

00366

9



*Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología*

Universidad Nacional Autónoma de México



U N A M

**EFFECTOS DE DIETAS CON INMUNOESTIMULANTES SOBRE LAS  
RESPUESTAS FISIOLÓGICAS E INMUNOLÓGICAS DE JUVENILES DE  
CAMARON BLANCO *Litopenaeus vannamei* (BOONE, 1931).**

**T E S I S**

**MAESTRIA EN CIENCIAS  
(BIOLOGIA MARINA)  
P R E S E N T A  
NELDA URANIA LOPEZ MOYA**

**DIRECTOR DE TESIS: Dr. CARLOS ROSAS VAZQUEZ**

**COMITÉ TUTORAL: Dra. GABRIELA GAXIOLA  
Dra. CECILIA VANEGAS  
Dr. EDGAR ZENTENO  
Dr. CARLOS MARTINEZ**

**MEXICO, D.F**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

**2003**

**A**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**TESIS  
CON  
FALLA DE  
ORIGEN**

# **PAGINACION DISCONTINUA**

## **DEDICATORIA.**

### **A MIS PADRES:**

*Modesto (q.e.p.d) y Ana Virginia*

*A ustedes quienes fomentaron en mí el deseo de superación y me han ayudado a lo largo de mi vida. A pesar que no vivamos juntos y a veces pase mucho tiempo sin verlos, recuerden que siempre los tengo presente en mi corazón. Muchas gracias, por ayudarme a cumplir una meta más en mi vida, esto es un regalo muy valioso para mí, estoy muy contenta por lograr otro objetivo de mi vida y se que ustedes están más felices que su hija que los quiere mucho y sabe valorar todos los sacrificios y esfuerzos que han hecho por mí.*

### **A MIS HERMANOS:**

*Lorena, Tito (q.e.p.d), Linda, Toño, Lupita, a mi cuñada Vidal, Hayzell y mi cuñado Armando que son como mis hermanos.*

*Gracias por todos esos momentos bonitos que compartimos siempre que estamos juntos. Estoy segura que ustedes están muy felices por su hermanita, muchas gracias por darme todo ese amor, comprensión y confianza. Los quiero muchisimooooooooo.*

### **A MIS SOBRINOS:**

*Wendy, Vicky, Jarett, Cris, Anita, Erika, Gustavo, Alex y la más bebecita, la sobrina consentida Mariscalita.*

*Gracias por depositar en mí ese cariño tierno, dulce, encantador que hacen sentirme la tía más feliz, gracias por estar conmigo en momentos tristes, felices, recuerden que forman parte de mi vida, los quiero mucho son mis hijitos consentidos, les agradezco infinitamente su compañía, muchos besitos.*

### **A MIS SUEGROS:**

*Manuel y Coco.*

*A ustedes gracias, por su amor, amistad y comprensión. Los considero mis segundos padres, les agradezco sus consejos y ese motivo de superación que siempre me hicieron ver y el cual valoro. Recuerden que ustedes han sido un ejemplo para mí, gracias por preocuparse y estar pendiente de mí. Su hija que los admira, aprecia y quiere mucho.*

### **A MI NOVIO:**

*Marvin Medina.*

*A ti con todo mi amor, gracias mi vida por tu apoyo, paciencia, amistad, comprensión y sobre todo por estar siempre a mi lado, compartir conmigo momentos tristes, felices y enseñarme lo bello que es la vida. Siempre Tuya la Pulunguita. I Love you.*

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## **AGRADECIMIENTOS:**

“Este trabajo de investigación fue realizado con una beca otorgada por el gobierno de México a través del Instituto Mexicano de Cooperación Internacional (IMEXCI) de la Secretaría de Relaciones Exteriores”.

Quiero expresar mis más grato agradecimiento a mi Director de Tesis Dr. Carlos Rosas Vázquez por haber dirigido el presente trabajo de tesis haciéndolo posible en todos los sentidos desde la experimentación hasta conducir este estudio a su término.

A los Dres. Cecilia Vanegas, Gabriela Gaxiola, Edgar Zenteno y Carlos Martínez por formar parte del jurado, sobre todo su gran interés, dedicación y valiosas aportaciones en el desarrollo del presente trabajo.

Al Centro de Investigación del Camarón de la Universidad Centroamericana de Nicaragua por ayudarme a gestionar mi beca para poder realizar mi tesis de Maestría en México.

A la Embajada de México en Nicaragua por el apoyo brindado por las gestiones de mi beca. Al Lic. Mario Puga Secretario General de la Embajada, gracias por su confianza y su gran ayuda.

A la Lic. Ángela María Camacho y la Lic. María Elena Muñoz por el apoyo especial que me brindaron durante la realización de mis estudios.

Al Instituto de Ciencias del Mar y Limnología de la UNAM por la formación profesional que me brindó. En particular al Dr. Martín Merino, muchas gracias por su gran apoyo, por darme la oportunidad de formar parte de esta gran escuela para mi superación profesional. De igual manera agradezco a su gran equipo: Gabriela Almaraz, Norma Suazo, Guadalupe Godoy, Cande Pineda por su apoyo para el desarrollo de las actividades relacionadas con el posgrado en Ciencias del Mar.

Gaby, Normis, Lupita y Cande muchas gracias por su amistad y la confianza que me dieron por ser la primera alumna extranjera del posgrado.

A todos mis maestros de la maestría, por su enseñanza y dedicación, especialmente a la Dra. Elva Escobar, Dra. Maité Mascaró, Dra. Gabriela Gaxiola, Dr. Javier Alcocer, Dr. Xavier Chiapa, Dr. Arturo Carranza Dr. Martín Merino y el Técnico Académico Sergio Sandoval.

Agradezco a la Familia Chimal, por acogerme en su casa y darme toda la confianza sin conocerme. A Roberto, Pili y sus hijos muchas gracias. Aurora le agradezco infinitamente por todo el apoyo que me brindó y por considerarme parte de su familia. A don Alfonso y Doña Teresa, muchas gracias por todo ese cariño tan bonito y especial que depositaron en mi, por la compañía, la cual me ayudó a no sentirme triste por estar lejos de mi país y mi familia. Siempre recordaré y extrañaré los momentos agradables que compartimos juntos, los domingos en visitar la casa de Dios. Ustedes son una familia a la cual admiro mucho

por ser como son, no tengo como pagarles toda su ayuda pero estoy segura que Dios les recompensará todo lo que hicieron por mí. Que Dios y la Virgen los bendiga.

Al Dr. Chunga, gracias por brindarme su ayuda y enseñarme el camino de superación profesional, sin su ayuda no hubiera puesto un pie en las puertas de la UNAM, muchas gracias por este gesto tan bonito, gracias por su apoyo y valiosa amistad. Lo admiró por su sencillez y compartir con sus alumnos los conocimientos adquiridos como investigador. Lo estimo como persona y aprecio por ser como es. Muchas gracias por darme la oportunidad y la confianza de aprender.

Al Ing. Vega. Gracias maestro por su enseñanza y ser una de sus estudiantes privilegiada con una beca para estudiar la especialidad en Acuacultura. Gracias a esta beca tuve la oportunidad de conocer investigadores extranjeros como el Dr. Rosas y la Dra. Gaxiola, los que me aconsejaron que estudiara la maestría en México.

A mis amiguitos de la maestría: Claudia, Juanita, Kari, José Luis, Alfredo, Cesar, Miguel, Roberto, Angeles y Chucho gracias por todo su apoyo, amistad , siempre recordaré los momentos que compartimos juntos, las reuniones de estudio y las pachangas en la casa de Cesarín. Extraño el cafecito. Gracias Cerarín y Alfredo los aprecio mucho.

Claudia, gracias por considerarme tu amiga y ayudarme en los momentos más difíciles, enseñarme a ser paciente, recuerda que tienes una amiga, una hermana que te aprecia mucho. Doña Irene, muchas gracias por sus atenciones para conmigo, que Dios la Bendiga.

Juanita, mi hermanita incondicional, gracias por tu ayuda, generosidad, ese cariño que me has brindado, los momentos felices que compartimos juntas como compañera de clase, amiga, muchas gracias te deseo lo mejor en tu vida.

A mis compañeros del Laboratorio de Ecología y Biología Experimental de la UNAM, Marú, Nuno, Rocío, Taboada, Brito, Roli, Tomas, Kike, Pedro, Paloma, Adriana por su apoyo y amistad.

Al M en C. Adolfo Sánchez, agradezco infinitamente todo el apoyo que me brindaste durante mi estancia en el Laboratorio. Adolfo, muchas gracias por tu amistad.

A mis amiguitos del Carmen: Vicky, Gema, Arañita, Angélica, Wilberth, Marcos, Jaime, Manuel, Juan Alpuche, Claudia, Argaes, Angélica, y José gracias todo el apoyo incondicional que me brindaron. Marcos, Jaime, Manuel y Wilberth, recordaré la época que eran pobres, las comidas de pollo asado en la palapa de Manuel. Gracias amiguitos por su amistad y hacerme reír en los momentos más difíciles. Los aprecio mucho. Paquito, te agradezco de todo corazón tus atenciones para conmigo, recuerda que te estimo mucho.

