2.6E+06 ± 4.2E+05 ab	2.6E+06 ± 4.2E+05 ab	2.6E+06 ± 4.2E+05 ab	2.6E+06 ± 4.2E+05 ab	2.6E+06 ± 4.2E+05 ab	2.6E+06 ± 4.2E+05 ab	0.087
	12	1.5E+06 ± 8.2E+04 a	2.2E+06 ± 1.1E+05 ab	2.7E+06 ± 2.4E+05 b	2.4E+06 ± 2.5E+05 ab	2.3E+06 ± 1.3E+05 ab	2.6E+06 ± 2.6E+05 b	2.6E+06 ± 2.2E+05 b	2.4E+06 ± 2.2E+05 b	2.0E+06 ± 1.6E+05 bc	2.4E+06 ± 2.2E+05 b	2.0E+06 ± 1.6E+05 bc	2.4E+06 ± 2.2E+05 b	2.0E+06 ± 1.6E+05 bc	2.4E+06 ± 2.2E+05 b	2.0E+06 ± 1.6E+05 bc	2.4E+06 ± 2.2E+05 b	2.4E+06 ± 2.2E+05 b	0.251
Hemocitos semigranulosos ($\times 10^5 \text{ mL}^{-1}$)	0	6.7E+06 ± 7.9E+05	6.7E+06 ± 7.9E+05	6.7E+06 ± 7.9E+05	6.7E+06 ± 7.9E+05	6.7E+06 ± 7.9E+05	6.7E+06 ± 7.9E+05	6.7E+06 ± 7.9E+05	6.7E+06 ± 7.9E+05	6.7E+06 ± 7.9E+05	6.7E+06 ± 7.9E+05	6.7E+06 ± 7.9E+05	6.7E+06 ± 7.9E+05	6.7E+06 ± 7.9E+05	6.7E+06 ± 7.9E+05	6.7E+06 ± 7.9E+05	6.7E+06 ± 7.9E+05		
	3	5.9E+06 ± 3.8E+05	5.8E+06 ± 3.8E+05	6.1E+06 ± 6.0E+05	7.0E+06 ± 8.8E+05	8.3E+06 ± 9.7E+05	6.2E+06 ± 7.4E+05	7.4E+06 ± 5.4E+05	7.0E+06 ± 6.5E+05	6.8E+06 ± 5.4E+05	7.0E+06 ± 6.5E+05	6.8E+06 ± 5.4E+05	7.0E+06 ± 6.5E+05	6.8E+06 ± 5.4E+05	7.0E+06 ± 6.5E+05	6.8E+06 ± 5.4E+05	7.0E+06 ± 6.5E+05	7.0E+06 ± 6.5E+05	0.160
	6	5.0E+06 ± 6.1E+05 a	7.1E+06 ± 9.8E+05 ab	7.7E+06 ± 8.0E+05 ab	1.0E+07 ± 1.8E+06 b	7.1E+06 ± 1.2E+06 ab	6.4E+06 ± 1.0E+06 ab	7.4E+06 ± 1.4E+06 ab	6.1E+06 ± 1.1E+06 ab	6.5E+06 ± 6.0E+05 ab	7.4E+06 ± 1.4E+06 ab	6.1E+06 ± 1.1E+06 ab	6.5E+06 ± 6.0E+05 ab	7.4E+06 ± 1.4E+06 ab	6.1E+06 ± 1.1E+06 ab	6.5E+06 ± 6.0E+05 ab	7.4E+06 ± 1.4E+06 ab	7.4E+06 ± 1.4E+06 ab	0.153
	9	5.7E+06 ± 5.9E+05	6.4E+06 ± 6.5E+05	6.5E+06 ± 6.1E+05	6.2E+06 ± 6.8E+05	6.7E+06 ± 7.2E+05	5.0E+06 ± 4.4E+05	6.0E+06 ± 9.1E+05	7.8E+06 ± 1.0E+06	7.9E+06 ± 4.8E+05	6.0E+06 ± 9.1E+05	7.8E+06 ± 1.0E+06	7.9E+06 ± 4.8E+05	6.0E+06 ± 9.1E+05	7.8E+06 ± 1.0E+06	7.9E+06 ± 4.8E+05	6.0E+06 ± 9.1E+05	7.8E+06 ± 1.0E+06	0.076
	12	5.3E+06 ± 3.1E+05 a	9.8E+06 ± 3.7E+05 ab	8.6E+06 ± 5.4E+05 ab	1.3E+07 ± 1.0E+06 c	9.7E+06 ± 2.5E+05 bc	8.0E+06 ± 4.3E+05 ab	7.3E+06 ± 1.4E+06 ab	8.4E+06 ± 8.3E+05 ab	7.4E+06 ± 4.8E+05 ab	9.7E+06 ± 2.5E+05 bc	8.0E+06 ± 4.3E+05 ab	7.3E+06 ± 1.4E+06 ab	8.4E+06 ± 8.3E+05 ab	7.4E+06 ± 4.8E+05 ab	8.2E+06 ± 6.9E+05 b	8.2E+06 ± 6.9E+05 b	8.2E+06 ± 6.9E+05 b	0.000
Hemocitos hialinos ($\times 10^5 \text{ mL}^{-1}$)	0	1.1E+06 ± 2.3E+05	1.1E+06 ± 2.3E+05	1.1E+06 ± 2.3E+05	1.1E+06 ± 2.3E+05	1.1E+06 ± 2.3E+05	1.1E+06 ± 2.3E+05	1.1E+06 ± 2.3E+05	1.1E+06 ± 2.3E+05	1.1E+06 ± 2.3E+05	1.1E+06 ± 2.3E+05	1.1E+06 ± 2.3E+05	1.1E+06 ± 2.3E+05	1.1E+06 ± 2.3E+05	1.1E+06 ± 2.3E+05	1.1E+06 ± 2.3E+05	1.1E+06 ± 2.3E+05		
	3	1.5E+06 ± 1.8E+05	1.2E+06 ± 7.1E+04	1.5E+06 ± 1.5E+05	1.9E+06 ± 2.0E+05	2.1E+06 ± 6.2E+05	1.5E+06 ± 2.5E+05	1.5E+06 ± 2.0E+05	1.7E+06 ± 3.3E+05	1.5E+06 ± 2.5E+05	1.7E+06 ± 3.3E+05	1.5E+06 ± 2.0E+05	1.7E+06 ± 3.3E+05	1.5E+06 ± 2.5E+05	1.7E+06 ± 3.3E+05	1.5E+06 ± 2.5E+05	1.7E+06 ± 3.3E+05	1.7E+06 ± 3.3E+05	0.611
	6	1.1E+06 ± 2.1E+05	1.6E+06 ± 2.8E+05	1.5E+06 ± 2.1E+05	2.2E+06 ± 3.4E+05	1.3E+06 ± 1.4E+05	1.2E+06 ± 1.8E+05	1.3E+06 ± 3.0E+05	1.5E+06 ± 3.5E+05	1.2E+06 ± 2.2E+05	1.3E+06 ± 1.4E+05	1.2E+06 ± 1.8E+05	1.3E+06 ± 3.0E+05	1.5E+06 ± 3.5E+05	1.2E+06 ± 2.2E+05	1.3E+06 ± 1.4E+05	1.2E+06 ± 2.2E+05	1.3E+06 ± 1.4E+05	0.447
	9	1.2E+06 ± 1.6E+05	1.4E+06 ± 1.9E+05	1.2E+06 ± 1.5E+05	1.2E+06 ± 1.9E+05	1.4E+06 ± 1.5E+05	1.4E+06 ± 2.8E+05	1.7E+06 ± 5.0E+05	1.6E+06 ± 3.1E+05	1.4E+06 ± 1.6E+05	1.4E+06 ± 1.5E+05	1.4E+06 ± 2.8E+05	1.7E+06 ± 5.0E+05	1.6E+06 ± 3.1E+05	1.4E+06 ± 1.6E+05	1.4E+06 ± 1.6E+05	1.4E+06 ± 1.6E+05	1.4E+06 ± 1.6E+05	0.848
	12	1.5E+06 ± 2.5E+05	1.8E+06 ± 2.9E+05	1.5E+06 ± 1.8E+05	1.5E+06 ± 2.0E+05	1.5E+06 ± 1.9E+05	1.8E+06 ± 1.9E+05	1.4E+06 ± 3.2E+05	1.8E+06 ± 3.2E+05	1.2E+06 ± 1.3E+05	1.5E+06 ± 1.9E+05	1.8E+06 ± 1.9E+05	1.4E+06 ± 3.2E+05	1.8E+06 ± 3.2E+05	1.2E+06 ± 1.3E+05	1.2E+06 ± 1.3E+05	1.2E+06 ± 1.3E+05	1.2E+06 ± 1.3E+05	0.559
Hemocitos totales ($\times 10^5 \text{ mL}^{-1}$)	0	8.2E+06 ± 7.9E+05	8.1E+06 ± 7.9E+05	8.1E+06 ± 7.9E+05	8.1E+06 ± 7.9E+05	8.1E+06 ± 7.9E+05	8.1E+06 ± 7.9E+05	8.1E+06 ± 7.9E+05	8.1E+06 ± 7.9E+05	8.1E+06 ± 7.9E+05	8.1E+06 ± 7.9E+05	8.1E+06 ± 7.9E+05	8.1E+06 ± 7.9E+05	8.1E+06 ± 7.9E+05	8.1E+06 ± 7.9E+05	8.1E+06 ± 7.9E+05	8.1E+06 ± 7.9E+05		
	3	9.0E+06 ± 4.2E+05	8.7E+06 ± 4.5E+05	9.1E+06 ± 7.5E+05	1.1E+07 ± 1.4E+06	1.3E+07 ± 2.1E+06	9.4E+06 ± 1.1E+06	1.1E+07 ± 1.1E+06	1.1E+07 ± 1.3E+06	1.0E+07 ± 7.9E+05	1.1E+07 ± 1.1E+06	1.1E+07 ± 1.1E+06	1.1E+07 ± 1.1E+06	1.1E+07 ± 1.1E+06	1.1E+07 ± 1.1E+06	1.1E+07 ± 1.1E+06	1.1E+07 ± 1.1E+06	1.1E+07 ± 1.1E+06	0.069
	6	7.4E+06 ± 9.9E+05 a	1.1E+07 ± 1.7E+06 ab	1.1E+07 ± 1.1E+06 ab	1.6E+07 ± 1.9E+06 ab	1.1E+07 ± 1.5E+06 ab	9.1E+06 ± 1.9E+06 ab	1.1E+07 ± 1.9E+06 ab	9.4E+06 ± 1.8E+06 ab	9.8E+06 ± 1.1E+06 ab	1.1E+07 ± 1.7E+06 ab	1.1E+07 ± 1.1E+06 ab	9.4E+06 ± 1.8E+06 ab	9.8E+06 ± 1.1E+06 ab	9.8E+06 ± 1.1E+06 ab	9.8E+06 ± 1.1E+06 ab	9.8E+06 ± 1.1E+06 ab	9.8E+06 ± 1.1E+06 ab	0.000
	9	8.6E+06 ± 9.2E+05	1.0E+07 ± 1.1E+06	9.9E+06 ± 9.5E+05	9.8E+06 ± 1.1E+06	1.1E+07 ± 1.0E+06	8.3E+06 ± 2.0E+06	1.0E+07 ± 2.0E+06	1.3E+07 ± 1.7E+06	1.2E+07 ± 6.7E+05	1.1E+07 ± 1.0E+06	8.3E+06 ± 2.0E+06	1.0E+07 ± 2.0E+06	1.3E+07 ± 1.7E+06	1.2E+07 ± 6.7E+05	1.2E+07 ± 6.7E+05	1.2E+07 ± 6.7E+05	1.2E+07 ± 6.7E+05	0.151
	12	8.4E+06 ± 5.3E+05 a	1.4E+07 ± 7.1E+05 bc	1.3E+07 ± 7.8E+05 bc	1.7E+07 ± 1.1E+06 bc	1.4E+07 ± 4.2E+05 ab	1.2E+07 ± 2.5E+06 ab	1.1E+07 ± 2.5E+06 ab	1.3E+07 ± 1.2E+06 ab	1.1E+07 ± 6.9E+05 ab	1.4E+07 ± 7.1E+05 bc	1.3E+07 ± 7.8E+05 bc	1.7E+07 ± 1.1E+06 bc	1.4E+07 ± 4.2E+05 ab	1.2E+07 ± 2.5E+06 ab	1.1E+07 ± 2.5E+06 ab	1.3E+07 ± 1.2E+06 ab	1.1E+07 ± 6.9E+05 ab	1.1E+07 ± 6.9E+05 ab
	15	6.9E+06 ± 1.0E+06 a	1.1E+07 ± 2.4E+05 bc	1.0E+07 ± 6.5E+05 bc	1.7E+07 ± 6.7E+05 bc	1.2E+07 ± 4.7E+05 ab	9.2E+06 ± 4.8E+05 ab	9.6E+06 ± 4.8E+05 ab	1.0E+07 ± 5.7E+05 ab	1.1E+07 ± 2.4E+05 bc	1.0E+07 ± 6.5E+05 bc	1.7E+07 ± 6.7E+05 bc	1.2E+07 ± 4.7E+05 ab	9.2E+06 ± 4.8E+05 ab	9.6E+06 ± 4.8E+05 ab	1.0E+07 ± 5.7E+05 ab	1.2E+07 ± 4.7E+05 ab	1.2E+07 ± 4.7E+05 ab	0.000

Tabla 16. Concentración celular de hemocitos (Hg, Hsg, Hh y CTH) en la hemolinfa de *P. vannamei* puestos en contacto con los diferentes tratamientos respecto al tiempo de muestreo (cel/mL). Valores expresados como media ± DE. Distintas letras expresan diferencias significativas ($\alpha \leq 0.05$)

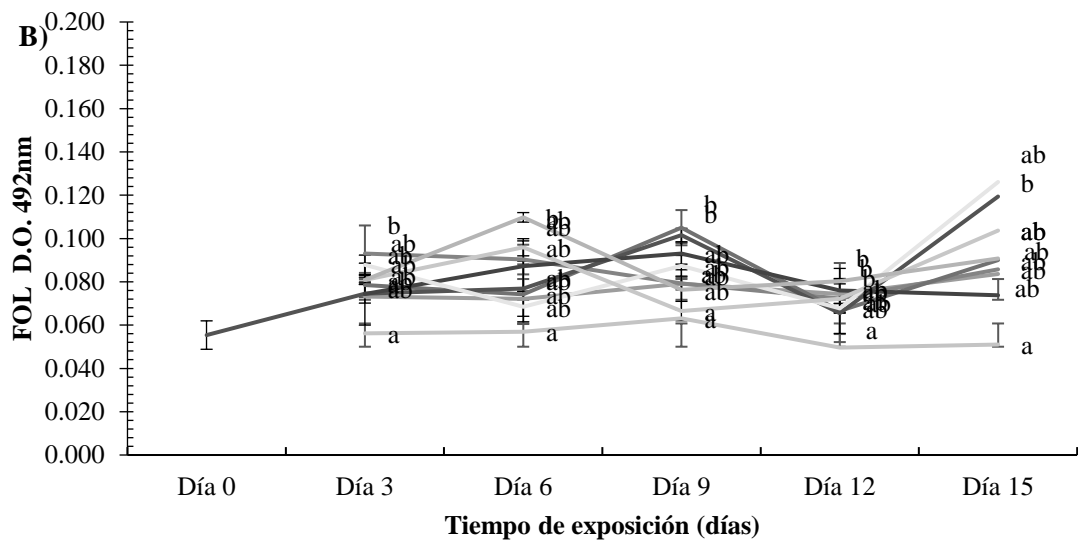
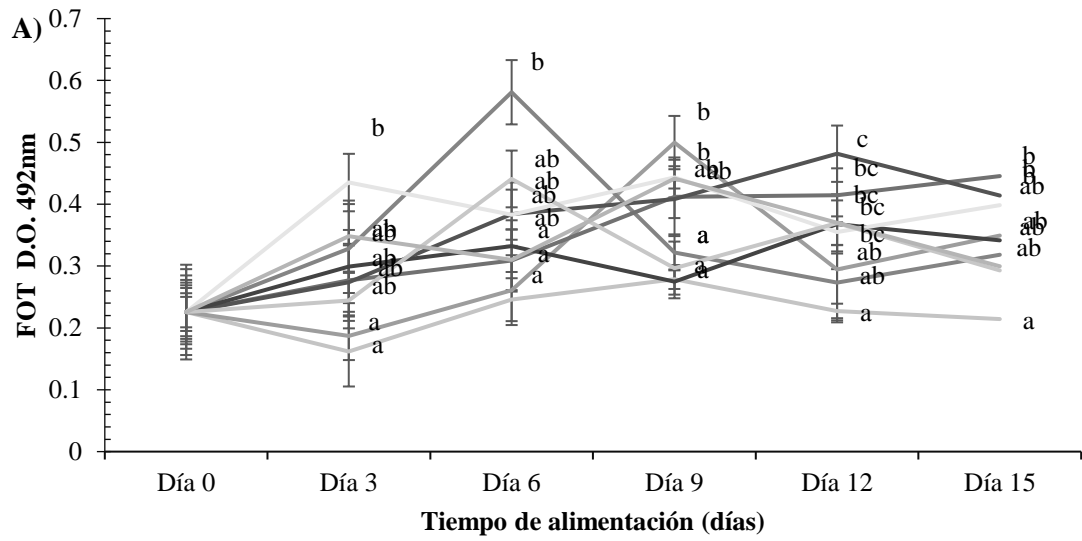