Al grupo de vampiros Carlos, Arañita, Cris y YO muchas, muchas, muchas gracias.

A los Técnicos Manuel Valenzuela y Ariadna Sánchez del Laboratorio de Ecología y Biología Experimental de la Facultad de Ciencias de la UNAM, Cd del Carmen, Campeche, Gracias por el apoyo en la parte experimental de mi trabajo de investigación.

D

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Arañita, gracias porque siempre has estado dispuesta a escucharme, por tus consejos y por permitirme ser tu amiga, recordaré tus carcajadas y la frase Y tú que opinas? Eres una gran persona, suerte, tu amiga que te aprecia mucho.

Gema, siempre recordaré los momentos tristes y felices que pasamos juntas, que Chido ¡Verdad!, Chanclas, suerte amiguita, te aprecio mucho.

Niña Vicky, gracias por tu amistad, bondad, generosidad para conmigo, tenemos algo muy en común por eso nos llevamos super bien, gracias amiguita sigue siendo la misma niña, no cambies eres una gran amiga, te agradezco la ayuda incondicional que me brindaste en la etapa final de mi tesis. Suerte amiguita Cocó. Te aprecio mucho.

Angélica, gracias por ser mi gran amiga y confiar en mí, hemos llorado y reído, siempre recordaré todo lo bonito que convivimos juntas. Gracias amiguita. Te aprecio mucho.

A doña Blanquita (q.e.p.d) y Francisco Vera por todo el cariño que me brindaron muchas gracias siempre estarán presentes en mi corazón.

A Ignacio Palomar y Rocío Tafoya, gracias por todo el apoyo técnico brindado durante mi Estancia en el posgrado.

A alguien muy especial, Nachito Chu, gracias por tu amistad y el apoyo incondicional que me brindaste.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



## INDICE

<b>I. INTRODUCCION</b> .....	1
<b>II. OBJETIVOS</b> .....	5
2.1 Objetivo General .....	5
2.2 Objetivos Específicos .....	6
<b>III. MATERIALES Y METODOS</b> .....	7
3.1 Origen de los Organismos .....	7
3.2 Diseño Experimental .....	7
3.2.1 Efectos de dietas con $\beta$ - glucanos en condiciones de Laboratorio .....	10
3.2.1.1 Crecimiento y Supervivencia .....	11
3.2.1.2 Reto Salino .....	12
3.2.1.3 Cinética Inmunológica .....	13
3.2.2 Dietas comerciales con $\beta$ - glucanos en Estanques Externos .....	14
3.2.2.1 Crecimiento y Supervivencia .....	16
3.2.2.2 Reto Salino .....	16
3.2.2.3 Reto de Oxígeno disuelto .....	17
3.3 Técnicas para Evaluar Metabolitos Sangüneos y la Respuesta Inmune .....	19
3.3.1 Transporte de los Organismos .....	20
3.3.2 Obtención de Hemolinfa .....	20
3.3.2.1 Hemocianina .....	21
3.3.2.2 Presión Osmótica .....	21
3.3.2.3 Cuento de Hemocitos .....	21
3.3.2.4 Estallido Respiratorio .....	21
3.3.3 Obtención del Plasma .....	22
3.3.4 Obtención de Paquete Celular .....	22
3.3.5 Cuantificación de Metabolitos en el Plasma .....	23
3.3.6 Determinación de glucógeno en la Glándula Digestiva .....	25
<b>IV. ANALISIS ESTADISTICO</b> .....	25
<b>V. RESULTADOS</b> .....	26
5.1 Evaluación de dietas experimentales con o sin $\beta$ - glucanos .....	26
5.1.1 Crecimiento .....	26
5.1.2 Supervivencia antes del Reto Salino .....	26
5.1.3 Supervivencia después del Reto Salino .....	26
5.2 Evaluaciones Bioquímico - Fisiológicas .....	27
5.2.1 Presión Osmótica .....	27
5.2.2 Glucógeno en la Glándula Digestiva .....	27
5.2.3 Glucosa .....	28
5.2.4 Lactato .....	29
5.2.5 Acilglicéridos .....	29
5.2.6 Colesterol .....	30
5.2.7 Proteínas .....	31
5.2.8 Hemocianina .....	32
5.3 Evaluaciones inmunológicas .....	34
5.3.1 Profenoloxidasa .....	34
5.3.2 Células Granulares .....	34
5.3.3 Células Totales .....	35
5.3.4 Relación proPO/CG .....	35
5.4 Cinética Inmunológica .....	37
5.4.1 Proteínas .....	37
5.4.2 Estallido Respiratorio .....	37
5.4.3 Células Granulares .....	39
5.4.4 Células Totales .....	39
5.4.5 proPO .....	39

TESIS CON  
 SELLA DE ORIGEN

F

Nelda Urania López Moya

5.4.4 Células Totales .....	40
5.4.5 proPO .....	40
5.4.6 Relación proPO/CG .....	41
5.5 Evaluación de Dietas comerciales con o sin $\beta$ - glucanos .....	43
5.5.1 Crecimiento .....	43
5.5.2 Supervivencia antes del Reto Salino .....	43
5.5.3 Supervivencia después del Reto Salino .....	43
5.5.4 Evaluaciones Bioquímico - Fisiológicas .....	43
5.5.4.1 Presión Osmótica .....	43
5.5.4.2 Glucógeno en la Glándula Digestiva .....	44
5.5.4.3 Glucosa .....	45
5.5.4.4 Lactato .....	45
5.5.4.5 Acilglicéridos .....	46
5.5.4.6 Colesterol .....	47
5.5.4.7 Proteínas .....	48
5.5.4.8 Hemocianina .....	48
5.5.4.9 Profenoloxidasas .....	49
5.6 Reto de Oxígeno Disuelto .....	51
5.6.1 Supervivencia después del Reto Salino .....	51
5.6.2 Presión Osmótica .....	51
5.6.3 Glucógeno en la Glándula Digestiva .....	51
5.6.4 Glucosa .....	52
5.6.5 Lactato .....	52
5.6.6 Acilglicéridos .....	53
5.6.7 Colesterol .....	54
5.6.8 Proteínas .....	54
5.6.9 Hemocianina .....	55
5.6.10 Profenoloxidasas .....	55
VI. DISCUSION .....	57
VII. CONCLUSIONES .....	69
VIII. BIBLIOGRAFÍA CITADA .....	70
IX. ANEXOS .....	78

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## RESUMEN

Debido a la problemática de enfermedades que actualmente enfrenta la camaricultura se ha creado la necesidad de explorar todas las vías posibles para su control. Uno de los caminos más factibles es profundizar el conocimiento de la bioquímica y fisiología de los mecanismos de defensa de los camarones. La presente investigación tuvo como objetivo conocer los efectos de dietas con  $\beta$  - glucanos (BG), sobre las respuestas fisiológicas e inmunológicas de juveniles de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, mantenidos en condiciones de laboratorio y estanques externos. El estudio experimental se realizó en dos partes: Dietas con BG elaboradas en el laboratorio y dietas comerciales con BG. En referente a la primera parte, a una dieta base (control: C; 40 % de proteínas) se le adicionaron BG a razón de 2000 mg kg<sup>-1</sup> de dieta. Con estas dietas se diseñaron tres tratamientos: camarones alimentados con dietas con BG permanentes (BGP), camarones alimentados 7 días con la dieta BG y 7 días con la dieta C (BGC), y camarones alimentados permanentemente con la dieta Control (C) sin BG, Cada dieta contó con tres tanques de 90 L. Para la evaluación de la cinética inmunológica de los organismos se utilizaron las mismas dietas y tanques de 500 L (un tanque / tratamiento). La segunda parte consistió de tres experimentos: a) Uno de 115 días a nivel de estanques externos, se evaluó el efecto de dietas comerciales con BG sobre el crecimiento y la sobrevivencia. b) El segundo en determinar el efecto de un cambio brusco de salinidad (35 ‰ – 15 ‰), c) y el tercero en evaluar el efecto de una disminución de oxígeno disuelto (5 mg L<sup>-1</sup> – 2 mg L<sup>-1</sup>). En este caso se utilizaron dos tipos de dietas los cuales fueron clasificados como: T1, es una dieta base a la que se le adicionaron BG a razón de 2000 mg kg<sup>-1</sup> de dieta y T2 la dieta control (C) sin BG. Se utilizaron 6 tanques de 20 m<sup>2</sup> (3 estanques / tratamiento). Los resultados obtenidos de crecimiento y la sobrevivencia en condiciones de laboratorio y estanques externos, mostraron que las dietas con o sin BG no afectaron el % coeficiente diario de crecimiento (% CDC) y la sobrevivencia de los camarones. En referencia a la primera parte del estudio los resultados de la LB de la glucosa, el lactato y las células sanguíneas presentaron alteraciones por el efecto de la dieta, obteniendo valores más altos de la glucosa y el lactato en los camarones alimentados con la dieta C. La baja concentración de glucosa podría indicar que los BG estimularon la asimilación de los carbohidratos (CBH) los cuales fueron dirigidos a la producción de energía metabólica y además los BG de ser degradados por las glucanasas o laminarinasas estimularon el uso de la glucosa para la formación de glucógeno. Por otro lado los BG presentes en la glándula digestiva (GD) estimularon a las células sanguíneas posiblemente por el efecto directo

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Nelda Urania López Moya

A

al tejido hematopoyético, lo que se refleja en el aumento de las células. En contraste cuando los camarones fueron retados con un cambio brusco de salinidad los acilglicéridos y el colesterol fueron reducidos indicando la movilización de reservas como compensación para reducir los efectos de la dilución. Al evaluar la parte inmune se observó una reducción de la relación proPO / Células Granulares en los camarones alimentados con la dieta BGP, demostrando que estos organismos liberaron el equipo inmunológico para responder al estrés de manera continua. Estos resultados ponen de manifiesto que además de provocar fatiga inmunológica también produce un agotamiento fisiológico impidiendo la recuperación del sistema inmune cuando son expuestos a una concentración brusca de salinidad, sucediendo lo contrario en los alimentados con la dieta C. Además es notorio observar que en estanques externos los resultados de la LB de los metabolitos sanguíneos presentaron comportamientos similares, pero una vez que los camarones fueron sometidos al reto salino los indicadores sanguíneos e inmune fueron modificados significativamente, provocando un desequilibrio iónico en ambos tratamientos, por lo tanto los organismos utilizaron la energía disponible para compensar el cambio en su medio, la que provino de los acilglicéridos y el colesterol los que fueron reducidos significativamente. Sin embargo cuando se les expuso a un reto de oxígeno disuelto tampoco se observó que las dietas con BG promovieran una mejor condición nutricional que los del grupo C. Así mismo al evaluar la capacidad inmunológica de estos organismos a través de las variaciones de la proPO se observó que en ambos casos, reto salino y reto de oxígeno, los camarones alimentados con la dieta BG no fueron capaces de mantener elevados los niveles de esta molécula, la cual es un efector central de la respuesta inmune. Aunque en condiciones de laboratorio las dietas con BG efectivamente promovieron la respuesta inmune de los camarones y mejoraron aparentemente la condición nutricional general, cuando se les aplicó a los camarones en estanques externos sucedió lo contrario. Es evidente de los resultados obtenidos ahora, que las dietas con BG en los camarones cultivados en los estanques no cumplen con estos requisitos y reducen aún la capacidad de los organismos de tolerar contingencias ambientales. Al mismo tiempo los resultados pusieron en evidencia que dietas bien diseñadas y que cubren con los requerimientos nutricionales de los animales son suficientes para mantener el sistema inmunológico en alerta y proporcionar a los organismos las moléculas y la energía suficientes para tolerar cambios ambientales extremos.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

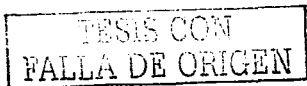
Nelda Urania López Moya

## **I. Introducción**

El aprovechamiento masivo de los recursos naturales del mar es una de las actividades que se realizan a gran escala por la población mundial que juegan un papel importante en la economía internacional. En México, el camarón es el recurso marino que más divisas aporta. De las especies nativas en México, el camarón blanco del pacífico *Litopenaeus vannamei* Boone, 1931 es una de las especies preferidas para el cultivo en el hemisferio occidental debido a su rápido crecimiento, resistencia y adaptabilidad en condiciones de cultivo (W.S.F, 1998).

El incremento de la producción camarónica ha causado el deterioro de las condiciones ambientales dentro y fuera de las granjas, lo cual ha provocado la incidencia de enfermedades que han afectado negativamente a la producción. El deterioro ambiental y las condiciones de cultivo son factores responsables del estrés de los camarones lo cual provoca al aumento en la susceptibilidad a los patógenos (Bédier *et al* 1998). Las epidemias son transmitidas de una granja a otra, debido a los efluentes y también por otros vectores como los humanos, los depredadores, los equipos compartidos etc (Bédier *et al* 1998). Entre las bacterias más importantes que afectan a la industria camarónica se encuentran las del género *Vibrio*, las cuales han afectado seriamente la industria por varios años (Le Moullac *et al.*, 1998a) . El cultivo del camarón es una actividad de alto riesgo debido, fundamentalmente a la aparición y diseminación de enfermedades que llegan a afectar seriamente a la producción. Aunque se ha avanzado en el conocimiento de los factores ambientales óptimos para el cultivo y en la identificación de organismos patógenos que afectan a los camarones, la presencia de padecimientos infecciosos sigue siendo un problema en acuicultura, debido a la ausencia de metodologías en el diagnóstico temprano y de tratamientos específicos, lo que favorece alta mortalidad y por ende cuantiosas pérdidas (Vargas-Albores *et al.*, 1996).

La aparición de enfermedades está relacionada con el rompimiento del equilibrio entre el medio ambiente, la fisiología del hospedero y las estrategias invasoras del parásito. Aunque algunas bacteriosis pueden ser controladas por medio de tratamientos antibióticos, es difícil asegurar que todos los organismos serán tratados por los químicos incorporados a las dietas, en adición a esto, existe la posibilidad de generar resistencia por parte del patógeno,



lo cual representa una desventaja para ésta (Le Moullac *et al.*, 1998a). La vacunación ofrece la mejor prevención contra enfermedades específicas, pero todavía no existen vacunas efectivas contra un gran número de patógenos bacterianos de importancia comercial para la camaronicultura. Aunado a esto, la vacunación no es aplicable a los camarones debido a que poseen un sistema inmune poco desarrollado y dependen de un sistema inmune no específico. En la actualidad se han descrito varios factores que forman parte del sistema inmune de los crustáceos: Proteínas séricas como las aglutinas (Vargas-Albores *et al.*, 1992), procesos celulares ejecutados por los hemocitos, como fagocitosis, adhesión y encapsulación (Sorderhall, 1982; Sorderhall *et al.*, 1990; Vargas-Albores, 1995); sistemas multiméricos como la coagulación y el sistema profenoloxidasa (ProPO) entre otros (Sorderhäll, 1992; Guzmán-Murillo *et al.*, 1993; Vargas-Albores *et al.*, 1997).

El sistema proPO es una compleja cascada enzimática que se encuentra en el interior de los gránulos de los hemocitos y puede ser liberado por estimulación con  $\beta$ -glucanos (BG) derivados de hongos o lipopolisacaridos (LPS) de bacterias. Una vez liberado el contenido granular, la proPO es activada por una proteinasa y convertida en fenoloxidasa (FO), la cual es responsable de la oxidación de fenoles a quinonas que finalmente se convierten en melanina (Ashida *et al.*, 1984). El sistema proPO al activarse genera algunos factores que estimulan a los hemocitos a eliminar el material extraño (Soderhall *et al.*, 1984; Sorderhall *et al.*, 1998).

Tomando en cuenta estas características del sistema inmune, la industria del cultivo ha planteado el uso de inmunoestimulantes, los cuales han sido aplicados en las dietas para simular infecciones bacterianas o fúngicas y provocar así el aumento de la respuesta inmune. Con este fin diversos componentes activos son extraídos de las paredes de bacterias como son los lipopolisacaridos(LPS), lipopeptidos y levaduras ( $\beta$ -glucanos), entre otros (Itami *et al.*, 1998; Chan *et al.*, 2000; Le Moullac *et al.*, 1998a). Tomando en cuenta esto Vargas-Albores, (1993), evaluó la capacidad de aglutinación con *Penaeus californiensis*, demostrando que la aglutinina sérica del camarón café al ligarse con los LPS fue capaz de aglutinar tres especies diferente de *Vibrio* (*V. vulnificus*, *V. fischeri* y *V. haemolyticus*), además de activar el sistema proPO.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

En este mismo sentido Itami *et al.*,(1998), demostró que la administración oral de peptidoglucanos (PG) derivados de *Bafidobacterium thermophilum* a través de la dieta (2000 mg kg<sup>-1</sup>) incrementó la resistencia de enfermedades del camarón (*Penaeus japonicus*), cuando fueron sometidos a un reto con *V. penaeicida*. De igual forma Merchie *et al.*,(1998), reportó que postlarvas de *Penaeus monodon* alimentadas con una dieta combinada con astanxantina (810 mg AX kg<sup>-1</sup>) y una sobre dosis de vitamina C (1700 mg AA Kg<sup>-1</sup>), mostraron alta resistencia a una infección con *V. harveyi* y a un reto salino. Por otro lado Rengpipat *et al.*, (2000), realizó un estudio con las mismas especies de camarón y patógeno y observó el aumento de la respuesta inmune asociado con la presencia de una bacteria probionte, mostrando que los camarones tratados con *Bacillus S11* después de 10 días del reto con *V. harveyi* obtuvieron una sobrevivencia del 54 % en comparación con la obtenida en los organismos no tratados (35 %). De igual manera en otro estudio realizado en camarón tigre *Penaeus monodon* se observó la eficacia de la inclusión de 2.0 g kg<sup>-1</sup> de BG derivados de *Schizophyllum commune* en la dieta, mostrando que la sobrevivencia, fagocitosis y producción del anión súper oxido fue significativamente mayor en los camarones alimentados con BG, en contraste con los del grupo control sin BG (Chang *et al.*, 2000).