Fig. 21. Fenoloxidasa libre (FOL)(A), fenoloxidasa total (FOL) (B) de camarón blanco *Penaeus vannamei* que fueron que fueron alimentados durante un bioensayo de 15 días de alimentación con dietas experimentales

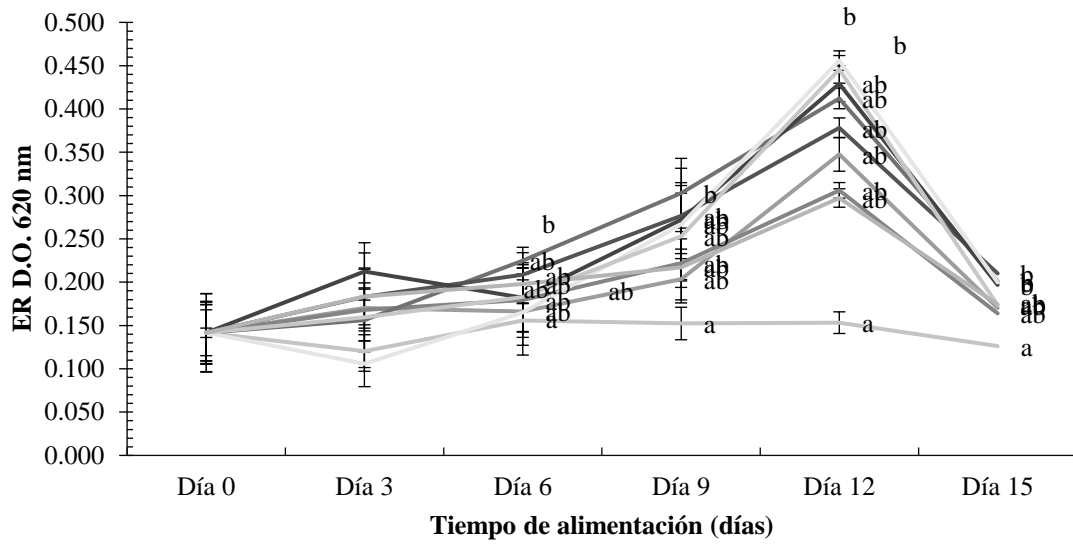


Fig. 22. Estallido respiratorio en camarón blanco *Penaeus vannamei* que han sido alimentados con las dietas experimentales durante 15 días. Cada línea representa el valor promedio de 15 camarones con la desviación estándar. Los datos al mismo tiempo de exposición con letras diferentes indican diferencias significativamente ($\alpha < 0.05$)

Parámetros	Días (os (kg en alimento))																		ANOVA	
	Control	<i>E. aerobea</i> 20		<i>E. aerobea</i> 40		ExE 1		ExE 2		<i>P. compressa</i> 20		<i>P. compressa</i> 40		Exp 1		Exp 2				
FOT D.O. 492nm	0	0.22555 ± 0.0287	0.22555 ± 0.0287	0.22555 ± 0.0287	0.22555 ± 0.0287	0.22555 ± 0.0287	0.22555 ± 0.0287	0.22555 ± 0.0287	0.22555 ± 0.0287	0.22555 ± 0.0287	0.22555 ± 0.0287	0.22555 ± 0.0287	0.22555 ± 0.0287	0.22555 ± 0.0287	0.22555 ± 0.0287	0.22555 ± 0.0287	0.22555 ± 0.0287	0.22555 ± 0.0287		
	3	0.16184 ± 0.0246 a	0.187 ± 0.03052 a	0.32828 ± 0.05197 ab	0.27683 ± 0.04764 ab	0.27361 ± 0.04333 ab	0.29917 ± 0.05928 ab	0.43494 ± 0.07657 b	0.24406 ± 0.03896 ab	0.34839 ± 0.06939 ab	0.03896 ab	0.34839 ± 0.06939 ab	0.03896 ab	0.34839 ± 0.06939 ab	0.03896 ab	0.34839 ± 0.06939 ab	0.03896 ab	0.34839 ± 0.06939 ab	0.03896 ab	0.038
	6	0.24561 ± 0.05655 a	0.26106 ± 0.03901 a	0.58094 ± 0.07184 b	0.30894 ± 0.0566 a	0.38394 ± 0.06228 ab	0.33217 ± 0.05914 ab	0.383 ± 0.04644 ab	0.44078 ± 0.0448 ab	0.31006 ± 0.05745 ab	0.0448 ab	0.31006 ± 0.05745 ab	0.0448 ab	0.31006 ± 0.05745 ab	0.0448 ab	0.31006 ± 0.05745 ab	0.0448 ab	0.31006 ± 0.05745 ab	0.0448 ab	0.002
	9	0.27867 ± 0.03468 a	0.49956 ± 0.05646 b	0.32211 ± 0.05196 ab	0.41194 ± 0.05028 ab	0.40806 ± 0.05133 ab	0.27472 ± 0.04179 a	0.44333 ± 0.04051 b	0.29667 ± 0.04586 a	0.44133 ± 0.04895 ab	0.04051 b	0.29667 ± 0.04586 a	0.04051 b	0.29667 ± 0.04586 a	0.04051 b	0.29667 ± 0.04586 a	0.04051 b	0.29667 ± 0.04586 a	0.04051 b	0.031
	12	0.22739 ± 0.01576 a	0.29461 ± 0.04308 ab	0.27317 ± 0.02909 ab	0.41428 ± 0.06352 bc	0.48156 ± 0.03054 c	0.36772 ± 0.02689 bc	0.35494 ± 0.01802 bc	0.36967 ± 0.04286 bc	0.36989 ± 0.03043 bc	0.02689 bc	0.35494 ± 0.01802 bc	0.02689 bc	0.35494 ± 0.01802 bc	0.02689 bc	0.35494 ± 0.01802 bc	0.02689 bc	0.35494 ± 0.01802 bc	0.02689 bc	0.000
FOL D.O. 492nm	0	0.05539 ± 0.03882	0.05539 ± 0.03882	0.05539 ± 0.03882	0.05539 ± 0.03882	0.05539 ± 0.03882	0.05539 ± 0.03882	0.05539 ± 0.03882	0.05539 ± 0.03882	0.05539 ± 0.03882	0.05539 ± 0.03882	0.05539 ± 0.03882	0.05539 ± 0.03882	0.05539 ± 0.03882	0.05539 ± 0.03882	0.05539 ± 0.03882	0.05539 ± 0.03882	0.05539 ± 0.03882	0.05539 ± 0.03882	
	3	0.05622 ± 0.01844 a	0.07322 ± 0.011 ab	0.09306 ± 0.01552 b	0.0785 ± 0.01043 a	0.07456 ± 0.00656 ab	0.07433 ± 0.00792 ab	0.08783 ± 0.007 ab	0.08081 ± 0.00235 ab	0.08087 ± 0.01637	0.007 ab	0.08081 ± 0.00235 ab	0.007 ab	0.08081 ± 0.00235 ab	0.007 ab	0.08081 ± 0.00235 ab	0.007 ab	0.08081 ± 0.00235 ab	0.007 ab	0.033
	6	0.057 ± 0.00607 a	0.07211 ± 0.00325 ab	0.09028 ± 0.01297 ab	0.07428 ± 0.00561 ab	0.07683 ± 0.00437 ab	0.08728 ± 0.01429 ab	0.0685 ± 0.00452 ab	0.09594 ± 0.00133 bc	0.10978 ± 0.00213	0.00437 ab	0.08728 ± 0.01429 ab	0.00437 ab	0.08728 ± 0.01429 ab	0.00437 ab	0.08728 ± 0.01429 ab	0.00437 ab	0.08728 ± 0.01429 ab	0.00437 ab	0.051
	9	0.06311 ± 0.00469 a	0.07911 ± 0.00693 ab	0.07922 ± 0.00686 b	0.105 ± 0.01378 b	0.10161 ± 0.01276 ab	0.09306 ± 0.0116 ab	0.08739 ± 0.00698 a	0.0665 ± 0.00397 ab	0.07633 ± 0.00219	0.0116 ab	0.08739 ± 0.00698 a	0.0116 ab	0.08739 ± 0.00698 a	0.0116 ab	0.08739 ± 0.00698 a	0.0116 ab	0.08739 ± 0.00698 a	0.0116 ab	0.009
	12	0.04961 ± 0.00222 a	0.07439 ± 0.00277 b	0.07228 ± 0.00285 ab	0.06656 ± 0.00813 ab	0.06655 ± 0.00311 b	0.07606 ± 0.00488 ab	0.06772 ± 0.00477 ab	0.07211 ± 0.00447 b	0.08028 ± 0.00922	0.00222 a	0.07439 ± 0.00277 b	0.00222 a	0.07439 ± 0.00277 b	0.00222 a	0.07439 ± 0.00277 b	0.00222 a	0.07439 ± 0.00277 b	0.00222 a	0.009
ER (D.O. 620nm)	0	0.14162 ± 0.022	0.14162 ± 0.022	0.14162 ± 0.022	0.14162 ± 0.022	0.14162 ± 0.022	0.14162 ± 0.022	0.14162 ± 0.022	0.14162 ± 0.022	0.14162 ± 0.022	0.14162 ± 0.022	0.14162 ± 0.022	0.14162 ± 0.022	0.14162 ± 0.022	0.14162 ± 0.022	0.14162 ± 0.022	0.14162 ± 0.022	0.14162 ± 0.022	0.14162 ± 0.022	
	3	0.12039 ± 0.03547	0.17017 ± 0.03272	0.16789 ± 0.0357	0.15611 ± 0.02648	0.183 ± 0.04537	0.2125 ± 0.03633	0.10583 ± 0.00542	0.15939 ± 0.03228	0.18361 ± 0.0449	0.03547	0.17017 ± 0.03272	0.03547	0.17017 ± 0.03272	0.03547	0.17017 ± 0.03272	0.03547	0.17017 ± 0.03272	0.03547	0.538
	6	0.15578 ± 0.01891 a	0.16606 ± 0.02323 ab	0.17956 ± 0.02413 b	0.22483 ± 0.05891 ab	0.20878 ± 0.05082 ab	0.18217 ± 0.03309 ab	0.16494 ± 0.02643 ab	0.18274 ± 0.03975 ab	0.19811 ± 0.03281 ab	0.01891 a	0.16606 ± 0.02323 ab	0.01891 a	0.16606 ± 0.02323 ab	0.01891 a	0.16606 ± 0.02323 ab	0.01891 a	0.16606 ± 0.02323 ab	0.01891 a	0.005
	9	0.15233 ± 0.01948 a	0.20339 ± 0.05013 ab	0.222 ± 0.03712 b	0.30278 ± 0.01554 ab	0.27661 ± 0.02534 ab	0.27233 ± 0.02727 ab	0.2665 ± 0.03772 ab	0.25294 ± 0.03966 ab	0.21728 ± 0.02203 ab	0.01948 a	0.20339 ± 0.05013 ab	0.01948 a	0.20339 ± 0.05013 ab	0.01948 a	0.20339 ± 0.05013 ab	0.01948 a	0.20339 ± 0.05013 ab	0.01948 a	0.053
	12	0.15328 ± 0.01877 a	0.34767 ± 0.02387 ab	0.30606 ± 0.028 ab	0.41222 ± 0.04022 ab	0.37822 ± 0.03836 ab	0.42917 ± 0.03928 ab	0.45589 ± 0.06507 b	0.44578 ± 0.04988 b	0.29722 ± 0.04124 ab	0.01877 a	0.34767 ± 0.02387 ab	0.01877 a	0.34767 ± 0.02387 ab	0.01877 a	0.34767 ± 0.02387 ab	0.01877 a	0.34767 ± 0.02387 ab	0.01877 a	0.004
15	0.12633 ± 0.01249 a	0.17039 ± 0.01949 ab	0.164 ± 0.00902 b	0.20078 ± 0.01193 b	0.20999 ± 0.01142 b	0.19694 ± 0.02077 b	0.1997 ± 0.01126 b	0.17338 ± 0.01594 ab	0.17417 ± 0.01062 ab	0.01249 a	0.17039 ± 0.01949 ab	0.01249 a	0.17039 ± 0.01949 ab	0.01249 a	0.17039 ± 0.01949 ab	0.01249 a	0.17039 ± 0.01949 ab	0.01249 a	0.003	

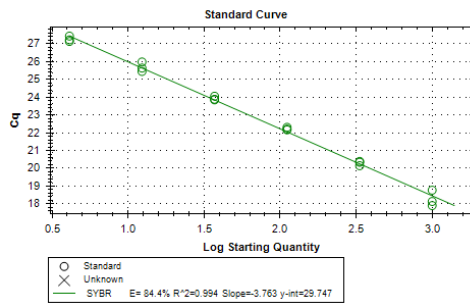
Tabla 17. Actividad de la fenoloxidasas libre (FOL) y fenoloxidasas total (FOT) y Estallido Respiratorio (ER) en la hemolinfa de *P. vannamei* puestos en contacto con los diferentes tratamientos respecto al tiempo de muestreo. Valores expresados como media ± DE. Distintas letras expresan diferencias significativas ($\alpha \leq 0.05$)

8.5 Análisis de qPCR de genes relacionados a respuesta inmune de organismos alimentados con el extracto de *E. arborea*

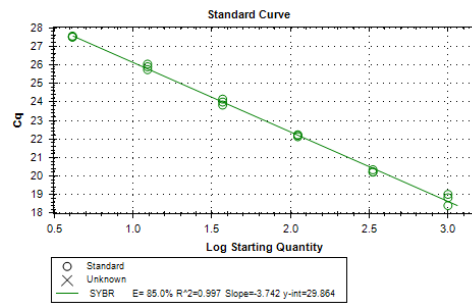
Fueron alimentados juveniles de camarón blanco de un peso promedio de 15 ± 0.05 g con las dietas EXE1 y EXE2 durante el tiempo de administración en las cuales los parámetros de respuesta inmune fueron más elevados (12 días). Las curvas de eficiencia para cada gen (Fig. 23) fueron preparadas utilizando cDNA específico para *P. vannamei* a una concentración de cDNA conocida ($1 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$), a partir de la cual se hicieron diluciones seriadas 1:5 (1, 0.2, 0.04, 0.008 y $0.0016 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$) para los genes β -actina, SOD, proFO y Hc; y 1:2 (1, 0.5, 0.25, 0.125 y $0.0625 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$) para el gen Hc. Cada muestra fue analizada por duplicado, utilizando el gen β -actina como control interno (H. H. Huang et al. 2013)

La expresión de genes relacionados a respuesta inmune en hepatopáncreas de *P. vannamei* alimentados con dietas con inclusión del extracto rico en polisacáridos a 1 y 2 g Kg^{-1} son mostrados en la Fig. 24. Los niveles de ARN mensajero (ARNm) de SOD, Hc y ProPO en el hepatopáncreas de los organismos muestreados significativamente incrementaron con la inclusión del extracto de *E. arborea* en la dieta en comparación con el tratamiento control ($p < 0.05$). Los niveles de ARN de SOD significativamente aumentaron para los organismos alimentados con las dietas con 1 y 2 g Kg^{-1} del extracto comparado con el grupo control, mientras que para los niveles de ARN de Hc se presentó un aumento significativo sólo para los organismos alimentados con la dieta con inclusión de 1 g Kg^{-1} del extracto en comparación con los otros tratamientos, y para el nivel de RNA ProPO se encontraron diferencias significativas observando un mayor aumento para los organismos que recibieron la dieta con 2 g Kg^{-1} del extracto de *E. arborea*.