Otro de los aditivos utilizados como inmunoestimulantes son las vitaminas. En un estudio de postlarvas de *P. indicus* alimentadas con una dieta estándar para larvas (Lansy ZM INVE Bélgica) y suplementada o no con una mezcla de vitamina C y E se observó que al ser inoculadas con *V. harveyi*, los camarones mostraron que la mortalidad de las larvas infectadas se redujo a 46 % en comparación al 87 % observado en las larvas alimentadas con la dieta control. Según un estudio reciente realizado en Ecuador con 15 diferentes combinaciones de vitaminas C y E con o sin BG adicionados en la dieta, se encontró que *Litopenaeus vannamei* alimentados con la mezcla : 150:500, 450:250 sin BG y 50:50, 150:500, 450:100 con BG presentaron mejor estado de salud y respuesta inmunitaria que el observado en otros tratamientos. De estas 5 dietas, dos presentaron la menor tasa de mortalidad cuando fueron desafiados contra el síndrome de la mancha blanca (WSSV) (50:50 con BG y 150:500 sin BG) (Molina *et al.*, 2002).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Por esta razón, diversos grupos de investigación en varias parte del mundo se han dedicado a la búsqueda de indicadores del estado nutricional e inmunológico de los camarones para poder tener herramientas de diagnóstico. Racotta *et al.*, (1998), estudió las variables metabólicas en la hemolinfa, en respuesta por manipulación de estrés y la inyección de Serotonina en camarones *Penaeus vannamei*, los resultados demostraron que después de la inyección isotónica salina y de la 5 hydroxytryptamine serotonina (5 HT) los niveles de glucosa sanguínea aumentaron en ambos tratamientos, mientras que los niveles de lactato aumentaron en el grupo 5 HT, concluyendo que ambos metabolitos son indicadores de estrés.

Estudios recientes han demostrado que diversos metabolitos sanguíneos pueden ser usados como herramientas de diagnósticos del estado de salud de los camarones. Cuando estos resultados se acoplan al crecimiento y sobrevivencia es posible entender los mecanismos fisiológicos involucrados en respuesta a condiciones nutricionales (Rosas *et al.*, 2000). Se ha observado que la glucosa sanguínea está íntimamente relacionada con el metabolismo de las proteínas a través de la formación de glucógeno por vías gluconeogénicas (Rosas *et al.*, 2002). Otros estudios han permitido observar que la hemocianina, acoplada con la proteínas de la sangre son un buen indicador del estado nutricional de los camarones, ya que los camarones la utilizan como una bio molécula almacenadora de proteínas (Cuzon, 1971; Rosas *et al.*, 2001).

Así mismo los estudios de Le Moullac *et al.*, (1998), demostraron que el estrés debido a la hipoxia ( $1 \text{ mg OD L}^{-1}$ ) en presencia de *V. alginolyticus*, alteran el sistema inmune del camarón *Penaeus stylirostris*, causando disminución en las células totales y un aumento en la actividad de la proPO, concluyendo que una disminución de oxígeno disuelto incrementa la sensibilidad al Vibrio.

Desde los inicios del cultivo del camarón, la *Spirulina* ha sido reconocida como un alimento adecuado para la nutrición de crustáceos. En *Penaeus japonicus* se ha utilizado con éxito hasta con 8% de inclusión en la dieta tanto por su alto nivel de proteínas (58.6%) como de ácidos grasos totales (22.7%) (Cuzon *et al.* ,1981). Por su parte Meyers, (1997), señaló que la *Spirulina* como fuente de  $\beta$  carotenos podría cumplir una doble función: la de reducción del estrés y la de mejorar la nutrición, debido a que los carotenoides de esta alga tienen propiedades antioxidantes, y funcionan como una reserva de oxígeno intracelular

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



ayudando a mantener el metabolismo aerobio por encima del anaerobio. En un trabajo reciente Cruz-Suárez *et al.*, (2000), encontró que los juveniles de *Litopenaeus vannamei* alimentados con harina de *Macrosystis pirifera* incluida en la dieta en un 8 %, crecieron entre un 17 y 68 % dependiendo del origen del alga más que los camarones alimentados con una dieta sin harina de *Macrosystis*.

La nutrición es el elemento primordial para el control de enfermedades, ya que organismos con deficiencias nutricionales están más propensos a enfermedades por la ausencia de factores necesarios para el sistema de defensa. De acuerdo a Bachere, (2000) la respuesta inmune necesita ser analizada bajo una condición de estrés en camarones en cultivo. Por tal motivo y dada la importancia comercial que tiene *Litopenaeus vannamei* y los retos que enfrenta la industria camaronicola resultó de gran interés investigar si dietas con BG ayudan a mantener en alerta fisiológica a los camarones, y al mismo tiempo este aditivo mejora la condición nutricional y por ende el estado fisiológico de los camarones.

### **Hipótesis:**

Aunque los  $\beta$ -glucanos estimulan la respuesta inmune de los camarones, en dosis elevadas pueden llegar a producir sobreestimulación. Entonces si los  $\beta$ -glucanos son utilizados de forma intermitente, la repuesta inmunológica será estimulada a un nivel de alerta el cual deberá ser el apropiado para responder a condiciones de estrés ambiental.

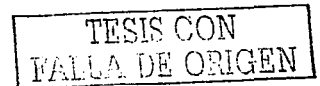
## **II. Objetivos**

### **2.1 Objetivo General.**

Determinar el efecto de la frecuencia de aplicación de dietas experimentales y comerciales con  $\beta$ - glucanos sobre el estado fisiológico e inmunológico de juveniles de camarón blanco del pacífico *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931).

### **2.2 Objetivos Específicos.**

a) Evaluar el efecto de la frecuencia de aplicación de  $\beta$ - glucanos en dietas experimentales sobre el crecimiento y la sobrevivencia de camarones juveniles *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) mantenidos en condiciones controladas.



b) Determinar de qué manera la frecuencia de aplicación de dietas experimentales con  $\beta$ -glucanos afectan la resistencia de juveniles de camarón a las alteraciones producidas por un cambio brusco de salinidad.

c) Conocer la forma en que los camarones ajustan algunas respuestas inmunológicas como la actividad de la proPO, células granulares y estallido respiratorio durante la aplicación de diferentes frecuencias de alimentación con dietas experimentales con  $\beta$ -glucanos.

d) Evaluar el efecto de dietas comerciales con  $\beta$  - glucanos sobre el estado nutricional e inmunológico de juveniles *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) cultivados en estanques que simulan un sistema de cultivo intensivo industrial.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### III. Materiales y Métodos.

#### 3.1 Origen de los Organismos.

Para la realización del presente estudio se utilizaron postlarvas de camarones *Litopenaeus vannamei* procedentes del Laboratorio de producción de postlarvas de Industrias Pecis, S. A. en el estado de Yucatán. Una vez en el laboratorio los organismos fueron aclimatados en estanques externos durante el tiempo necesario para que alcanzaran el peso inicial deseado en cada parte del estudio.

#### 3.2 Diseño Experimental.

El estudio se realizó en dos partes : a) Evaluación de dietas con  $\beta$ - glucanos stanguard de origen japonés a nivel experimental elaboradas en el Laboratorio de Ecología y Biología Marina Experimental de la UNAM ubicado en Cd. del Carmen, Campeche. Esta primera parte consistió de tres experimentos: a) Uno de 40 días a nivel de laboratorio en tanques de 90 L, donde se evaluó el efecto de  $\beta$ - glucanos (BG) incluidos en la dieta, sobre el crecimiento y la sobrevivencia (Fig. 1). b) Así mismo se determinó el efecto de un cambio brusco de salinidad (35 - 0 ‰), en la sobrevivencia después del reto, la glucosa sanguínea, el lactato, los acilglicéridos, el colesterol, las proteínas, la presión osmótica, glucógeno en la glándula digestiva (GD), la concentración de hemocianina en hemolinfa, la actividad de la profenoloxidasa (proPO) y el conteo de células sanguíneas, utilizando las técnicas que se describirán posteriormente 2) y otro de 20 días donde se determinó el efecto de BG en la cinética de la respuesta inmune de los camarones asociada con la dosis de aplicación de estas dietas a nivel de laboratorio en tanques de 500 L (Fig. 2; Tabla 1).

b) Evaluación de dietas comerciales con  $\beta$ - glucanos stanguard de origen italiano de la empresa Malta Texo SA de CV de Hermosillo, Sinaloa. Esta segunda parte del estudio consistió de tres experimentos: 1) uno de 115 días a nivel de estanques externos de 20 m<sup>2</sup>, en donde se evaluó el crecimiento, y la sobrevivencia. 2) otro de 48 h donde se evaluó el efecto de un cambio brusco de salinidad en tanques de 90 L 3) y por último el efecto de un reto de oxígeno disuelto en tanques de 90 L y de 500 L . En ambos retos, además de la sobrevivencia se evaluaron las mediciones de los metabolitos sanguíneos y algunos indicadores de la respuesta inmune (Tabla 2).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Tabla. 1** Diseño Experimental de camarones juveniles *L. vannamei* alimentados con dietas experimentales elaboradas en el laboratorio con BG.

Diseño	Experimentos	Respuestas	Evaluaciones
Completamente aleatorizado	I. Parte: Dietas Con BG elaboradas en el laboratorio.		
Duración. 40 días.	a) Efecto de la dieta.	Nutricional	Crecimiento Sobrevivencia
		Bioquímico - Fisiológicos	Presión osmótica Niveles en la Hemolinfa: Glucosa Lactato Acilglicéridos Colesterol Proteínas Concentración de glucógeno en la GD
		Inmunológicos	Actividad de la proPO Cuento de: Células totales Células granulares Células semi-granulares Células hialinas
48 h	b) Reto salino (35 – 0 ‰).	Nutricional	Sobrevivencia.
		Bioquímico – fisiológicos	Niveles en la Hemolinfa: Glucosa Lactato Acilglicéridos Colesterol Proteínas Concentración de glucógeno en la GD
		Inmunológicos	Actividad de la proPO Cuento de: Células Totales Células granulares Células semi-granulares Células Hialinas
20 días	c) Cinética inmunológica	Bioquímicos	Proteínas
		Inmunológicas	Estallido respiratorio Actividad de la proPO Cuento de: Células totales Células granulares Células semi-granulares Células hialinas

**Tabla. 2** Diseño Experimental de camarones juveniles *L. vannamei* alimentados con dietas comerciales con BG.

Diseño	Experimentos	Respuestas	Evaluaciones
Completamente aleatorizado	II. Parte: Dietas comerciales con BG		
Duración 115 días	a) Efecto de la dieta.	Nutricional	Crecimiento Sobrevivencia
		Bioquímico - Fisiológicos	Presión osmótica Niveles en la Hemolinfa: Glucosa Lactato Acilglicéridos Colesterol Proteínas Concentración de glucógeno en la GD
		Inmunológicos	Actividad de la proPO
48 h	b) Reto salino (35 – 15 ‰).	Nutricional	sobrevivencia
		Bioquímico - Fisiológico	Presión osmótica Niveles en la hemolinfa: Glucosa Lactato Acilglicéridos Colesterol Proteínas Concentración de glucógeno en la GD
		Inmunológicos	Actividad de la proPO
48 h	c) Reto de oxígeno disuelto (5 – 0 mg l <sup>-1</sup> ).	Nutricional	Sobrevivencia
		Bioquímico - Fisiológico	Presión osmótica Niveles en la hemolinfa: Glucosa Lactato Acilglicéridos Colesterol Proteínas Concentración de glucógeno en la GD
		Inmunológicos	Actividad de la proPO.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**3.2.1 Efectos de dietas con  $\beta$ - glucanos en condiciones de laboratorio:** Se utilizaron dos tipos de alimentos elaborados en el Laboratorio. A una dieta base (control), se le adicionaron  $\beta$ -glucanos (BG) al 0.2 % de la dieta, nivel de inclusión propuesto por el fabricante de alimento (Tabla 3).

*Tabla 3. Dietas utilizadas en este estudio.*

<b>Materia Seca</b>	<b>Dieta Base o Control (g kg<sup>-1</sup>)</b>	<b>Dieta con BG (g kg<sup>-1</sup>)</b>
Harina de Pescado Chilena	450	450
Harina de Soya Semillina	180	180
Harina de Trigo Sol de Oro	233	233
Lecitina de Soya Droguería Cosmopolita, S.A De CV	20	20
Aceite de Hígado de Bacalao Droguería Cosmopolita, S.A De CV	80	80
Premezcla Minerales Donada por Agribrands Purina, S. A De C.V.	8	8
Premezcla Vitaminas sin Vitamina C Donada por Agribrands Purina, S. A De C.V.	17	17
Coolesterol Sigma C - 8503	2	2
$\beta$ - glucanos Stanguards, Japón	0	
Rovimix Stay - C 35 Roché	0.286	0.286
Celulosa Sigma C - 5013	9.7	7.8
<b>Análisis Químico Próximo</b>	<b>%</b>	<b>%</b>
Materia Seca	90	90
Humedad	10	10
P.C. (Nitrógeno 6.25)	39.22	39.47
Extracto Etéreo	13.86	14.43
Cenizas	8.69	8.60
Fibra Cruda	1.49	1.21
Extracto Libre de Nitrógeno	26.74	26.28
T.N. D.	82.30	83.09
E.D. Kcal Kg <sup>-1</sup> (Aprox).	3732.26	3663.55
E.M. Kcal Kg <sup>-1</sup> (Aprox).	3060.13	3003.80

Con estas dietas se diseñaron 3 tratamientos: 1) camarones alimentados con  $\beta$ - glucanos durante todo el experimento (BGP), 2) alimentados 7 días con  $\beta$ - glucanos y 7 días con la dieta control, este tratamiento fue denominado  $\beta$ -glucanos combinados (BGC) y 3) organismos alimentados solo con la dieta Control (C),. Las dietas experimentales se elaboraron con los ingredientes que se presentan en la Tabla 3. Las harinas fueron mezcladas con aceite hasta

obtener una pasta la cual fue pasada a través de un molino en el que la pasta es convertida en pellet tipo espagueti. Los espaguetis fueron secados en una estufa a 60 °C por 24 h, posteriormente fueron partidos a un tamaño conveniente y almacenados en refrigeración (4 °C) hasta su uso.

Se utilizaron 12 tanques de 90 L (4 tanques /tratamientos), los cuales fueron distribuidos al azar y abastecidos con agua de mar en flujo continuo y mantenidos en temperatura de 28 °C, salinidad de 35 ‰, pH de  $8.1 \pm 0.01$  y el amonio disuelto en valores  $< 0.02 \text{ mg}^{-L}$ . La densidad de siembra fue de 10 camarones por tanque con cuatro repeticiones por tratamiento, lo que correspondió a un total de 120 juveniles con un peso inicial promedio de  $2 \text{ g} \pm 0.05$ . Los camarones fueron alimentados a razón del 20% de su biomasa inicial, con una frecuencia de tres veces al día, a las 08, 14 y 20 h y se utilizó un fotoperiodo de 12 h luz y 12 h de oscuridad. La cantidad de alimento fue ajustada semanalmente de acuerdo con la biomasa ganada por los camarones y siguiendo las dosis descritas anteriormente. Todos los días y antes de suministrar cada toma, el alimento remanente y las exubias fueron retiradas por sifón .



*Fig. 1 Tanques Experimentales de 90 L*

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### **3.2.1.1 Crecimiento y sobrevivencia.**

El crecimiento se obtuvo cada 10 días, utilizando una muestra de 10 camarones de cada tratamiento los cuales fueron pesados en una balanza granataria digital ( $\pm 0.05\text{g}$ ) (OHAUS, ARA 520). Con el fin de reducir el estrés producido por la manipulación durante el pesaje, en cada muestreo se seleccionó un tanque diferente de cada tratamiento para mantener la independencia del muestreo.

Los cálculos para obtener el coeficiente diario de crecimiento (DGC) se hicieron a partir de la siguiente ecuación (Bureau *et al* 2000):  $DGC = 100 * (FBW^{1/3} - IBW^{1/3}) / D$ , donde:  $FBW^{1/3}$  es el peso final en g,  $IBW^{1/3}$  es el peso inicial en g y D, el número de días. Al finalizar el

experimento los camarones fueron contados y pesados con la finalidad de obtener sobrevivencia y biomasa total producida.

### **3.2.1.2 Reto Salino.**

Después de evaluar el crecimiento y la sobrevivencia, los camarones se colocaron nuevamente en sus respectivos tanques de 90 L donde permanecieron por 5 días en las mismas condiciones experimentales y de alimentación, con el propósito de que se recuperaran de la manipulación provocada durante el pesaje del último muestreo de crecimiento. Posteriormente del periodo de recuperación se llevó acabo un muestreo de 5 camarones por tratamiento para realizar las respectivas mediciones de los metabolitos sanguíneos y algunos indicadores de la respuesta inmune (Tabla 1).

Los resultados de estas primeras evaluaciones fueron consideradas la línea base del experimento (LB) o tiempo 0, como valores de referencia para compararlos con los datos obtenidos en el reto salino. Después de obtener la LB un tanque de cada tratamiento se mantuvo en la salinidad inicial (35‰), y fue denominado control. Los camarones de los tres tanques restantes de cada tratamiento fueron expuestos a un cambio brusco de salinidad 35 - 0 ‰.

Para disminuir la salinidad se procedió a bajar el nivel del agua hasta la mitad del volumen total de los tanques (45 L) de cada tratamiento. Posteriormente se elevó el nivel de agua en ambos grupos con agua dulce municipal sin cloro para los animales expuestos a baja salinidad y con agua de mar natural para los grupos control. En el caso de los camarones expuestos a 0 ‰, el agua dulce se dejó correr hasta que el agua de mar fue totalmente sustituida. El tiempo requerido para los ajustes de salinidad fue de 24 min.

Después de obtener la salinidad deseada se consideró el inicio del experimento y se procedió a muestrear 10 camarones por tratamiento a las 4, 24 y 48 h para realizar las evaluaciones mencionadas anteriormente (Tabla 4).