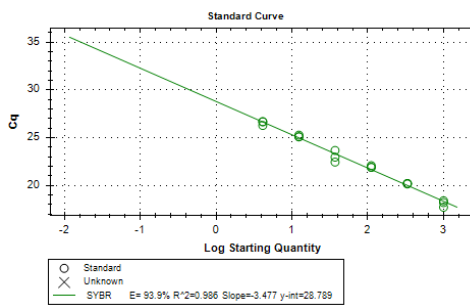
A



B



C



D

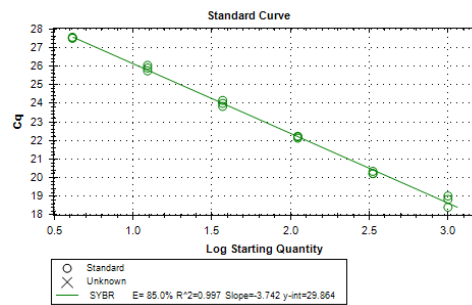
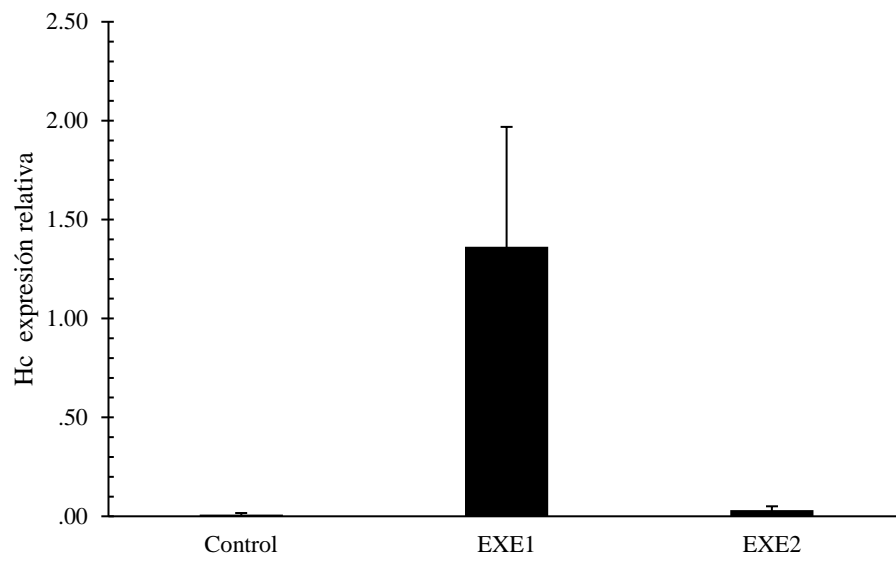
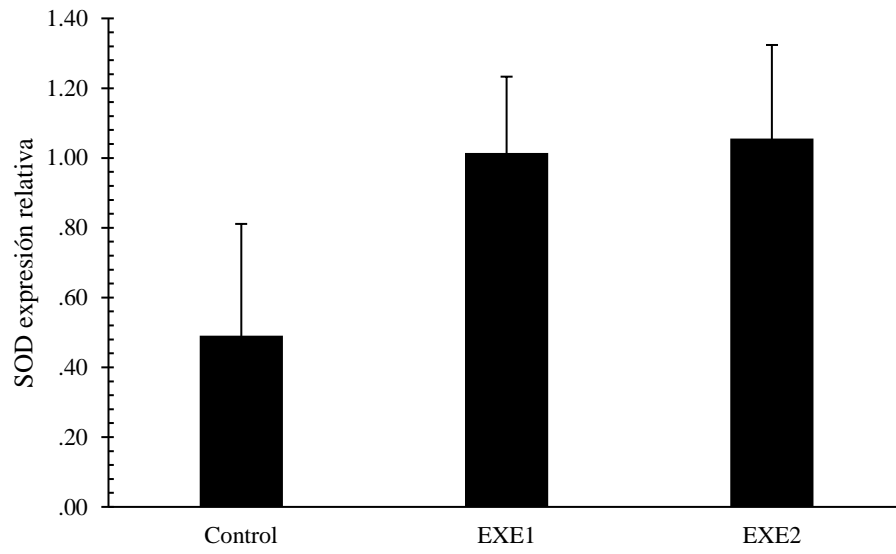


Fig. 23. Análisis de las curvas de disociación de los genes β -actina (A), SOD (B), Hemocianina (C) y ProFO (D) de *P. vannamei* por qPCR.



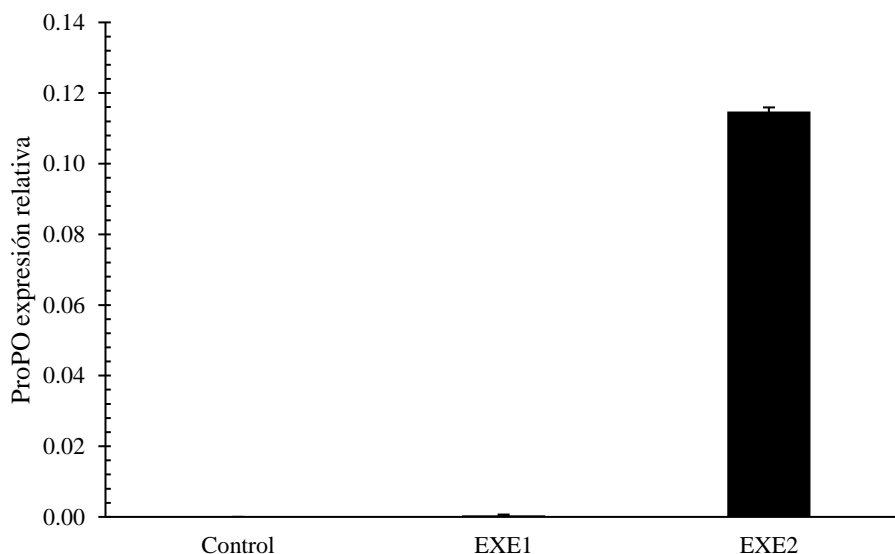


Fig. 24. Efectos del extracto de *E. arborea* en los niveles de expresión de mRNA en genes relacionas en respuesta inmune en hepatopáncreas de *P. vannamei*. Datos presentados como media \pm SD (n = 9 replicados, 3 camarones por replicado). Diferentes letras en las barras indican diferencias significativas ($\alpha < 0.05$).

8.6 Desafío bacteriano con *Vibrio parahaemolyticu*

En la fase de inmunoestimulación durante 12 días no se presentaron mortalidades en los tanques de alimentación, los cuales fueron alimentados con las dietas *ad livitum*. Se realizó el seguimiento de mortalidad y signos de los organismos presentados durante el bioensayo infeccioso, donde los cuales mostraron signos de la enfermedad notables dentro de las primeras 8 horas donde también fue registrada la primera muerte en los organismos experimentales. Como signos de la enfermedad, en las primeras 48 h de infección se observó en los camarones tubo intestinal vacío, nado errático y bajo consumo de alimento (Fig 25).



Fig. 25. Organismos muertos tomados de los acuarios experimentales en las primeras 20h del bioensayo, se observa el tracto intestinal medio vacío, melanización y hp pálido.

Al finalizar las 120h del experimento infeccioso, se tomaron organismos sobrevivientes de los acuarios de los distintos tratamientos los cuales son mostrados en la tabla 14 donde se observan daños causados por la infección bacteriana, mientras que en los organismos a los cuales no se les agregó el inóculo bacteriano presentan diferencias como en la coloración y textura del hepatopáncreas, se observa que en los órganos correspondientes a los tratamientos control y testigo infectados se notaba un hepatopáncreas mucho más claro y licuado en cambio para los organismos a los cuales se les administró la dieta con inclusión de polisacáridos o los que no fueron inoculados el hepatopáncreas presentó coloración normal y el tracto intestinal lleno.

Tabla 18. Organismos experimentales sobrevivientes y sus tractos digestivos disectados a las 120h de infección al término del bioensayo infeccioso.

C +	C -	TEST +	TEST -	EXE1 +	EXE1 -	EXE2 +	EXE2 -



Todos los camarones no desafiados sobrevivieron a las 120h, en cambio para los organismos desafiados la mortalidad se vio reflejada y separada entre los distintos tratamientos dentro de las primeras 24h y ocurriendo hasta las 48h (Ver figura 26) manteniéndose hasta el final del bioensayo (120 h). En la serie de figuras 27 se puede observar la mortalidad presentada en el transcurso de las horas del bioensayo para los distintitos tratamientos, así como los organismos muertos en cada tiempo de muestreo hasta el término del bioensayo, teniendo además una mortalidad mucho menor para los organismos que recibieron la dieta con inclusión del extracto rico en polisacáridos de *E. arborea*, en comparación con los organismos infectados que consumieron el tratamiento control y testigo.

La sobrevivencia acumulada fue del 100% para los organismos de los tratamientos no infectados. Utilizando el paquete estadístico Sigma Plot se realizó el análisis de Holm-Sidak sobre las curvas de sobrevivencia de Kaplan-Meier expresado como logaritmo de sobrevivencia mostrando diferencias significativas entre los tratamientos evaluados ($p=0.001$). El índice de sobrevivencia de los camarones alimentados con las dietas adicionadas con el extracto rico en polisacáridos de *E. arborea* a 1 y 2 g Kg⁻¹ fue significativamente mayor que los camarones que consumieron las dietas control y testigo dentro de las primeras 48h, llegando a una notable recuperación en los organismos que recibieron los alimentos con inclusión del extracto en el tiempo posterior hasta la finalización del bioensayo a las 120h, cabe destacar que no se encontraron diferencias significativas entre la sobrevivencia mostrada en los organismos desafiados a los cuales se les administraron los tratamientos con el extracto de alga en comparación de los organismos que no fueron inoculados con *Vibrio parahaemolyticus* (ver fig.27)

—○— Promedio mortalidad acumulada CONTROL (+) —○— Promedio mortalidad acumulada TEST(+)
 —△— Promedio mortalidad acumulada EXE2(+) —●— Organismos muertos CONTROL (+)
 —□— Organismos muertos EXE1(+) —◆— Organismos muertos EXE2(+)

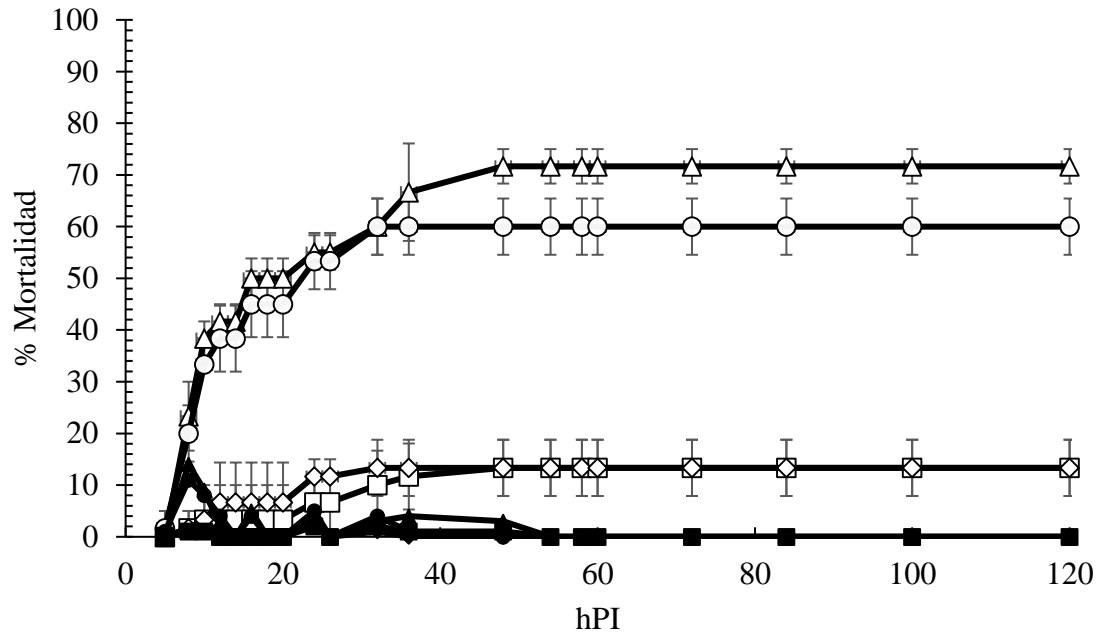
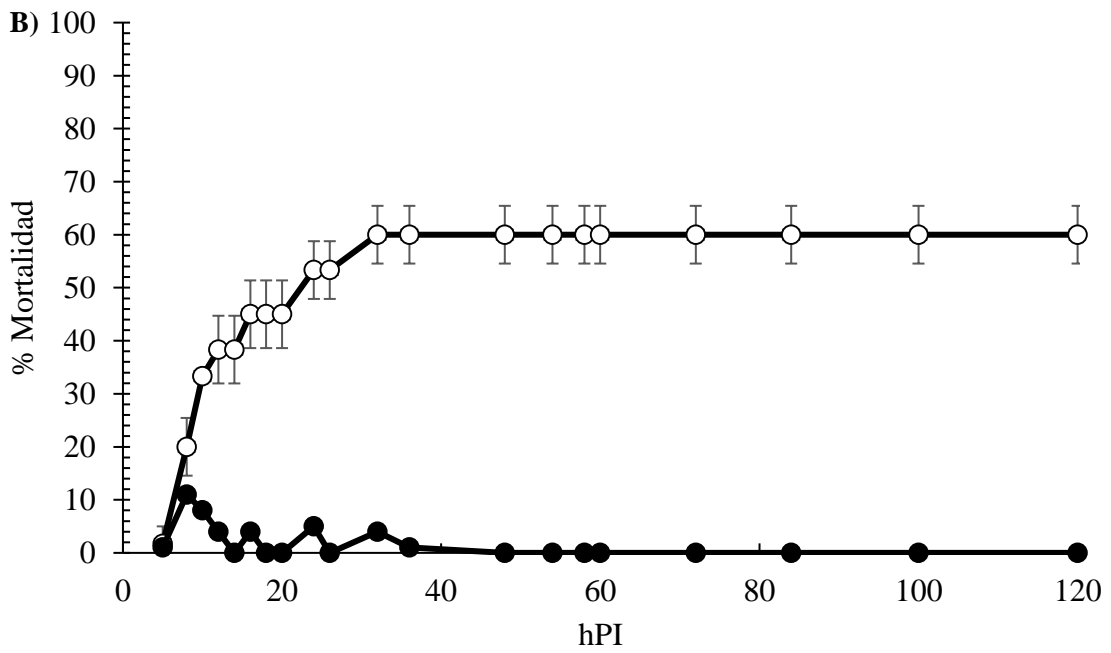
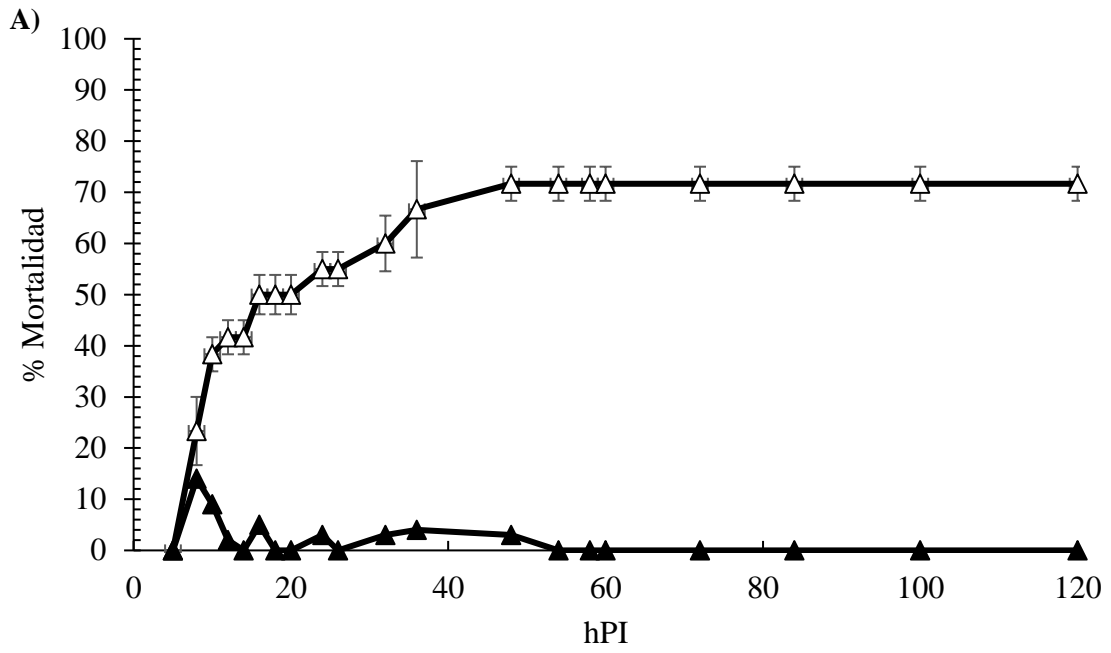


Fig. 26. Mortalidad acumulada de los camarones correspondientes a los tratamientos después del desafío con *Vibrio parahaemolyticus* número de organismos muertos se muestran en las líneas con los marcadores oscuros. Los valores son mostrados como promedio de las réplicas de acuarios \pm DE (n=4)



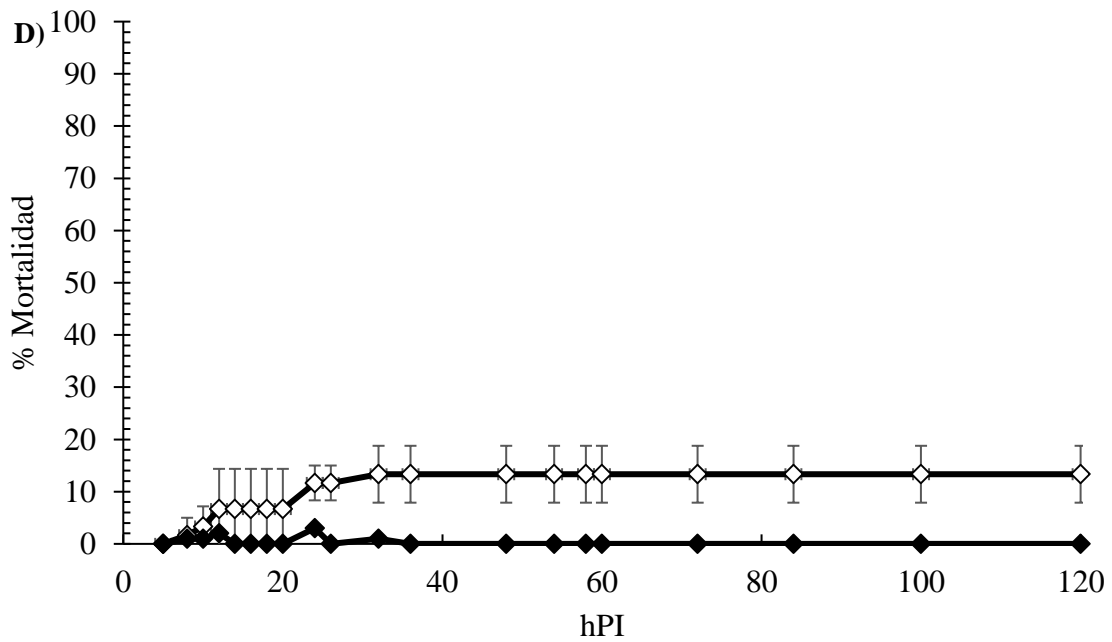
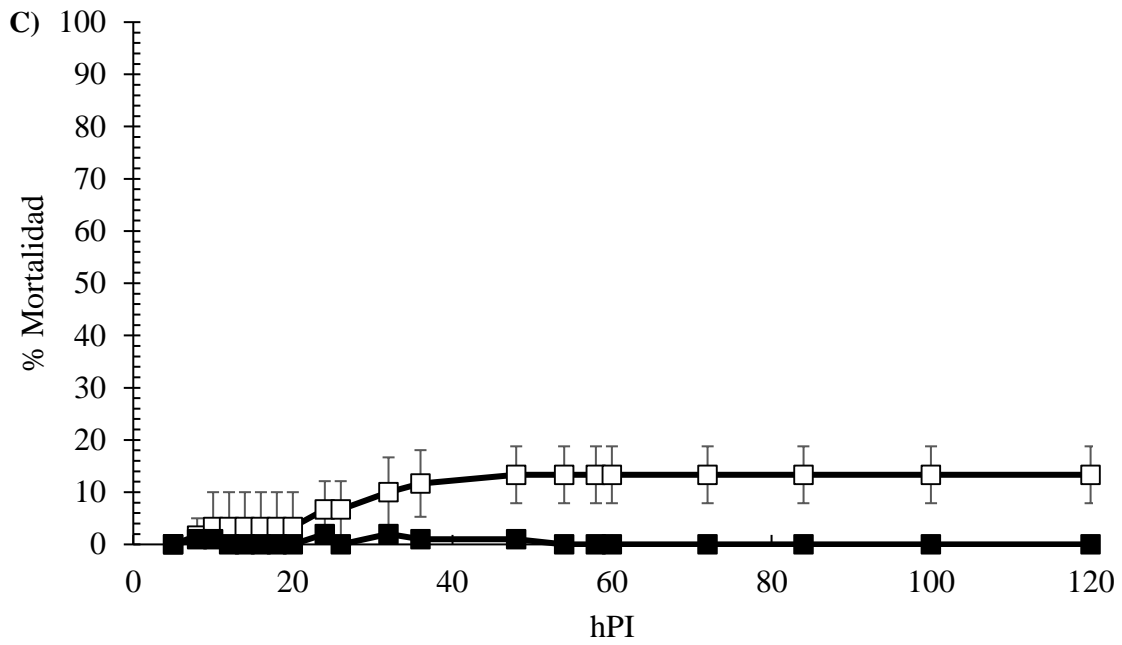


Fig. 27. Mortalidad acumulada y organismos muertos a través del tiempo correspondientes a los distintos tratamientos individuales después del desafío con *Vibrio parahaemolyticus*. Los valores son mostrados como promedio de las réplicas de acuarios \pm DE (n=4) A) Control, B) Testigo, C)

Extracto rico en polisacáridos de *E. arborea* 1 g Kg⁻¹. D) Extracto rico en polisacáridos de *E. arborea* 2 g Kg⁻¹

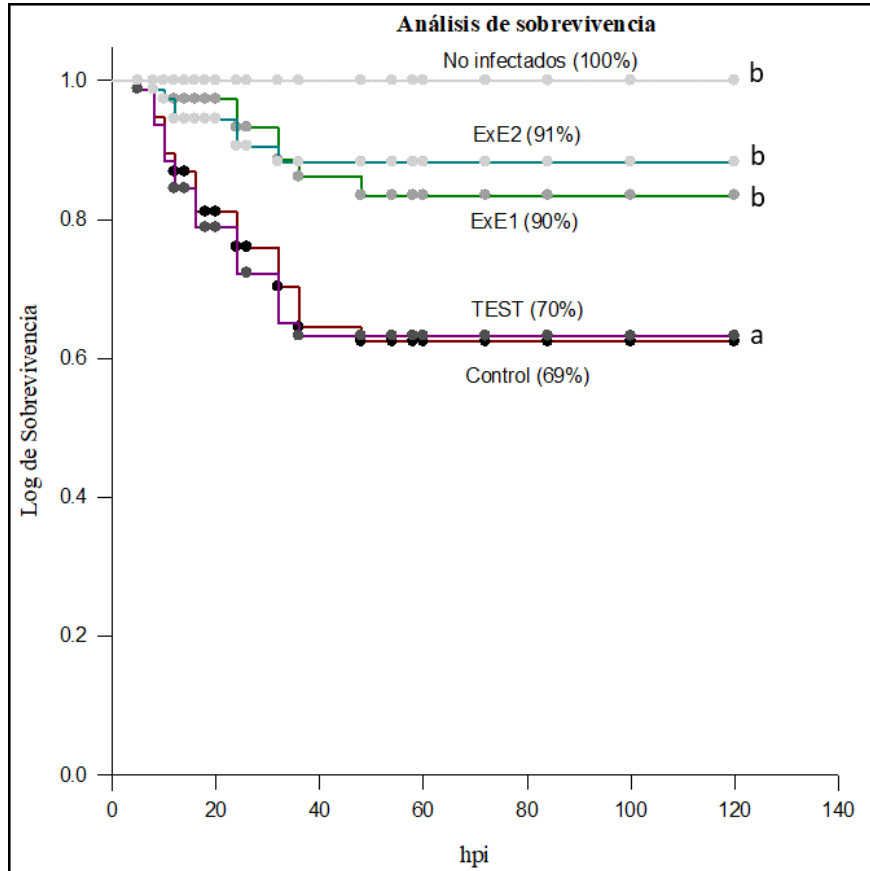


Fig. 28. Log de Supervivencia de los organismos desafiados con *V. parahaemolyticus* que recibieron las distintas dietas en el periodo de alimentación. Valores entre paréntesis indican supervivencia (%)±DE, letras distintas representan diferencias significativas estimadas por Holm Sidak ($\alpha < 0.001$).

9. Discusión

La composición química y la capacidad inmunoestimulante de las algas marinas son temas de gran interés en la investigación actual debido a su potencial aprovechamiento en la acuicultura. *Ecklonia arborea* y *Silvetia compressa* son dos especies de algas marinas que han sido objeto de estudio en este ámbito, éstas algas contienen una variedad de compuestos bioactivos, como polisacáridos, polifenoles y terpenoides, que se han relacionado con efectos antioxidantes, antiinflamatorios e inmunomoduladores. Además, se ha demostrado que estas algas tienen la capacidad de estimular la respuesta inmune, lo que las convierte en una opción de aditivo natural en la formulación de alimentación de organismos. En esta discusión, se analizarán los resultados de estudios sobre la composición química y la capacidad inmunoestimulante de las algas pardas *Ecklonia arborea* y *Silvetia compressa*.

9.1 Composición proximal de las algas

Las algas utilizadas *E. arborea* y *S. compressa* muestran composición química similar a lo reportado previamente en literatura (Black and Mitchell 1952; Hernández-Carmona et al. 2009; Peinado et al. 2014) en cuanto a la caracterización química de aminoácidos, lípidos, minerales y azúcares.

Se comparó la información obtenida por la AESCL de la Universidad de Missouri con lo encontrado en otras especies de macroalgas de los géneros de *Ecklonia* (*E. arborea* y *E. bicyclis*) (Hernández-Carmona et al. 2009; Serviere-Zaragoza et al. 2015) y *Silvetia* (*P. caniculata* y *P. wrightii*) (Gaillard et al. 2018; HK et al. 2014) donde pueden existir tanto variaciones estacionales para algunos aminoácidos como es la concentración del ácido glutámico (0.55-1.18%) y alanina (0.22-1.57%) para *E. arborea* (Hernández-Carmona et al. 2009); así como minerales como el yodo los cuales dependen de las condiciones de cultivo o algunos pigmentos (xantofila) debido al cambio de estación de colecta (HK et al. 2014). En las algas analizadas se ha encontrado un contenido alto de minerales como Ca, K, Mg comparando con lo reportado en la literatura, estos minerales cuando se encuentran presentes o en ciertas proporciones en las algas sugieren tener un gran potencial como fuente mineral que puede ser implementado en dietas para consumo animal (Cabrita et al. 2016).

Los extractos ricos en polisacáridos de las dos algas seleccionadas fueron analizados para concentración y pureza de azúcares los cuales fueron probados mediante la determinación de estallido respiratorio *in vitro* que se reporta como un buen parámetro para medir respuesta inmune (Muñoz et al. 2000), los resultados obtenidos (ver fig. 14) para los extractos de *E. arborea* y *S. compressa* con otras algas reportadas en trabajos anteriores como *Gracilaria tenuistipitata* y *Sargassum oligocystum* de las cuales se observa su capacidad para aumentar la respuesta inmune en camarón blanco (Ale, Mikkelsen, and Meyer 2011; Baleta et al. 2013; Sirirustananun et al. 2011b). demostrando de esta manera un buen potencial como inmunoestimulante cuando ha sido comparado contra un estándar como lo es el laminarán (Mohan et al. 2019).

9.2 Bioensayo nutricional

La búsqueda de alternativas naturales y sostenibles en la dieta es un tema de gran interés en la industria acuícola, *Ecklonia arborea* y *Silvetia compressa* son dos especies de algas marinas que han demostrado tener propiedades nutricionales y beneficios a organismos acuáticos. Se evaluó la efectividad de la inclusión de estas algas en dietas balanceadas para camarón blanco en términos de rendimiento y nutrición. Coincidiendo con lo establecido por Niu y colaboradores (2015), quienes realizaron bioensayos con dietas que contenían distintos niveles algas marinas (como *Undaria pinnatifida*); el nivel de inclusión al 2% dio como resultado de su caracterización: 9.27% para humedad, 40.38% en proteína cruda, 7.34% en lípidos crudos y 11.13 para cenizas. Asimismo, Casas-Valdez et al. (2006), analizó una dieta con harina *Sargassum* sp., obteniendo valores de 8.71% en humedad, 43.22% de proteína, 1.39% para fibra cruda y 9.44% de cenizas. Por lo tanto, comparando las características del análisis proximal obtenido de *E. arborea* con lo establecido en la literatura por otras algas como *Sargassum* sp. y *Undaria pinnatifida*, podemos aseverar que es correcto utilizar estas dietas para la alimentación del camarón blanco.

Para finalizar la etapa nutricional se evaluó la dieta con inclusión de 2 g Kg⁻¹ del extracto de *E. arborea* y *S. compressa* ya que la mayoría de los estudios en los que se han utilizado algas o sus extractos, los niveles de inclusión en la dieta son bajos (menos del 10%), y que en muchos casos la adición de las algas se ha traducido en una mejora de la calidad del pellet (mejor la estabilidad en el agua, la capacidad de retención de agua y la textura) (Cruz Suárez et al. 2000; Marinho-Soriano

et al. 2007) mejorando la eficiencia del alimento y mayor crecimiento en el organismo (Abdel-Rahim et al. 2021; Hafezieh et al. 2014; Izzati 2011) ya que se busca la utilización de los extractos obtenidos como inmunoestimulante oral, sin embargo el uso como potenciadores de respuesta inmune en especies acuáticas se encuentra documentado al contrario de sus efectos en el crecimiento. En el bioensayo realizado no se encontraron diferencias significativas en los parámetros de rendimiento evaluados con las dietas con inclusión de los extractos ricos en polisacáridos y la dieta control sin aditivos, sin embargo, se presenta una tendencia con los extractos a una mayor ganancia en peso una %GP similar (29.87 a 31.17), siendo ligeramente mayor para el tratamiento con ExE.; y sobrevivencia, 95% para el caso de los organismos que fueron alimentados con las dietas con inclusión de los extractos de polisacáridos de las algas pardas (ver Tabla 11) sin presentar un efecto adverso por la adición de los extractos en la dieta, datos similares a los observados han sido reportados al evaluar fucoidán extraído de *U. pinatifida* en *P. vannamei*, así como los observados con el Alginato extraído de algas pardas el cual genera una buena respuesta inmune y que además aumenta la sobrevivencia sin afectar parámetros de crecimiento en *P. vannamei* (W. Cheng, Liu, Kuo, et al. 2005) lo que indica un nivel adecuado de inmunoestimulación que no produce desgaste de los organismos (Muñoz et al., 2000). Se espera que esta información proporcione una base para el desarrollo de dietas alternativas que mejoren la eficiencia alimentaria y la sostenibilidad en la producción de camarones.

9.3 Efecto inmunoestimulante de las algas E. arborea y S. compressa en el camarón blanco P. vannamei

Los hemocitos junto al sistema de activación de la enzima de la fenoloxidasa son responsables de la coagulación, endurecimiento del exoesqueleto y eliminación de materiales extraños, siendo la principal línea de defensa inmunitaria en el camarón; al inmunoestimular al organismo con las algas cafés en la dieta e inmersión obtuvimos resultados en el conteo celular que corresponden a los órdenes que se han reportado en trabajos anteriores tanto para los organismos en contacto con y sin inmunoestimulante (T. G. Huynh et al. 2011).

En la parte experimental correspondiente al bioensayo de inmunoestimulación por inmersión los parámetros de respuesta inmune evaluados de los organismos del presente estudio se incrementaron cuando fueron expuestos al alga o sus extractos comparando con el tratamiento control.

Investigaciones previas indican que compuestos presentes en las algas pueden activar el sistema de la profenoloxidasa y que las macroalgas pardas contienen polisacáridos activos que muestran capacidad antibacteriana y que sirven como inmunoestimulantes activando los macrófagos y la cicatrización (Schleder et al. 2017).