La resistencia de estrés fue calculado por el rango del índice de estrés acumulativo, como el valor promedio obtenido de la replica del tratamiento, donde la suma individual de la mortalidad acumulativa es dividida en los intervalos de tiempo consecutivo al que estuvieron retados los organismos (Merchie *et al.*, 1995).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

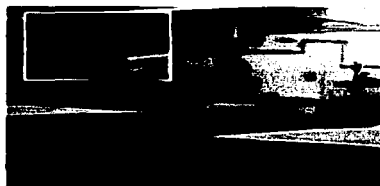


**Tabla.4** Diseño Experimental para a evaluar el efecto de un cambio brusco de salinidad en la sobrevivencia y el estado fisiológico e inmunológico de camarones *L. vannamei*.

Salinidad (%)	Dieta con $\beta$ -glucanos	Dieta control sin $\beta$ glucanos
35	1 tanque de 90 L	1 tanque de 90 L
0	1 tanque de 90 L	1 tanque de 90 L

### 3.2.1.3 Cinética inmunológica.

Este experimento consistió en conocer la forma en que los camarones ajustan algunas respuestas inmunológicas durante la aplicación de diferentes frecuencias de alimentación con dietas experimentales con BG. La procedencia de los organismos para realizar este estudio fue de un estanque externo de 20 m<sup>2</sup> mantenidos desde postlarva hasta alcanzar la talla de 7 g  $\pm$  0.05. Posteriormente los camarones se transportaron a 3 tanques de 500 L (un tanque por tratamiento), distribuidos al azar y abastecidos con agua de mar en flujo continuo a 28 ° C, salinidad a 35 ‰, pH de 8.1  $\pm$  0.01 y amonio disuelto en valores < 0.02 mg<sup>-1</sup> L (Fig. 2). La densidad de siembra fue de 200 camarones por tanque.



*Fig. 2 Tanques Experimentales de 500 l*

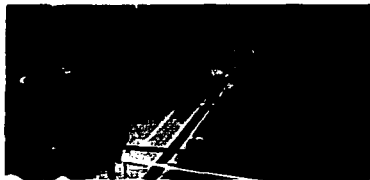
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Con el propósito de dar un tiempo considerado de recuperación para controlar el estrés producido por la captura del estanque y la transportación al laboratorio, los organismos permanecieron sin manipulación por un tiempo de 5 días. Una vez transcurrido este tiempo de recuperación se tomó una muestra de 15 organismos por tratamiento. Las propiedades del

sistema inmune de estos camarones fueron consideradas a partir de la condición inicial antes de la aplicación de las dietas comerciales. Posteriormente los camarones fueron alimentados siguiendo el mismo diseño aplicado en el primer experimento: BGP, BGC y C. El efecto de estas dietas fue evaluado cada 2 días por un periodo de 20 días en todos los tratamientos. En esta parte del estudio se midieron algunos indicadores de la respuesta inmune: Actividad de la proPO, estallido respiratorio, y la concentración de las células sanguíneas. Adicionalmente se midieron los niveles de proteínas de la hemolinfa (Tabla 2). Los detalles de estas técnicas se describirán a continuación.

### 3.2.2 Dietas comerciales con $\beta$ - glucanos en estanques externos.

Se utilizaron dos tipos de alimentos elaborados en la Empresa "Malta Clayton S.A.", clasificados como: T1 y T2 donde, T1 es una dieta base a la que se le adicionó BG y T2 es la dieta control sin BG. Se utilizaron 6 tanques de 20 m<sup>2</sup> (3 estanques por tratamiento), abastecidos con agua de mar natural, aireación constantes, temperatura ambiente, salinidad de 35 ‰, pH  $8.1 \pm 0.01$ , amonio disuelto en valores  $< 0.02 \text{ mg}^{-1} \text{ L}$  y un recambio de agua del 10 % diario (Fig.3).



*Fig. 3 Tanques Externos de 20 m<sup>2</sup>*

Los tratamientos experimentales fueron distribuido al azar, y la densidad de siembra fue de 40 camarones /m<sup>2</sup> lo que correspondió a un total de 4,800 juveniles tempranos con un peso inicial promedio de 1 g. Diariamente se registraron las variaciones de temperatura, salinidad, oxígeno disuelto, pH y una vez a la semana se midieron las concentraciones de amonio. Los camarones fueron alimentados de acuerdo a la tabla proporcionada por la empresa, con una frecuencia alimenticia de dos veces al día, a las 8 y 20 h (Tabla 5).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

*Tabla. 5. Tabla de alimentación para el cultivo de camarones Malta Clayton Hermosillo, Sonora.*

PROGRAMA DE ALIMENTACIÓN API-CAMARON						
FASE	PRODUCTO	SEMANA	PESO / PROM.	SOBREVIVENCIA	BIOMASA %	DENSIDAD (m <sup>-3</sup> )
PRECRIA	API CAMARON 1 (40%) MIGAJA	1	0.02	100	18	250
		2	0.14	85	15	212
		3	0.35	80	14	200
		4	0.70	75	13	188
		5	1.0	100	12	180
ENGORDA	API CAMARON 2 (35%) MIGAJA	6	2.3	95	10	171
		7	3.1	90	8	162
		8	4.2	88	6.4	156
		9	4.8	88	4.8	156
		10	6.1	88	4	156
		11	7	85	3.2	153
		12	8.5	85	2.8	153
		13	9.2	85	2.6	153
		14	10.1	85	2.4	153
		15	11.5	84	2.2	151
		16	12.2	84	2.1	151
		17	13	84	2	151
	18	14.13	84	1.9	151	
	19	15	83	1.9	149	
	20	16.3	83	1.8	149	
	21	17.1	82	1.7	148	
	22	18.0	82	1.6	148	
	23	18.8	82	1.5	148	
	24	19.6	81	1.4	146	
	25	20.9	81	1.3	146	
	26	22	80	1.2	144	
	27	23	80	1.0	144	
	API CAMARON 3 (30%) MIGAJA					
	API CAMARON 4 (25%) MIGAJA					

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### **3.2.2.1 Crecimiento y sobrevivencia.**

El crecimiento se obtuvo cada 10 días, utilizando una muestra de 150 camarones por dieta (50 por estanque), los cuales fueron individualmente pesados para calcular el coeficiente diario de crecimiento (CDC) utilizando la ecuación descrita anteriormente. La cantidad de alimento fue ajustada semanalmente de acuerdo a la biomasa ganada por los animales.

Antes de finalizar con el periodo de cultivo se realizó un muestreo de 24 camarones por dieta (8 por estanque). A estos animales se les evaluaron los componentes de la sangre: glucosa, lactato, acilglicéridos, colesterol, proteínas, presión osmótica, concentración de hemocianina en hemolinfa y la actividad de la proPO. Al finalizar el experimento los camarones de los estanques fueron contados con la finalidad de obtener sobrevivencia y biomasa total producida.

### **3.2. 2.2 Reto Salino.**

Para evaluar el efecto de un cambio brusco de salinidad se utilizaron 90 camarones juveniles de  $5 \text{ g} \pm 0.05$  por dieta , provenientes de los estanques externos en los que se cultivaron los camarones con dietas comerciales. Los organismos fueron colocados en 4 tanques de 500 L a razón de 45 camarones por tanque (Tabla 6). Los tanques tuvieron un flujo continuo de agua de mar conectados a un sistema de recirculación, el cual a su vez se acopló a un filtro de arena de  $20 \mu\text{m}$ , una columna des proteinizadora y luz ultravioleta. Además cada tanque contó con un filtro rápido ( $1200 \text{ L}^{-1}\text{h}$ ), acondicionado con fragmentos de cerámica y hule espuma.

Un periodo de 5 días se consideró para reducir el estrés de captura y transporte entre los estanques externos y los tanques de 500 L. Durante este periodo los camarones fueron alimentados a saciedad con las mismas dietas experimentales. La salinidad, temperatura, OD  $\text{mg}^{-1} \text{L}$ , pH, fotoperíodo de 12 h luz y 12 h de oscuridad fueron similares a los obtenidos en los estanques externos .

Una vez cumplido con el periodo de recuperación una muestra de 15 camarones por dieta fue tomada con el fin de evaluar los componentes sanguíneos y las respuestas inmunológicas mencionadas anteriormente. A estas evaluaciones se les consideró como tiempo 0. La mitad de los organismos de cada dieta fueron expuestos a un cambio brusco de salinidad (35 - 15 ‰) y la otra mitad de camarones se mantuvieron en la salinidad original (35 ‰), la cual fue considerada como control del experimento. Para disminuir la salinidad se utilizó el mismo

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

mecanismo descrito anteriormente, con la diferencia que el tiempo requerido para los ajustes de la salinidad fue de 1 hora.

Después del cambio de salinidad 7 camarones por tanque fueron muestreados a las 4, 24 y 48 h. De estos animales se determinaron los componentes sanguíneos como glucosa, lactato, acilglicéridos, colesterol, proteínas, concentración de hemocianina, presión osmótica y la actividad de la proPO. Al mismo tiempo se evaluó la sobrevivencia en el resto de los animales (Tabla 2).