Los resultados obtenidos del conteo tanto diferencial como total de hemocitos en los organismos con los distintos tratamientos fueron del orden de miles o millones de células ($1 \times 10^5 - 1 \times 10^6$), lo que concuerda con resultados reportados anteriormente por distintos autores (W.-Y. Hou & Chen, 2005; Sirirustananun et al., 2011) así mismo, en lo que respecta a la cuenta total de hemocitos se encontraron diferencias significativas ($\alpha \leq 0.05$) y una mayor concentración de células a tres horas y una hora de inmersión para los tratamientos con *E. arborea* y *S. compressa*, respectivamente, en ambos experimentos los valores más altos fueron para los organismos puestos en contacto con el alga en polvo en comparación con el extracto, resultados similares han sido reportados cuando los organismos son inmunoestimulados con otros compuestos y procedentes de otras algas marinas que se han reportado como buenos potenciadores de la respuesta inmune (X. Huang, Zhou, and Zhang 2006; T.-G. Huynh et al. 2011; Sudaryono, Chilmawati, and Susilowati 2018). El aumento en los hemocitos granulados y semigranulosos observado en el experimento con ambas algas es atribuido a que en ellos se encuentra la capacidad citotóxica y actividad de comunicación intercelular (Aguirre-Guzman et al. 2009), una mayor concentración en estas especies celulares puede ser explicado por estudios en los que se demuestra que las sustancias inmunoestimulantes aumentan el índice mitótico del tejido hematopoyético el cual es responsable de la formación de los hemocitos (Van De Braak et al. 2002; Sequeira, Tavares, and Arala-Chaves 1996) así mismo se ha demostrado el efecto de extractos de algas como *Gracilaria tenuistipitata* (el cual está constituido por un 38% de polisacáridos) causa el mismo efecto al incrementar el número de células mitóticas de los hemocitos en los camarones *P. vannamei* que consumieron dietas suplementadas con 0.5, 1 y 2 g Kg⁻¹ del extracto en comparación a la dieta control (Sirirustananun et al., 2011) . Además en el presente trabajo se encontraron diferencias significativas en la concentración de la fenoloxidasa total de los organismos tratados con *E. arborea* y *S. compressa* en comparación con el tratamiento control, siendo mayor para la concentración de 300 ppm de *E. arborea* y 300 ppm del extracto de *S. compressa*, estudios previos indican que compuestos presentes en algas pueden

activar el sistema de la profenoloxidasa, ya que las macroalgas pardas contienen polisacáridos activos que muestran capacidad antibacteriana además de ser eficaces como inmunoestimulantes activando los macrófagos y la cicatrización (Schleder et al. 2017), así como otros compuestos bioactivos benéficos para el sistema inmune cuando han sido evaluados (Ahn et al. 2008; Pádua et al. 2015).

Como siguiente fase de demostrar el efecto inmunoestimulante de las algas seleccionadas se evaluó la capacidad de aumentar parámetros de la respuesta inmune cuando organismos *P. vannamei* fueron alimentados con distintos niveles de inclusión de las algas pardas y sus extractos encontrando que los juveniles de camarón blanco *P. vannamei* que fueron alimentados conteniendo dietas con inclusión de las algas cafés *E. arborea* y *S. compressa* aumentaron parámetros relacionados a respuesta inmune humoral, celular y molecular de distinta manera, siendo los tratamientos con los extractos de *E. arborea* al 1 y 2 g Kg⁻¹ los que presentan un aumento significativo mayor en comparación con el tratamiento control. Dentro de los parámetros evaluados se encuentran el conteo diferencial y total de hemocitos el cual se ha documentado que un incremento en el número de hemocitos aumenta la capacidad de protección de los crustáceos durante los periodos de estrés haciéndolos más resistentes a las enfermedades (Luna-González et al. 2013), Kitikiew et al. (2013), observa que el conteo total de hemocitos de los camarones *P. vannamei* que habían sido alimentados con las dietas de fucoidán al 0.5, 1.0 y 2.0 g kg⁻¹ fueron significativamente más altos que los de los camarones alimentados con la dieta de control después de 14 y 21 días, mientras que Sirirustananun et al. (2011) indican que el conteo total de hemocitos de camarones *P. vannamei* alimentados con dietas con inclusión del alga *Gracilaria tenuistipitata* a 1.0 y 2.0 g/kg⁻¹ como inmunoestimulante, fueron significativamente más altos que los de los camarones alimentados con la dieta de control durante los días 7 a 35 de experimento. Por otro lado, Yu-Win et al. (2007) realizó un estudio donde determinó el conteo total de hemocitos (THC) y la actividad fenoloxidasa, cuando el camarón blanco *Penaeus vannamei* fue sumergido en agua de mar que contenía extracto de agua caliente del alga roja *Gelidium amansii* (0,0.5, 1.0 y 2.0 g kg⁻¹) y al alimentar a *Penaeus vannamei* durante 14 días, promovió un aumento en el conteo total de hemocitos a los 6 días con la dosis de 2.0 g kg⁻¹ y a los 14, 21 y 28 días con la dosis de 1.0 g kg⁻¹. Además de la concentración celular que puede ser modificada por la ingestión de compuestos

inmunoestimulantes como las algas que también pueden modificar la actividad de enzimas de respuesta inmune tales como la fenoloxidasa y la profenoloxidasa, las cuales son un efector importante en la defensa frente a enfermedades en el camarón originando la cascada de melanización y esclerotización (Sritunyaluksana and Soderhall 2000). Por lo tanto, medir dicha actividad en hemocitos de camarones, es un indicador para evaluar su capacidad de respuesta frente al estrés e infecciones (Hsieh, Wu, Liu, & Lian, 2013). En el presente estudio los valores que se obtienen están en el rango de los reportados por diferentes autores además que la fenoloxidasa total y libre presentan diferencias significativas entre los tratamientos en comparación con el tratamiento control, esta tendencia ha sido reportada por distintos autores al utilizar compuestos inmunoestimulantes, como Felix et al. (2004), quienes utilizaron el alga *Ulva lactuca* al recubrir dietas para *Penaeus monodon* (100, 250, 750 y 1000 mg/kg); diferencias en esta enzima ha sido reportada también respecto al tiempo donde se ha visto que la concentración de la enzima fenoloxidasa de los camarones *P. vannamei* alimentados con inmunoestimulantes añadidos a alimentos balanceados como el extracto de *Gelidium amansii* a inclusión de 0.5, 1.0 o 2.0 g/kg⁻¹ aumentando significativamente su concentración en comparación con el tratamiento control después de 9 días y hasta 28 días de bioensayo (Fu et al. 2007); mientras que al ser alimentos con las mismas dosis en dietas con inclusión de fucoidán muestran el incremento después del día 7 de inmunoestimulación oral (Kitikiew et al. 2013).

La producción de O₂ (Estallido respiratorio) se ha reportado como un método preciso para medir la efectividad de los posibles inmunoestimulantes (Muñoz et al. 2000b; Song and Hsieh 1994) en camarones peneidos. Los valores encontrados para este parámetro van de (0.18 a 0.33 DO_{620nm}). Las especies reactivas de oxígeno conocidas como ROS, tales como el anión superóxido, son producidas durante procesos de defensa como la fagocitosis como resultado de defensa frente enfermedades, sin embargo el exceso de estos reactivas pueden causar estrés oxidativo que lleva hasta el daño celular, existen enzimas que modulan el exceso en los niveles de ROS como la superóxido dismutasa y la glutatión peroxidasa, transformando el peróxido de hidrógeno a agua y oxígeno, este fenómeno es conocido como estallido respiratorio (H. H. Huang et al. 2013) En el estudio realizado se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos con inclusión con algas comparados con el tratamiento control además de presentar un aumento respecto al tiempo,

teniendo una mayor respuesta al día 9 de alimentación. cambios similares en este parámetro fueron observados por Immanuel et al. (2012), ya que la actividad de estallido respiratorio aumentó significativamente a los 10 días ($P < 0.05$) en los grupos experimentales con fucoidán al 0.1–0.3%, mientras que en el grupo control disminuyó. Asimismo, Sirirustananun et al. (2011) cuando juveniles *P. vannamei* fueron alimentados con dieta con inclusión de *Gracilaria tenuistipitata* a un nivel de inclusión 2g/Kg^{-1} teniendo un efecto de estallido respiratorio significativamente más alto en el periodo de alimentación de 7–35 días y un cambio significativo más aletargado extendiéndose hasta el día 14 de inmunoestimulación cuando los organismos son alimentados a una dosis más baja. También, Yu-Win et al. (2007) demuestra que el estallido respiratorio de *P. vannamei* que fue alimentado con dietas que contenían extracto de agua caliente de *Gelidium amansii* a 0.5, 1.0 y 2.0 g kg^{-1} fue significativamente mayor que el de los camarones que habían sido alimentados con la dieta de control después de 9, 14, 21 y 28 días.

En el presente trabajo como parte final a la inmunoestimulación oral mediante la dieta, se han encontrado diferencias en la expresión relativa de genes relacionados a la respuesta inmune normalizados con gen endógeno (β -actina) comparando los tratamientos con inclusión del extracto de *E arborea* en el alimento contra tratamiento control. Uno de los genes estudiados y que se vio modificado por la ingesta del polisacárido evaluado fue el gen de la SOD (superóxido dismutasa), este gen produce una enzima mitocondrial que emplea la hemocianina para el transporte de oxígeno, la cual se encuentra relacionada a la conversión de las especies reactivas de oxígeno durante el estallido respiratorio, de esta forma regulando la casca de reacciones del sistema profenoloxidasas (H. H. Huang et al. 2013). Estudios han demostrado un aumento de esta enzima, la cual también se observó en el presente trabajo, como lo reportado por Gómez-Anduro et al. (2006) cuando juveniles de camarón blanco fueron infectados con virus de la mancha blanca, encontrando además que los transcritos para este gen se presentan tanto en hemocitos, corazón, hepatopáncreas, intestino, sistema nervioso, músculo, pleópodos y branquias; también otros estudios arrojan resultados distintos de acuerdo al inmunoestimulante y las condiciones empleadas, teniendo resultados y comportamientos similares a los reportados por Liu et al. (2011) donde organismos experimentales de *P. vannamei* fueron alimentados con dietas con inclusión de 0.4 g Kg^{-1} de extracto de

polisacárido de *Panax ginseng*, contrario a lo observado para este gen cuando se evaluó el probiótico *L. plantarum* (Biagini et al. 1995).

Dentro de genes relacionados a la respuesta inmune del camarón y que pueden ser modificados se encuentra la hemocianina ya que esta proteína se encuentra implicada en la coagulación jugando un rol importante en el transporte de oxígeno, muda y defensa no específica (Boonchuen et al. 2018; Yao et al. 2019), comparando con otros autores, los niveles de la hemocianina pueden ser afectados después de haber sido inyectados o retados con microorganismos patógenos llegando siempre a una recuperación de los niveles pero manteniendo la presencia del gen, la hemocianina se describe como una enzima que puede además de tener la función respiratoria puede estar implicada en la defensa siendo una molécula parecida a la fenoloxidasa, por lo cual su expresión indica inmunoestimulación (Bao et al. 2020; Interaminense et al. 2019; Zhan et al. 2019).

Se ha encontrado que el gen de activación del sistema de la profenoloxidasa (ProPO) está involucrado en la producción de melanina en invertebrados y que este gen puede ser regulado positivamente cuando existe una infección gracias al reconocimiento de moléculas asociadas a patrones de patógenos (PAMPs) (H. H. Huang et al. 2013; Y. Wang et al. 2019). En este estudio la expresión del gen de la ProPO fue modificada con la ingestión de la dieta con adición del extracto rico en polisacáridos de *E. arborea*, este fenómeno ha sido reportado para otras sustancias consideradas como inmunoestimulantes como Kim y colaboradores (2014) que describen un aumento en este gen después de que los organismos fueron cultivados en biofloc, además se ha visto que el nivel transcripcional de ProPO así como la sobrevivencia de camarón blanco puede ser significativamente incrementado cuando existe una infección y fueron estos organismos inmunoestimulados por el probiótico *Lactobacillus plantarum* (Chiu, Guu, Liu, Pan, & Cheng, 2007), cabe destacar que este gen también puede ser modificado con compuestos extraídos de las algas como el fucoidán concordando con lo observado por Y. Y. Chen, Kitikiew, Yeh, & Chen (2016) quienes encontraron una regulación positiva para los niveles de transcrito del gen de la ProPO cuando los juveniles de camarón blanco fueron inyectados con el patógeno además de recibir el inmunoestimulante.

Diferencias en los distintos parámetros evaluados puede ser debido a varios factores, ya que, se sabe que la concentración de compuestos de las algas es influenciada por distintos factores tales como: la especie del alga utilizada, la estacionalidad, el lugar de colecta, así como el método de extracción realizado (Vatsos and Rebours 2015)

9.4 Resistencia a *Vibrio* en camarón blanco *P. vannamei* que ha sido inmunoestimulado con *E. arborea* mediante la dieta

Como parte final del presente trabajo se demostró la resistencia a la enfermedad causada por una cepa de *V. parahaemolyticus* cuando se ha infectado después de una fase de alimentación con dietas con inclusión del extracto rico en polisacáridos de *E. arborea*. Estudios previos reportan actividad antimicrobiana, específicamente anti *V. parahaemolyticus* AHPND+ cuando se ha utilizado extractos aislados de *E. arborea* (florotaninos como eckol y dieckol) (González-Colunga et al. 2019), esta actividad se puede comparar con los resultados del presente trabajo ya que no hay pérdida de esta actividad al tener una mayor sobrevivencia los organismos frente a la infección con *V. parahaemolyticus*, que además se presenta una diferencia significativa en ambos tratamientos (1 g Kg^{-1} y 2 g Kg^{-1}) en comparación con el tratamiento control y testigo infectados, los organismos que fueron alimentados con el extracto durante 12 días aumentaron la sobrevivencia hasta un 91%, efectos similares han sido observados con otros compuestos inmunoestimulantes extraídos de diversas fuentes naturales como el extracto de la planta *Eleutherine bulbosa* cuando se administró en distintas dosis a organismos *P. vannamei* y al ser desafiados por un periodo de 7 días, los cuales mostraron signos histopatológicos de la enfermedad y una sobrevivencia de un 71% para el mejor tratamiento cuando fueron desafiados con *V. parahaemolyticus* (Munaeni et al. 2020). Mientras que reportes donde se utilizan algas cafés como *Sargassum hemiphyllum* presentando una sobrevivencia de 85% cuando los organismos fueron desafiados contra *Vibrio alginolyticus* (T. G. Huynh et al. 2011), y comparando estudios realizados con administración de extractos de polisacáridos en dieta (fucoidán de *Sargassum wightii*) al ser retados contra *V. parahaemolyticus* Sivagnanavelmurugan et al., (2014) observan sobrevivencias de hasta un 73% con la mejor dosis del extracto, comparando estos estudios con los resultados obtenidos, incluso el extracto rico en polisacáridos de *E. arborea* a 1 y 2 Kg^{-1} provee una mayor protección a los organismos desafiados, observando además en el experimento una recuperación de los organismos, se ha demostrado

además los efectos positivos de las algas cafés y de sus extractos (Tabla 1) y a pesar de que existen pocos reportes acerca del uso e investigación del alga parda *E. arborea*, sus efectos inmunoestimulantes han sido demostrados en los otros capítulos de este trabajo, mejorando parámetros de respuesta inmune que llevan a una protección resultando a una mayor sobrevivencia cuando se ha infectado al patógeno bacteriano *V. parahaemolyticus*.

10. Conclusión

El presente estudio indica que los camarones que fueron puestos en contacto con las algas pardas *E. arborea* y *S. compressa* así como sus extractos muestran regulación positiva de parámetros de respuesta inmune evaluados como lo son el conteo total y diferencial de hemocitos así como la Fenoloxidasa libre y total aumentando esta actividad después de la hora de inmersión y manteniéndose hasta 5 horas de contacto. Los organismos experimentales alimentados con dietas adicionadas con harina de alga *Ecklonia arborea* y/o su extracto rico en polisacáridos mostraron propiedades diferentes en los parámetros de respuesta inmune celular al aumentar ya sea la cantidad de hemocitos circulantes humoral al tener diferencias significativas tanto en la Fenoloxidasa como estallido respiratorio y molecular a nivel de ARNm para genes relacionados a respuesta inmune. la administración del extracto rico de polisacáridos de *E. arborea* mediante la dieta aumenta la resistencia del camarón blanco frente a la infección contra *V. parahaemolyticus*, la prueba de desafío de los organismos demuestra que las dos dosis utilizadas (1 y 2 g Kg⁻¹) presenta una sobrevivencia de hasta un 91% al cabo de un periodo de 120h de infección con una notable recuperación

11. Bibliografía

- Abdel-Rahim, Mohamed et al. 2021. "Dietary Supplementation of Brown Seaweed and/or Nucleotides Improved Shrimp Performance, Health Status and Cold-Tolerant Gene Expression of Juvenile Whiteleg Shrimp during the Winter Season." *Marine drugs* 19(3). <https://doi.org/10.3390/md19030175>.
- Abu Zinadah, Osama A H et al. 2013. "Evaluation of the Anti-Genotoxicity and Growth Performance Impacts of Green Algae on Mugil Cephalus." *Life Science Journal* 10(3): 1543–54.
- AftabUddin, Sheikh et al. 2021. "Effects of Seaweeds Extract on Growth, Survival, Antibacterial Activities, and Immune Responses of Penaeus Monodon against Vibrio Parahaemolyticus." *Italian Journal of Animal Science* 20(1): 243–55. <https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=tjas20>.
- Agarwal, Pranay et al. 2021. "Antioxidant and Antibacterial Activity of Gelidium Pusillum (Stackhouse) against Aeromonas Caviae and Its Applications in Aquaculture." *Aquaculture International* 29(2): 845–58. <https://doi.org/10.1007/s10499-021-00661-1>.

- Aguirre-Guzman, Gabriel et al. 2009. "Penaeid Shrimp Immune System." *Thai J. Vet. Med* 39(3): 205–15.
- Aguirre-Guzmán, Gabriel, Denis Ricque-Marie, and L. Elizabeth Cruz-Suárez. 2002. "Survival of Agglomerated *Saccharomyces Cerevisiae* in Pelleted Shrimp Feeds." *Aquaculture*.
- Aguirre-Guzmán, Gabriel, Humberto Mejia Ruíz, and Felipe Ascencio. 2004. "A Review of Extracellular Virulence Product of *Vibrio* Species Important in Diseases of Cultivated Shrimp." *Aquaculture Research* 35(15): 1395–1404.
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-2109.2004.01165.x>
 (December 2, 2020).
- Ahn, Ginnae et al. 2008. "Immunomodulatory Effects of an Enzymatic Extract from *Ecklonia Cava* on Murine Splenocytes." *Marine Biotechnology* 10(3): 278–89.
<http://link.springer.com/10.1007/s10126-007-9062-9> (August 2, 2019).
- Ale, Marcel Tutor, Jørn D. Mikkelsen, and Anne S. Meyer. 2011. "Important Determinants for Fucoidan Bioactivity: A Critical Review of Structure-Function Relations and Extraction Methods for Fucose-Containing Sulfated Polysaccharides from Brown Seaweeds." *Marine Drugs* 9(10): 2106–30.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22073012> (August 13, 2019).
- Anaya-Rosas, Ricardo Ernesto et al. 2019. "Effects of a Co-Culture of Marine Algae and Shrimp (*Penaeus Vannamei*) on the Growth, Survival and Immune Response of Shrimp Infected with *Vibrio Parahaemolyticus* and White Spot Virus (WSSV)." *Fish and Shellfish Immunology* 87(2019): 136–43.
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.12.071>.
- Andrianti, Dian Noperta, Amira Baihani, and Inspection Agency. 2022. "The Effectiveness of White Turmeric Extract (*Curcuma Zedoaria*) against the Immune System of *Vannamei* Shrimp (*Penaeus Vannamei*)." *Journal of Fish Health* 2(June): 14–23.
- Bala, Esha, Siddhartha Singha, and Sanjukta Patra. 2019. "Polysaccharides from Leafy Vegetables." In *Natural Polysaccharides in Drug Delivery and Biomedical Applications*, Academic Press, 567–88.
- Baleta, Francis Nuestro et al. 2013. "Efficacy of *Sargassum Oligocystum* Extract on the Innate Immunity of White Shrimp *Penaeus Vannamei* and Its Resistance Against *Vibrio Alginolyticus*." *Journal of Fish Society Taiwan* 40(4).
https://www.researchgate.net/publication/288100898_Efficacy_of_Sargassum_oligocystum_Extract_on_the_Innate_Immunity_of_White_Shrimp_Penaeus_vannamei_and_Its_Resistance_Against_Vibrio_alginolyticus (November 6, 2019).
- Black, W. A.P., and R L Mitchell. 1952. "Trace Elements in the Common Brown Algae and in Sea Water." *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 30(3): 575–84.
<https://pdfs.semanticscholar.org/fed0/0fb2d6ce8b903bfb6d5ced591620414f9590.pdf>
 f (July 31, 2019).

- Van De Braak, C. B.T. et al. 2002. “The Roles of Haemocytes and the Lymphoid Organ in the Clearance of Injected *Vibrio* Bacteria in *Penaeus Monodon* Shrimp.” *Fish and Shellfish Immunology* 13(4): 293–309.
- Cabrita, Ana R.J. et al. 2016. “Tracing Seaweeds as Mineral Sources for Farm-Animals.” *Journal of Applied Phycology* 28(5): 3135–50.
<https://link.springer.com/article/10.1007/s10811-016-0839-y> (October 28, 2021).
- Campa-Córdova, A. I., N. Y. Hernández-Saavedra, R. De Philippis, and F. Ascencio. 2002. “Generation of Superoxide Anion and SOD Activity in Haemocytes and Muscle of American White Shrimp (*Penaeus Vannamei*) as a Response to β -Glucan and Sulphated Polysaccharide.” *Fish and Shellfish Immunology* 12(4): 353–66.
- Casas-Valdez, Margarita et al. 2006. “Efecto Del Alga Marina *Sargassum* Spp. Sobre Las Variables Productivas y La Concentración de Colesterol En El Camarón Café, *Farfantepenaeus Californiensis* (Holmes, 1900).” *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 41(1): 97–105.
- Castillo-Juárez, Héctor, Gabriel R. Campos-Montes, Alejandra Caballero-Zamora, and Hugo H. Montaldo. 2015. “Genetic Improvement of Pacific White Shrimp (*Penaeus* (*Penaeus*)*Vannamei*): Perspectives for Genomic Selection.” *Frontiers in Genetics* 5(FEB): 93.
- Cerenius, Lage, Bok Luel Lee, and Kenneth Söderhäll. 2008. “The ProPO-System: Pros and Cons for Its Role in Invertebrate Immunity.” *Trends in Immunology* 29(6): 263–71.
- Chase, Chris. 2022. “Global Shrimp Production to Surpass 5 Million MT in 2022, CP Foods’ Robin McIntosh Predicts | SeafoodSource.” *SeafoodSource*.
<https://www.seafoodsource.com/news/supply-trade/expert-predicts-global-shrimp-production-will-exceed-5-million-metric-tons-for-first-time-in-2022> (July 27, 2022).
- Cheng, Sha-Yen, and Jiann-Chu Chen. 2002. “Study on the Oxyhemocyanin, Deoxyhemocyanin, Oxygen Affinity and Acid–Base Balance of *Marsupenaeus Japonicus* Following Exposure to Combined Elevated Nitrite and Nitrate.” *Aquatic Toxicology* 61: 181–93.
- Cheng, Winton, Chun Hung Liu, Ching Ming Kuo, and Jiann Chu Chen. 2005. “Dietary Administration of Sodium Alginate Enhances the Immune Ability of White Shrimp *Penaeus Vannamei* and Its Resistance against *Vibrio Alginolyticus*.” *Fish and Shellfish Immunology* 18(1): 1–12.
- Cheng, Winton, Chun Hung Liu, Chiung Hui Tsai, and Jiann Chu Chen. 2005. “Molecular Cloning and Characterisation of a Pattern Recognition Molecule, Lipopolysaccharide- and β -1,3-Glucan Binding Protein (LGBP) from the White Shrimp *Penaeus Vannamei*.” *Fish and Shellfish Immunology* 18(4): 297–310.
- Ching, Carlos. 2019. “Understanding Shrimp Hemocytes - Responsible Seafood Advocate.” <https://www.globalseafood.org/advocate/understanding-shrimp-hemocytes/> (November 4, 2021).

- Chojnacka, Katarzyna. 2012. “Biologically Active Compounds in Seaweed Extracts - the Prospects for the Application.” *The Open Conference Proceedings Journal* 3(1): 20–28.
- Cruz-Suárez, L Elizabeth et al. 2008. “A Review of the Effects of Macroalgae in Shrimp Feeds and in Co-Culture.” In *Avances En Nutrición Acuícola IX. IX Simposio Internacional de Nutrición Acuícola*,.
- Cruz-Suárez, LE, and D Ricque-Marie. 2000. “Uso de Harina de Kelp (Macrocystis Pyrifera) En Alimentos Para Camarón.” *Nutrición Acuícola V ...*: 227–66.
https://sci-hub.io/http://universidad.uanl.mx/utilerias/nutricion_acuicola/V/archivos/cruz-suarez.pdf.
- Cruz Suárez, L Elizabeth, Denis Ricque Marie, Mireya Tapia Salazar, and Claudio Guajardo-Barbosa. 2000. “Uso de Harina de Kelp (Macrocystis Pyrifera) En Alimentos Para Camarón.” In *Avances En Nutrición Acuícola V. Memorias Del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*, , 227–66.
<http://www.nutricionacuicola.uanl.mx/numeros/5/cruz-suarez.pdf>
- Ding, Yanjun, Luqing Pan, Guorui Gao, and Hui Huang. 2020. “In Vitro and in Vivo Immunologic Potentiation of Herb Extracts on Shrimp (*Penaeus Vannamei*).” *Fish and Shellfish Immunology* 107(PB): 556–66.
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.11.003>.
- Van Doan, Hien et al. 2018. “Effects of Corncob Derived Xylooligosaccharide on Innate Immune Response, Disease Resistance, and Growth Performance in Nile Tilapia (*Oreochromis Niloticus*) Fingerlings.” *Aquaculture* 495: 786–93.
- . 2019. “Mushrooms, Seaweed, and Their Derivatives as Functional Feed Additives for Aquaculture: An Updated View.” In *Studies in Natural Products Chemistry*, Elsevier B.V., 41–90.
- Duan, Yafei et al. 2020. “Response of Intestine Microbiota, Digestion, and Immunity in Pacific White Shrimp *Penaeus Vannamei* to Dietary Succinate.” *Aquaculture* 517: 734762.
- El-Saadony, Mohamed T. et al. 2022. 144 Research in Veterinary Science *Shrimp Production, the Most Important Diseases That Threaten It, and the Role of Probiotics in Confronting These Diseases: A Review*.
- Elizondo-Reyna, Edith et al. 2016. “Consumption of *Ulva Clathrata* as a Dietary Supplement Stimulates Immune and Lipid Metabolism Genes in Pacific White Shrimp *Penaeus Vannamei*.” *Journal of Applied Phycology* 28(6): 3667–77.
<http://dx.doi.org/10.1007/s10811-016-0889-1>.
- F.A.O. 2017. “GLOBEFISH - Análisis e Información Comercial En Pesquerías.Pdf.” *11/04/2017*: 3 pages.
- Fletcher, Rob. 2021. “Global Shrimp Production Sees Significant Growth in 2021 | The Fish Site.” *The Fish site*: 617308. <https://thefishsite.com/articles/global-shrimp->

- production-sees-significant-growth-in-2021-gorjan-nikolik-rabobank (July 27, 2022).
- Gaillard, Charlotte et al. 2018. “Amino Acid Profiles of Nine Seaweed Species and Their in Situ Degradability in Dairy Cows.” *Animal Feed Science and Technology* 241: 210–22.
- Ghaednia, B et al. 2011. “Effect of Hot-Water Extract of Brown Seaweed *Sargassum Glaucescens* via Immersion Route on Immune Responses of *Fenneropenaeus Indicus*.” *Iranian Journal of Fisheries Sciences* *Iranian Journal of Fisheries Sciences* 10(4): 616–30.
- Gollas-Galván, Teresa et al. 2003. “Purification and Characterization of A2-Macroglobulin from the White Shrimp (*Penaeus Vannamei*).” *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology* 134(4): 431–38.
- Gomez-Gil, B., Ana Roque, and guerra. 2001. “Enfermedades Infecciosas Más Comunes En La Camaronicultura En México y El Impacto Del Uso de Antimicrobianos.” *Camaronicultura y Medio Ambiente*.
https://books.google.com.mx/books?id=_OBjAAAAMAAJ (February 8, 2022).
- Gómez-Gil, Bruno, Ana Roque, and Ana L. Guerra-Flores. 2001. “Enfermedades Infecciosas Más Comunes En La Camaronicultura En México y El Impacto Del Uso de Antimicrobianos.” *Camaronicultura y Medio Ambiente* 14: 315–46.
- González-Colunga, Denisse, Marilena Antunes-Ricardo, Janet A. Gutiérrez-Uribe, and Lucía Elizabeth Cruz-Suárez. 2019. “Bioactivity-Guided Identification of Anti-AHPND (Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease) Metabolites of *Ecklonia Arborea*.” *Journal of Applied Phycology* 31(5): 3189–99.
<http://link.springer.com/10.1007/s10811-019-01818-5> (August 13, 2019).
- Gupta, Shilpi, and Nissreen Abu-Ghannam. 2011. “Bioactive Potential and Possible Health Effects of Edible Brown Seaweeds.” *Trends in Food Science and Technology* 22(6): 315–26.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224411000616> (August 13, 2019).
- Hafezieh, M., D. Adjari, A. Ajdehakosh Por, and S. H. Hosseini. 2014. “Using Oman Sea *Sargassum Illicifolium* Meal for Feeding White Leg Shrimp *Penaeus Vannamei*.” *Iranian Journal of Fisheries Sciences* 13(1): 73–80.
- Han, Jee Eun, Kathy F.J. Tang, and Donald V. Lightner. 2015. “Genotyping of Virulence Plasmid from *Vibrio Parahaemolyticus* Isolates Causing Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease in Shrimp.” *Diseases of Aquatic Organisms* 115(3): 245–51.
- Hernández-Carmona, Gustavo et al. 2009. “Monthly Variation in the Chemical Composition of *Eisenia Arborea* J.E. Areschoug.” *Journal of Applied Phycology* 21(5): 607–16. <http://link.springer.com/10.1007/s10811-009-9454-5> (July 31, 2019).

- Hernández-López, Jorge, Teresa Gollas-Galván, and Francisco Vargas-Albores. 1996. "Activation of the Prophenoloxidase System of the Brown Shrimp (*Penaeus Californiensis* Holmes)." *Comparative Biochemistry and Physiology - C Pharmacology Toxicology and Endocrinology* 113(1): 61–66.
- HK, Maehre, Malde MK, Eilertsen KE, and Elvevoll EO. 2014. "Characterization of Protein, Lipid and Mineral Contents in Common Norwegian Seaweeds and Evaluation of Their Potential as Food and Feed." *Journal of the science of food and agriculture* 94(15): 3281–90. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24700148/> (October 27, 2021).
- Hou, Wen Ying, and Jiann Chu Chen. 2005. "The Immunostimulatory Effect of Hot-Water Extract of *Gracilaria tenuistipitata* on the White Shrimp *Penaeus Vannamei* and Its Resistance against *Vibrio Alginolyticus*." *Fish and Shellfish Immunology* 19(2): 127–38.
- Huang, Hai Hong, Xiao Lin Liu, Jian Hai Xiang, and Ping Wang. 2013. "Immune Response of *Penaeus Vannamei* after Infection with *Vibrio Harveyi*." *Aquaculture* 406–407: 115–20.
- Huang, Xuxiong, Hongqi Zhou, and Hui Zhang. 2006. "The Effect of Sargassum Fusiforme Polysaccharide Extracts on Vibriosis Resistance and Immune Activity of the Shrimp, *Fenneropenaeus Chinensis*." *Fish and Shellfish Immunology* 20(5): 750–57. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1050464805001750> (August 30, 2019).
- Huynh, Truong-Giang et al. 2011. "White Shrimp *Penaeus Vannamei* Immersed in Seawater Containing Sargassum Hemiphyllum Var. Chinense Powder and Its Extract Showed Increased Immunity and Resistance against *Vibrio Alginolyticus* and White Spot Syndrome Virus." *Fish & shellfish immunology* 31: 286–93.
- Huynh, Truong Giang et al. 2011. "White Shrimp *Penaeus Vannamei* Immersed in Seawater Containing Sargassum Hemiphyllum Var. Chinense Powder and Its Extract Showed Increased Immunity and Resistance against *Vibrio Alginolyticus* and White Spot Syndrome Virus." *Fish and Shellfish Immunology* 31(2): 286–93. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1050464811001884> (August 13, 2019).
- Immanuel, Grasian et al. 2012. "The Effect of Fucoidan from Brown Seaweed Sargassum Wightii on WSSV Resistance and Immune Activity in Shrimp *Penaeus Monodon* (Fab)." *Fish and Shellfish Immunology* 32(4): 551–64.
- Izzati, Munifatul. 2011. "The Role of Seaweeds Sargassum Polycystum and *Gracilaria Verrucosa* on Growth Performance and Biomass Production of Tiger Shrimp (*Penaeus Monodon* Fabr)." *Journal of Coastal Development* 14(3): 235–41. <https://ejournal.undip.ac.id/index.php/coastdev/article/view/2107> (November 14, 2021).
- Kilawati, Yuni, Sulastri Arsad, Radharyan Islamy, and Siti Jumroati Solekah. 2021. "Immunostimulant from Marine Algae to Increase Performance of Vanamei Shrimp