**Tabla.6.** *Diseño Experimental para a evaluar el efecto de un cambio brusco de salinidad en la sobrevivencia y el estado fisiológico e inmunológico de camarones L. vannamei.*

Salinidad (%)	Dieta con $\beta$ -glucanos	Dieta control sin $\beta$ glucanos
35	1 tanque de 500 L	1 tanque de 500 L
15	1 tanque de 500 L	1 tanque de 500 L

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

### 3.2.2.3 Reto de Oxígeno.

Para evaluar el efecto de la disminución del oxígeno disuelto, de igual manera se utilizaron camarones de  $5 \text{ g} \pm 0.05$  provenientes de los estanques externos. Este experimento se dividió en dos etapas: En la primera se evaluó el efecto de la disminución del oxígeno disuelto en las respuestas fisiológicas e inmunológicas. En este caso se utilizaron 4 tanques de 500 L a razón de 45 camarones por tratamiento (Tabla 7). La mitad de los tanques fueron abastecidos con agua de mar filtrada, a estos tanques se les denominó grupo control.

La otra mitad también fueron abastecidos con agua de mar con la diferencia que el agua filtrada fue depositada primeramente a un tanque inferior desde el cual fue bombeada a los tanques experimentales (Fig. 4). En estos tanques se midió el efecto de la disminución del oxígeno disuelto en el estado fisiológico e inmunológico de los camarones.

La segunda etapa consistió en determinar la sobrevivencia después de exponer a los camarones a bajas concentraciones de oxígeno disuelto. Se utilizaron 8 tanques de 90 L ( 4 tanques por

tratamiento) (Tabla 7), en una densidad de siembra de 10 camarones por tanque. El suministro de agua a los tanques experimentales fue similar al descrito anteriormente (Fig. 4).

**Tabla.7.** *Diseño Experimental para a evaluar el efecto de la disminución del oxígeno disuelto en la sobrevivencia y el estado fisiológico e inmunológico de camarones L. vannamei.*

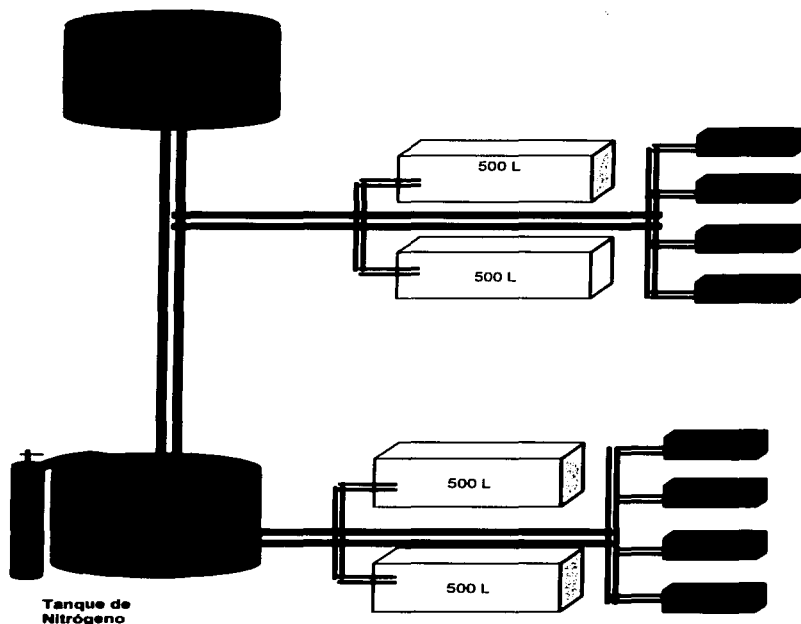
Oxígeno Disuelto (mg L <sup>-1</sup> )	Dieta con $\beta$ -glucanos	Dieta control sin $\beta$ -glucanos
5 mg L <sup>-1</sup>	1 tanque de 500 L 2 tanques de 90 L	1 tanque de 500 L 2 tanques de 90 L
2 mg L <sup>-1</sup>	1 tanque de 500 L 2 tanques de 90 L	1 tanque de 500 L 2 tanques de 90 L

Para el periodo de recuperación de los camarones y la obtención de la LB de los componentes de las sangre se siguieron los procedimientos descritos anteriormente en el experimento reto salino. Posteriormente de concluido el periodo de recuperación de 5 días se procedió a reducir el oxígeno disuelto en la mitad de los tanques de 500 L y en la mitad de los tanques de 90 L. Se utilizó gas nitrógeno el cual fue inyectado a una tasa de 4 L<sup>-1</sup>h a un tanque de 1100 L que sirvió como columna de intercambio de gases.

El agua con baja concentración de oxígeno fue bombeada a los tanques correspondientes y cada uno de los cuales fue cubierto con una lamina de plástico para evitar que el oxígeno se intercambiara con la atmósfera y de esta manera evitar alterar la concentración de oxígeno disuelto deseada. El tiempo de reducción del oxígeno disuelto de 5 mg<sup>-1</sup> l a 2 mg<sup>-1</sup> l fue de 8 h (Fig. 4).

Una vez obtenido el OD de 2 mg L<sup>-1</sup> se considero el inicio del experimento. Se muestrearon 7 camarones por tanque a las 4, 24 y 48 h para realizar las evaluaciones de los componentes sanguíneos (glucosa, lactato, acilglicéridos, colesterol proteínas, presión osmótica, hemocianina) y la actividad de la proPO. Al mismo tiempo se evaluó la sobrevivencia en los tanques de 90 L (Tabla 2; Figura 4).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



*Figura .4 Dispositivo Experimental para a evaluar el efecto de la disminución del oxígeno disuelto en la sobrevivencia y el estado fisiológico e inmunológico de camarones L. vannamei.*

### 3.3 Técnicas para la evaluación de metabolitos sanguíneos y respuestas inmunológicas.

El manejo de los animales antes de la toma de muestras de sangre es un aspecto crucial en este tipo de análisis. Esto se debe a que la manipulación en sí misma puede alterar, de manera significativa, los componentes sanguíneos. Por esta razón, previo a la extracción de la sangre (hemolinfa), los camarones fueron introducidos en un baño frío (5 °C por debajo de la temperatura inicial) para disminuir su metabolismo. Esta medida previene el que algunos de los metabolitos plasmáticos, como la glucosa y el lactato, sean alterados rápidamente por la manipulación (Racota *et al.*, 1998).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### **3.3.1 Transporte de organismos.**

El recipiente para transportar los organismos al laboratorio para el respectivo muestreo fue una hielera de 5 L, se lleno a la mitad con agua en la que fueron mantenidos los camarones, y se midió la temperatura. Posteriormente se añadió el hielo en una bolsa sellada manteniéndolo hasta que la temperatura haya disminuido 5 °C por debajo del registro inicial. Los camarones fueron capturados con la red de mango, tratando de evitar una manipulación excesiva. Después de cinco minutos de permanencia en este recipiente, se realizó la extracción de la sangre.

### **3.3.2 Obtención de Hemolinfa.**

Pasados los cinco minutos, es decir, una vez que los camarones fueron acondicionados al ambiente de baja temperatura y de luz ambiental, se tomaron las muestras de sangre, los organismo fueron secados para evitar un posible contacto entre la hemolinfa y el agua.

Para extraer la sangre se utilizó una jeringa hipodérmica (de 1 ml con aguja ultrafina de 29 G x 13 mm para juveniles menores de 4 g, y con aguja 25 G x 16 mm para mayores de 4 g). La jeringa contenía aproximadamente 100 µL de solución isotónica para camarón (8 °C): (SIC-EDTA): 450 mM NaCl, 10 mM KCl, 10 mM EDTA.Na<sub>2</sub>, 10 mM HEPES, pH 7.3, 850 mOsm Kg<sup>-1</sup> (Vargas-Albores *et al.*, 1993). Antes de la extracción de sangre, la solución anticoagulante se descartó completamente. La hemolinfa se extrajo del seno ventro lateral del abdomen con ayuda de la jeringa. La aguja se insertó suavemente a través de la membrana artrodial de la quinta pata, para tener acceso al seno. Lentamente se deslizó la aguja y, al mismo tiempo, se retiró suavemente el émbolo de la jeringa, de tal forma que al momento en que la aguja entró en contacto con la sangre ésta pudiera fluir hacia la jeringa. Esta acción permitió que no se formaran burbujas en la hemolinfa, evitando así que se acelere el proceso de coagulación y con ello, la alteración de los componentes sanguíneos.

Inmediatamente después de ser extraída la hemolinfa, se depositó sobre un trozo de parafilm nuevo, el cual estaba colocado sobre un recipiente plano frío (hielo sólido embolsado, placa congelante). El volumen total de hemolinfa fue de 180 µL y fue separado de la siguiente manera: 1) 10 µL para el análisis de la hemocianina, 2) 20 µL para presión osmótica, 3) 20 µL para hemocitos, 4) estallido respiratorio, 5) 80 µL para el análisis de los cinco metabolitos sanguíneos: glucosa, lactato, colesterol, acilglicéridos y proteínas y la proPO.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



### **3.3.2.1 Hemocianina.**

En una cubeta ultravioleta de 1 ml con 990  $\mu\text{L}$  de agua destilada se colocaron 10  $\mu\text{L}$  de la muestra de hemolinfa con una micropipeta, posteriormente se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 335 nm en un espectrofotómetro (Spectronic modelo 21 D) (Chen *et al.*, 1993).