- (*Littopenaeus Vannamei*).” *Journal of Aquatic Biology & Fisheries* 5(6): 1–10.
- Klongklaew, Nawanith, Jantana Praiboon, Montakan Tamtin, and Prapansak Srisapoom. 2021. “Chemical Composition of a Hot Water Crude Extract (HWCE) from *Ulva Intestinalis* and Its Potential Effects on Growth Performance, Immune Responses, and Resistance to White Spot Syndrome Virus and Yellowhead Virus in Pacific White Shrimp (*Penaeus Vannam*.” *Fish and Shellfish Immunology* 112: 8–22. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2021.02.004>.
- Kulkarni, Amod et al. 2021. “Immune Responses and Immunoprotection in Crustaceans with Special Reference to Shrimp.” *Reviews in Aquaculture* 13(1): 431–59.
- Kumar, Santosh, Arunima Kumar Verma, Shivesh Pratap Singh, and Abhishek Awasthi. 2022. 1 Environmental Science and Pollution Research *Immunostimulants for Shrimp Aquaculture: Paving Pathway towards Shrimp Sustainability*. Springer. <https://link.springer.com/article/10.1007/s11356-021-18433-y> (May 13, 2022).
- Lee, Po Tsang, Meng Chou Lee, et al. 2020. “Polysaccharides from the Green Alga *Caulerpa Racemosa* (Agardh, 1873) Improve the Immune Response and Antioxidant Status in the White Shrimp *Penaeus Vannamei* (Boone, 1931) (Dendrobranchiata, Penaeidae).” *Crustaceana* 93(6): 611–32.
- Lee, Po Tsang, Hoang Trieu Quan Tran, et al. 2020. “Sargassum *Horneri* Extracts Stimulate Innate Immunity, Enhance Growth Performance, and Upregulate Immune Genes in the White Shrimp *Penaeus Vannamei*.” *Fish and Shellfish Immunology* 102(April): 276–85. <https://sci-hub.tw/https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.04.049> (August 5, 2020).
- Li, Fuhua, and Jianhai Xiang. 2013. “Signaling Pathways Regulating Innate Immune Responses in Shrimp.” *Fish and Shellfish Immunology* 34(4): 973–80. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2012.08.023>.
- Liu, Chun Hung, Winton Cheng, Jung Ping Hsu, and Jiann Chu Chen. 2004. “*Vibrio Alginolyticus* Infection in the White Shrimp *Penaeus Vannamei* Confirmed by Polymerase Chain Reaction and 16S rDNA Sequencing.” *Diseases of Aquatic Organisms* 61(1–2): 169–74.
- Liu, Shan et al. 2020. “Hemocyte-Mediated Phagocytosis in Crustaceans.” *Frontiers in Immunology* 11: 268. www.frontiersin.org.
- Liu, Wen Chao et al. 2020. “Dietary Seaweed (Enteromorpha) Polysaccharides Improves Growth Performance Involved in Regulation of Immune Responses, Intestinal Morphology and Microbial Community in Banana Shrimp *Fenneropenaeus Merguensis*.” *Fish and Shellfish Immunology* 104(May): 202–12. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.05.079> (May 16, 2022).
- Livak, K J, and T D Schmittgen. 2001. “Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method.” *Methods (San Diego, Calif.)* 25(4): 402–8.
- Maftuch et al. 2013. “Improvement of Innate Immune Responses and Defense Activity

- in Tiger Shrimp (*Penaeus Monodon* Fab.) by Intramuscular Administration of the Outer Membrane Protein *Vibrio Alginolyticus*.” *SpringerPlus* 2: 432.
- Marinho-Soriano, Eliane, Marcos Rogério Camara, Thiago De Melo Cabral, and Marcella Araújo Do Amaral Carneiro. 2007. “Preliminary Evaluation of the Seaweed *Gracilaria Cervicornis* (Rhodophyta) as a Partial Substitute for the Industrial Feeds Used in Shrimp (*Penaeus Vannamei*) Farming.” *Aquaculture Research* 38(2): 182–87.
- Mohan, Kannan et al. 2019. “Application of Marine-Derived Polysaccharides as Immunostimulants in Aquaculture: A Review of Current Knowledge and Further Perspectives.” *Fish and Shellfish Immunology* 86(December 2018): 1177–93. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.12.072>.
- Montero-Rodríguez, M. 2022. “Fisheries and Aquaculture - National Aquaculture Sector Overview - México.” *FAO*. <https://www.fao.org/fishery/en/countrysector/mx/es?lang=es> (August 2, 2022).
- Morales-Covarrubias, María Soledad et al. 2011. “Prevalencia de Enfermedades de Camarón Blanco (*Penaeus Vannamei*) Cultivado En Ocho Regiones de Latinoamérica.” *Revista Científica de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad del Zulia* 21(5): 434–46.
- Mulyadi, Mulyadi et al. 2020. “Efficacy of Seaweed (*Sargassum* Sp.) Extract to Prevent Vibriosis in White Shrimp (*Penaeus Vannamei*) Juvenile.” *International Journal of Zoological Research* 16(1): 1–11.
- Munaeni, Waode et al. 2020. “Effect in White Shrimp *Penaeus Vannamei* of Eleutherine Bulbosa (Mill.) Urb. Powder on Immune Genes Expression and Resistance against *Vibrio Parahaemolyticus* Infection.” *Fish and Shellfish Immunology* 102(April): 218–27. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.03.066> (May 16, 2022).
- Muñoz, Marcelo et al. 2000. “Measurement of Reactive Oxygen Intermediate Production in Haemocytes of the Penaeid Shrimp, *Penaeus Vannamei*.” *Aquaculture* 191(1–3): 89–107.
- Niu, Jin et al. 2015. “Effects of Different Levels of Dietary Wakame (*Undaria Pinnatifida*) on Growth, Immunity and Intestinal Structure of Juvenile *Penaeus Monodon*.” *Aquaculture* 435: 78–85. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.08.013> (September 5, 2017).
- Nunan, Linda, Donald Lightner, Carlos Pantoja, and Silvia Gomez-Jimenez. 2014. “Detection of Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) in Mexico.” *Diseases of Aquatic Organisms* 111(1): 81–86.
- Nur, Indriyani et al. 2020. “Assessment of Antibacterial and Immunostimulating Activity of Black Cumin (*Nigella Sativa*) Extract against Vibriosis in White Shrimp (*Penaeus Vannamei*).” *Thai Journal of Veterinary Medicine* 50(4): 549–57.
- Ojerio, Vianney T. et al. 2018. “Alginic Acid as Immunostimulant: Effects of Dose and Frequency on Growth Performance, Immune Responses, and White Spot Syndrome

- Virus Resistance in Tiger Shrimp *Penaeus Monodon* (Fabricius, 1798).” *Aquaculture International* 26(1): 267–78.
<https://link.springer.com/article/10.1007/s10499-017-0212-4> (August 9, 2022).
- Pádua, D., E. Rocha, D. Gargiulo, and A. A. Ramos. 2015. “Bioactive Compounds from Brown Seaweeds: Phloroglucinol, Fucoxanthin and Fucoidan as Promising Therapeutic Agents against Breast Cancer.” *Phytochemistry Letters* 14: 91–98.
- Pan, Tingshuang, and Maocang Yan. 2020. “The Screening of Traditional Chinese Herbs on Nonspecific Immune Response and Protection of Pacific White Shrimp (*Penaeus Vannamei*) from *Vibrio Harveyi* Infection.” *Aquaculture International* 28(2): 767–76. <https://doi.org/10.1007/s10499-019-00493-0> (August 3, 2020).
- Pascual, Cristina et al. 2006. “Biochemical, Physiological, and Immunological Changes during Starvation in Juveniles of *Penaeus Vannamei*.” *Aquaculture* 251(2–4): 416–29. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0044848605003790> (October 28, 2021).
- Peinado, I., J. Girón, G. Koutsidis, and J.M. Ames. 2014. “Chemical Composition, Antioxidant Activity and Sensory Evaluation of Five Different Species of Brown Edible Seaweeds.” *Food Research International* 66: 36–44.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996914005730> (July 31, 2019).
- Pesca con Ciencia. 2019. “La Industria Pesquera Genera Más de 300 Mil Empleos En México.” *Industria pesquera*. <https://www.pescaconciencia.com/2019/08/11/la-industria-pesquera-genera-mas-de-300-mil-empleos-en-mexico/> (August 2, 2022).
- Rivas-Vega, M. E. et al. 2006. “Nutritional Value of Cowpea (*Vigna Unguiculata* L. Walp) Meals as Ingredients in Diets for Pacific White Shrimp (*Penaeus Vannamei* Boone).” *Food Chemistry*.
- Robalino, Javier et al. 2009. “Contributions of Functional Genomics and Proteomics to the Study of Immune Responses in the Pacific White Leg Shrimp *Penaeus Vannamei*.” *Veterinary Immunology and Immunopathology* 128(1–3): 110–18.
- Romo-Quiñonez, Carlos R. et al. 2020. “Evaluation of a New Argovit as an Antiviral Agent Included in Feed to Protect the Shrimp *Penaeus Vannamei* against White Spot Syndrome Virus Infection.” *PeerJ* 2020(2): e8446.
<http://doi.org/10.7717/peerj.8446> (July 30, 2020).
- Sakthivel, M. et al. 2015. “Immunostimulatory Effects of Polysaccharide Compound from Seaweed *Kappaphycus Alvarezii* on Asian Seabass (*Lates Calcarifer*) and Its Resistance against *Vibrio Parahaemolyticus*.” *Journal of Marine Biology & Oceanography* 04(02).
- Salehpour, Razieh et al. 2021. “The Dietary Effect of Fucoidan Extracted from Brown Seaweed, *Cystoseira Trinodis* (C. Agardh) on Growth and Disease Resistance to WSSV in Shrimp *Penaeus Vannamei*.” *Fish and Shellfish Immunology* 119(September): 84–95. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2021.09.005>.

- Schleder, Delano Dias et al. 2017. “Brown Seaweeds as Feed Additive for White-Leg Shrimp: Effects on Thermal Stress Resistance, Midgut Microbiology, and Immunology.” In *Journal of Applied Phycology*, Springer, 2471–77.
<http://link.springer.com/10.1007/s10811-017-1129-z> (July 23, 2019).
- Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. 2020. “Producción de Camarón Crece Para Alimentar a México.”
<http://divulgacionacuicola.com.mx/blog/2020/12/15/produccion-de-camaron-crece-para-alimentar-a-mexico/> (August 2, 2022).
- Selvin, Joseph, A.J. J. Huxley, and A.P. P. Lipton. 2004. “Immunomodulatory Potential of Marine Secondary Metabolites against Bacterial Diseases of Shrimp.” *Aquaculture* 230(1–4): 241–48.
- Sequeira, Teresa, Delfina Tavares, and Mário Arala-Chaves. 1996. “Evidence for Circulating Hemocyte Proliferation in the Shrimp *Penaeus Japonicus*.” *Developmental and Comparative Immunology* 20(2): 97–104.
- Serviere-Zaragoza, Elisa et al. 2015. “Seasonal and Interannual Variation of Fatty Acids in Macrophytes from the Pacific Coast of Baja California Peninsula (Mexico).” *Journal of Applied Phycology* 27(3): 1297–1306.
<http://link.springer.com/10.1007/s10811-014-0415-2> (July 31, 2019).
- Setyawan, Agus et al. 2018. “Comparative Immune Response of Dietary Fucoïdan from Three Indonesian Brown Algae in White Shrimp *Penaeus Vannamei*.” *AACL Bioflux* 11(6): 1707–23.
- Shefat, Shoaibe Hossain Talukder. 2018. “Use of Probiotics in Shrimp Aquaculture in Bangladesh.” *Acta Scientific Microbiology* 1(11): 20–27.
<https://actascientific.com/ASMI/pdf/ASMI-01-0126.pdf>.
- Sinurat, Ellya, Endang Saepudin, Rosmawaty Peranginangin, and Sumi Hudiyono. 2016. “Immunostimulatory Activity of Brown Seaweed-Derived Fucoïdins at Different Molecular Weights and Purity Levels towards White Spot Syndrome Virus (WSSV) in Shrimp *Penaeus Vannamei*.” *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 6(10): 082–091.
- Sirirustananun, Nuttarin et al. 2011a. “Dietary Administration of a *Gracilaria Tenuistipitata* Extract Enhances the Immune Response and Resistance against *Vibrio Alginolyticus* and White Spot Syndrome Virus in the White Shrimp *Penaeus Vannamei*.” *Fish and Shellfish Immunology* 31(6): 848–55.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1050464811002907> (August 9, 2019).
- . 2011b. “Dietary Administration of a *Gracilaria Tenuistipitata* Extract Enhances the Immune Response and Resistance against *Vibrio Alginolyticus* and White Spot Syndrome Virus in the White Shrimp *Penaeus Vannamei*.” *Fish and Shellfish Immunology* 31(6): 848–55.
<https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S1050464811002907?token=2BF870E0A3FD242B674FD19088573EF22D288A516A87E9CE7778F057C65890429F3F9169>

88C2F986910319159DEAB471 (August 9, 2019).

- Sivagnanavelmurugan, Madasamy, Bergmans Jude Thaddaeus, Arunachalam Palavesam, and Grasian Immanuel. 2014. "Dietary Effect of Sargassum Wightii Fucoïdan to Enhance Growth, Prophenoloxidase Gene Expression of *Penaeus Monodon* and Immune Resistance to *Vibrio Parahaemolyticus*." *Fish and Shellfish Immunology* 39(2): 439–49.
- Smith, Valerie J., Janet H. Brown, and Chris Hauton. 2003. "Immunostimulation in Crustaceans: Does It Really Protect against Infection?" *Fish and Shellfish Immunology* 15(1): 71–90.
- Söderhäll, Irene. 2016. "Crustacean Hematopoiesis." *Developmental and Comparative Immunology* 58: 129–41. <http://dx.doi.org/10.1016/j.dci.2015.12.009>.
- Song, Yen Ling et al. 2003. "Haemolymph Parameters of Pacific White Shrimp (*Penaeus Vannamei*) Infected with Taura Syndrome Virus." *Fish and Shellfish Immunology* 14(4): 317–31.
- Soto-Rodriguez, Sonia A. et al. 2015. "Field and Experimental Evidence of *Vibrio Parahaemolyticus* as the Causative Agent of Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease of Cultured Shrimp (*Penaeus Vannamei*) in Northwestern Mexico." *Applied and Environmental Microbiology* 81(5): 1689–99.
www.conapesca.sagarpa.gob.mx/wb/cona/cona_produccion (December 3, 2020).
- Su, Yi Cheng, and Chengchu Liu. 2007. "Vibrio Parahaemolyticus: A Concern of Seafood Safety." *Food Microbiology* 24(6): 549–58.
- Sudaryono, Agung, Diana Chilmawati, and Titik Susilowati. 2018. "Oral Administration of Hot-Water Extract of Tropical Brown Seaweed, *Sargassum Cristaeifolium*, to Enhance Immune Response, Stress Tolerance, and Resistance of White Shrimp, *Penaeus Vannamei*, to *Vibrio Parahaemolyticus*." *Journal of the World Aquaculture Society* 49(5): 877–88.
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jwas.12527> (May 16, 2022).
- Sung, H H, G H Kou, and Y L Song. 1994. "Vibriosis Resistance Induced by Glucan Treatment in Tiger Shrimp (*Penaeus Monodon*)." *Fish Pathology* 29(1): 11–17.
- Trejo-Flores, José Vladimir et al. 2018. "Immune-Related Gene Expression in *Penaeus Vannamei* Fed Aloe Vera." *Latin American Journal of Aquatic Research* 46(4): 756–64. <http://150.216.56.64/referencegene.php>. (September 22, 2021).
- Varela-Mejías, Alexander, and Ramsés Alfaro-Mora. 2018. "Review on Pharmacological Aspects to Be Considered for the Use of Antibiotics in Shrimp Farming." *Revista de Investigaciones Veterinarias del Peru* 29(1): 1–14.
- Villalobos, José. 2012. "Utilizaciòn de Las Macroalgas *Ulva Lactuca* y *Gracilaria* En La Formulaciòn de Dietas Balanceadas Para El Camaròn Blanco *Penaeus Vannamei*." : 1–72.
- Wang, Liping et al. 2015. "Isolation and Identification of *Vibrio Campbellii* as a Bacterial Pathogen for Luminous Vibriosis of *Penaeus Vannamei*." *Aquaculture*

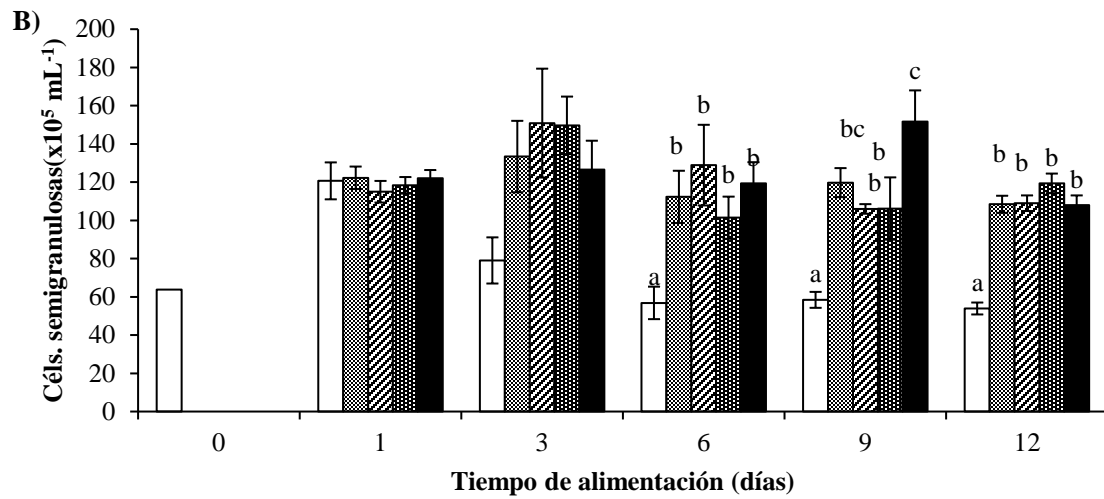
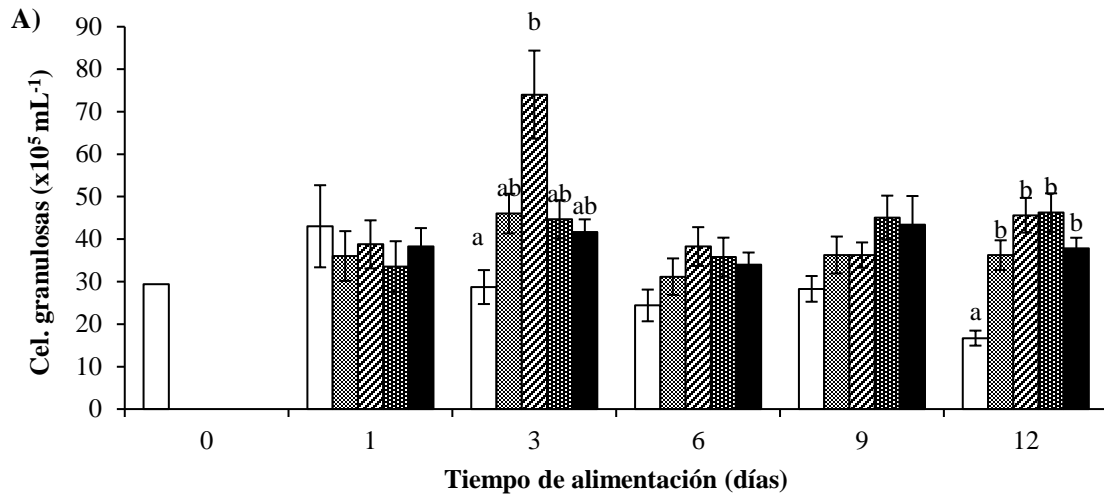
Research 46(2): 395–404. <http://www.ncbi.nih.gov/BLAST>.

- Wongprasert, Kanokpan, Tawut Rudtanatip, and Jantana Praiboon. 2014. “Immunostimulatory Activity of Sulfated Galactans Isolated from the Red Seaweed *Gracilaria Fisheri* and Development of Resistance against White Spot Syndrome Virus (WSSV) in Shrimp.” *Fish & Shellfish Immunology* 36(1): 52–60. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1050464813008073> (September 5, 2017).
- Yeh, Su Tuen, Chiu Sha Lee, and Jiann Chu Chen. 2006. “Administration of Hot-Water Extract of Brown Seaweed *Sargassum Duplicatum* via Immersion and Injection Enhances the Immune Resistance of White Shrimp *Penaeus Vannamei*.” *Fish and Shellfish Immunology* 20(3): 332–45.
- Yuan, Chuntao et al. 2007. “Administration of a Herbal Immunoregulation Mixture Enhances Some Immune Parameters in Carp (*Cyprinus Carpio*).” *Fish Physiology and Biochemistry* 33(2): 93–101.
- Yudiati, Ervia et al. 2016. “Innate Immune-Stimulating and Immune Genes up-Regulating Activities of Three Types of Alginate from *Sargassum Siliquosum* in Pacific White Shrimp, *Penaeus Vannamei*.” *Fish and Shellfish Immunology* 54: 46–53. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2016.03.022>.
- Zhang, Wei, Tatsuya Oda, Qing Yu, and Jun O. Jin. 2015. “Fucoïdan from *Macrocystis Pyrifera* Has Powerful Immune-Modulatory Effects Compared to Three Other Fucoïdians.” *Marine Drugs* 13(3): 1084–1104. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25706632/> (October 29, 2021).

ANEXO

El análisis del experimento preliminar realizado en el Programa Maricultura UANL demostró cambios ocasionados por la ingesta de las dietas con inclusión de la harina o extractos de *E. arborea*., donde para los conteos celulares los valores obtenidos van de 81.72×10^5 a 262.12×10^5 células mL^{-1} , siendo menores los valores para la dieta control (107.25×10^5 células mL^{-1}) y la dieta con 4 g Kg^{-1} de inclusión de *E. arborea* fue la que presentó los valores más elevados. Para el caso del conteo total de hemocitos se tienen diferencias significativas ($p < 0.05$) a partir del día 3, donde los organismos alimentados con 4 g Kg^{-1} de *E. arborea* presentaron una mayor cantidad de estas células llegando a un valor de 262.12×10^5 ; para posteriormente volver a los valores iniciales. La cuenta para las células granulosas mostró que el tratamiento que presentan un cambio para mayor fue *E. arborea* al 40 g Kg^{-1} , siendo un efecto relevante en el día 3, donde se observa una mayor concentración de estas células, dando un valor máximo de 74.02×10^5 células por mL, asimismo, presentando diferencias significativas entre los tratamientos el día 3 y 12. Por otra parte, el recuento de células semigranulosas en la hemolinfa de los organismos durante el periodo de administración de las dietas mostraron una diferencia significativa ($P < 0.05$), a partir del día 6 donde la hemolinfa de los organismos que ingirieron los tratamientos con alga presentaron significativamente una mayor cantidad de células (63.8 vs 151.69×10^5 células mL). Con respecto a la cuenta de los hemocitos hialinos, se observa un incremento en su concentración el día 3 de ingestión de los tratamientos donde se presenta un aumento significativo en la cantidad de este tipo de hemocitos (de 14.02 a 37.21×10^5 células mL), además, indica que el mayor incremento de debió al tratamiento de *E. arborea* al 40 g Kg^{-1} seguido de inclusión al 20 g Kg^{-1} y el extracto de *E. arborea* a 1 g Kg^{-1} . No se encontraron diferencias entre los tratamientos o días de muestreo para la actividad de la fenoloxidasa libre o total y estallido respiratorio, excepto para el primer día de muestreo, en el que la dieta con 2 g Kg^{-1} del extracto fue la única que generó una mayor concentración respecto a la dieta control; sin embargo se presentan diferencias significativas ($P < 0.05$) de acuerdo con el tiempo de exposición, siendo significativamente mayor para todos los organismos el día 9 del bioensayo (0.12 vs $0.17 \text{ DO}_{492\text{nm}}$).

Control
 Eck 20g kg⁻¹
 Eck 40 g kg⁻¹
 ExE 1 g kg⁻¹
 ExE 2 g kg⁻¹



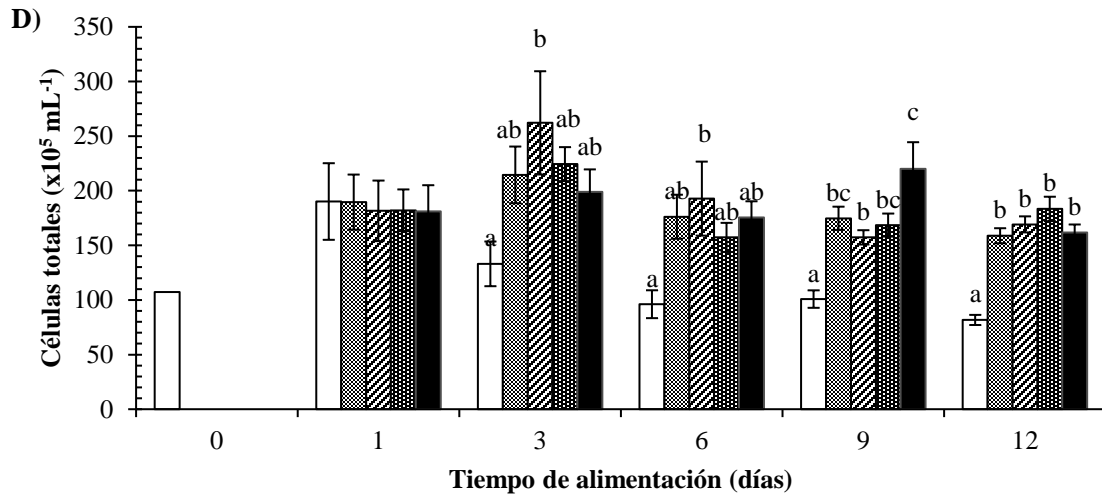
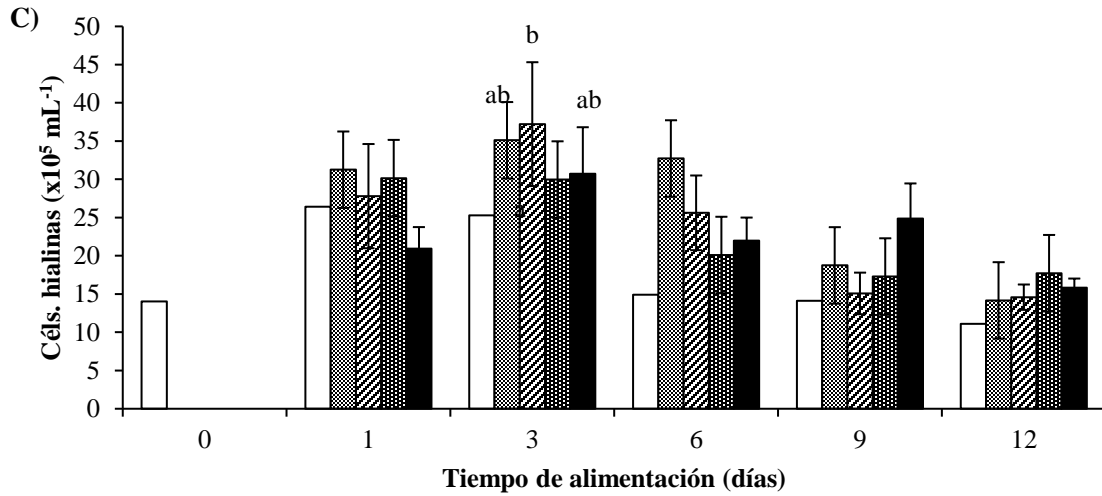


Fig. 29. Células granulosas (A), células semigranulosas (B), células hialinas (C) y cuenta total de hemocitos (D) de camarón blanco *Penaeus vannamei* que fueron inmersos durante un bioensayo de 12 días de alimentación con dietas conteniendo *E. arborea* en 20 y 40 g Kg^{-1} ; y su extracto rico en polisacáridos a 1 y 2 g Kg^{-1} .

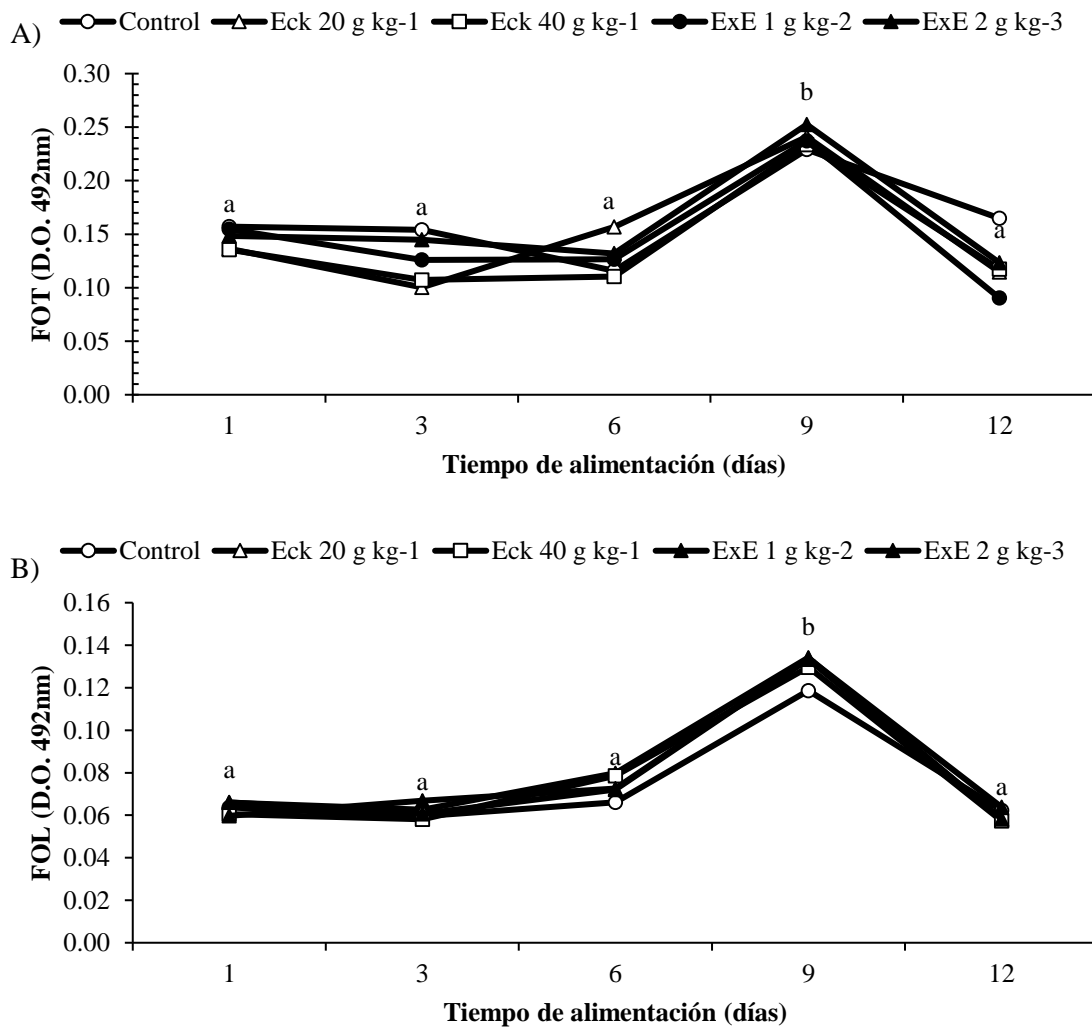


Fig. 30. Fenoloxidasa libre (FOL)(A), fenoloxidasa total (FOL) (B) de camarón blanco *Penaeus vannamei* que fueron que fueron alimentados durante un bioensayo de 12 días de alimentación con dietas conteniendo *E. arborea* en 20 y 40 g Kg⁻¹; y su extracto rico en polisacáridos a 1 y 2 g Kg⁻¹.

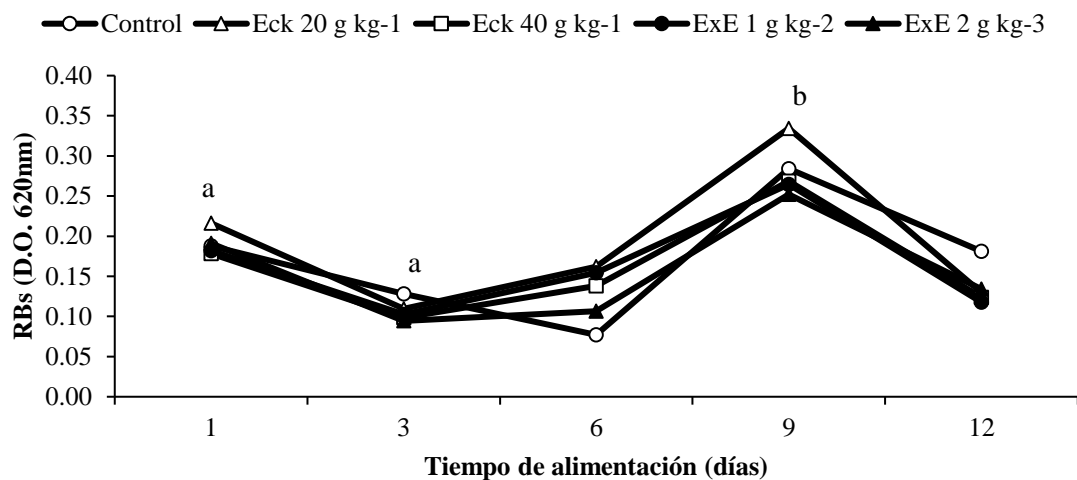


Fig. 31. Estallido respiratorio en camarones blancos *Penaeus vannamei* que han sido alimentados con dietas que contenían *Ecklonia arborea* a 0 (control), 2%, 4% y su extracto a 1 g Kg⁻¹ y 2 g Kg⁻¹ después de 1, 3, 6, 9 y 12 días. Cada barra representa el valor promedio de 15 camarones con la desviación estándar. Los datos al mismo tiempo de exposición con letras diferentes indican diferencias significativamente ($p < 0.05$) entre los tratamientos solo a ese tiempo de muestreo.