#### **Cálculo**

La concentración de hemocianina (Hc) se calculó utilizando el coeficiente de extinción =17.26.  $Hc = (DO/17.26)*FD = \text{mmol/L}$ , donde FD es el factor de dilución. Si se utilizaron 10  $\mu\text{L}$  en 990  $\mu\text{L}$  entonces  $1000/10 = 100$ .

### **3.3.2.2 Presión Osmótica.**

La presión osmótica se determinó en 20  $\mu\text{L}$  de hemolinfa, en un microosmómetro (Osmete, 20 plus). La capacidad osmótica se calculó a partir de la diferencia entre la presión osmótica de la hemolinfa y la del agua del medio (Lignot *et al.*, 1999).

### **3.3.2.3 Cuento de Hemocitos.**

Se tomó una muestra de 20  $\mu\text{l}$  de hemolinfa directamente y se mezcló en tres volúmenes de solución Alsever-Formol 10 % ( 113mM glucosa, 27.2 mM citrato de sodio, 2.8 mM ácido cítrico, 71.9 mM Na Cl y formol 10 %) (Le Moullac *et al.*, 1997). Posteriormente se guardó en refrigeración hasta su análisis. El conteo y la caracterización de los hemocitos se realizaron en la cámara de Malassez de 0.01  $\text{mm}^3$  de acuerdo a Le Moullac *et al.*, (1997) , en base al tamaño, a forma y el contenido granular se clasificaron como células granulares (CG), semigranulares (CSG) y hialinas (CH). Se tomaron al azar cuatro cuadros los cuales fueron contados individualmente.

### **3.3.2.4 Estallido Respiratorio.**

Este oxígeno radical es cuantificado por la técnica NBT, de acuerdo al protocolo optimizado por (Muñoz *et al.*, 2000). La tasa de producción de oxígeno es obtenida por la división del valor de la absorbancia de la muestra estimulada por el valor de la absorbancia de la muestra sin estimulación.

En una microplaca se colocaron 50  $\mu\text{l}$  de una solución salina de Hanks modificada (MHSBS.3) (Ca  $^{++}$  12 mM; Mg  $^{++}$  26 mM) y posteriormente se adicionó 50  $\mu\text{l}$  de hemolinfa, la cual se incubó 30 min.

TESIS CON  
FALSA DE ORIGEN

Después de la incubación se desecho el sobrenadante y se adicionó 50  $\mu$ l de una solución salina de Hanks modificada (MHBSS.2) ( $\text{Ca}^{++}$  6 mM;  $\text{Mg}^{++}$  13 mM) cuidadosamente en todos los pozos de la placa.

En las muestras para evaluar la actividad básica se agregó 50  $\mu$ l de la solución (MHSBS.3), y en las muestras para evaluar la células estimuladas se agregó 50  $\mu$ l de zimosan diluido en solución salina de Hank.

Posteriormente a todas las muestras se les agregó 50  $\mu$ l de NBT y se incubaron por dos horas protegidas de la luz. Después de la incubación se descartó el sobrenadante y se lavaron las muestras con 200  $\mu$ l de metanol al 100 % y se descartó el sobrenadante.

Se adicionó 200  $\mu$ l metanol al 70 %, esto se realizó dos veces y nuevamente se procedió a descartar el sobrenadante. Posteriormente se dejó secar la microplaca por un espacio de 15 min a temperatura ambiente. Después del tiempo de secado se adicionaron 120  $\mu$ l de 2 M hidróxido de potasio (KOH) y 140  $\mu$ l de dimetil sulfoxido (DMSO). Posteriormente las muestras se leyeron a 630 nm. Calculo.  $A/B \times 1000000 / CT$ , donde: A = Muestras estimulada, B = Muestras sin estimular y CT = Células Totales.

### **3.3.3. Obtención del plasma.**

Los metabolitos sanguíneos no se evalúan directamente en la hemolinfa, sino que fue necesario diluirla en una solución anticoagulante (SIC-EDTA): por cada volumen de hemolinfa se requieren dos de SIC-EDTA. Se tomaron 80  $\mu$ L de la muestra de hemolinfa y se mezclaron en 160  $\mu$ L con el anticoagulante contenido en el tubo eppendorf. Ya con la hemolinfa diluida, los tubos se centrifugaron a 2500 rpm, por 3 min a 4  $^{\circ}$ C.

Después de centrifugar se retiró el sobrenadante (plasma + SIC-EDTA) de los tubos, introduciendo lentamente la punta de la micropipeta sin tocar el fondo, donde fue posible observar el paquete celular. El sobrenadante se depositó en tubos Eppendorf nuevos y marcados con la misma secuencia de números que se siguió para las muestras de sangre. Los tubos con el plasma se mantuvieron a una temperatura de 2 – 8  $^{\circ}$ C hasta su respectivo análisis. El tubo con el paquete celular se utilizó para medir la proPO.

### **3.3.4 Paquete celular.**

El sistema profenoloxidasa (proPO) se encuentra compartamentalizado principalmente en las células granulares, el degranulado de hemocitos ha sido utilizado como fuente de fenoloxidasa

(Hernández-López *et al.*, 1996). Para ello, después de separar el plasma, al paquete celular se le agregó SIC-EDTA, un volumen similar a la suma de hemolinfa más anticoagulante, la muestra se centrifugó a 800 g por 3 min. a 4 °C en una centrífuga (CENTRA MP 4 R), el sobrenadante fue desechado y el paquete celular se resuspendió dos o tres veces con amortiguador de cacodilatos (100 mM de cacodilatos, 10 mM Ca Cl<sub>2</sub>, pH 7) de tal manera que se observó como el paquete celular se desagrega generándose una solución turbia (el volumen empleado de cacodilatos correspondió a la mitad del volumen de hemolinfa más SIC-EDTA, esta solución estaba en 8 °C y se centrifugó a 14000 rpm por 2 min. a 4 °C).

### 3.3.5 Cuantificación de metabolitos en el plasma

La determinación de los metabolitos sanguíneos se evaluó utilizando Kits comerciales con los que, a partir de las reacciones enzimáticas, se producen cambios de color diferencial en respuesta a la concentración de cada metabolito. La densidad óptica de las concentraciones se leyeron en el lector de microplacas (BIO-RAD Modelo 550), de acuerdo a Hernández-López (1996).

Los cálculos se realizaron con los valores del intercepto y la pendiente de la regresión lineal obtenida de una curva patrón, los cuales fueron sustituidos en una ecuación de la recta:

$y = a + bx$ , donde: a = intercepto; b = pendiente; x = concentración (mg ml<sup>-1</sup>); y = Densidad óptica de la muestra (DO<sub>m</sub>), entonces  $x = ((DO_m - DO_{\text{del blanco}}) - (a/b)) * FD$ . El factor de dilución (FD) = 3 ( la muestra de hemolinfa se diluyó en dos volúmenes de SIC-EDTA), este calculo es para glucosa, lactato, acilglicéridos, colesterol. Para proteínas es el mismo calculo lo que cambia es el FD = 300 ( 3 x 100, el volumen de la muestra de plasma se diluyó 100 veces en agua estéril).

#### **Determinación de glucosa.**

El principio de esta determinación se basa en que la glucosa presente en la hemolinfa, es transformada por la glucosa oxidasa, en ácido glucónico y peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>); éste último en presencia de peroxidasa, oxida el sistema cromógeno (4-aminofenazona / fenol) convirtiéndolo en un compuesto de color rosa (Burrin *et al.*, 1985).

Para ello, se colocaron 10 µl de plasma en una microplaca y se adicionaron 200 µl de una solución reactiva provista por el kit comercial (Bayer Sera-Pack, Cat. 6634). La reacción se incubó a temperatura ambiente durante 30 min. y se registró la absorbancia a 540 nm.

#### **Determinación de lactato.**

El ácido láctico es convertido a piruvato y peróxido por la lactato oxidasa. En presencia del  $H_2O_2$  formado, la peroxidasa cataliza la condensación oxidativa de cromógenos que producen un color violeta (Marbach *et al.*, 1967).

Se colocaron 10  $\mu$ l de plasma en una microplaca y se adicionaron 200  $\mu$ l de una solución reactiva provista por el kit comercial Sigma, Cat. 710-10. La reacción se incubó a temperatura ambiente durante 30 min. y se registró la absorbancia a 540 nm.

#### **Determinación de los acilglicéridos.**

El glicerol liberado en la hidrólisis de los triacilglicéridos, por la acción de la lipoproteína lipasa se convierte mediante la glicerol-quinasa en glicerol - 3 fosfato, que se oxida por la glicerol - fosfato oxidasa en dihidroxiacetona y peróxido de hidrógeno. En presencia de peroxidasa el  $H_2O_2$  oxida al cromógeno (4 - aminoantiripina / p - clorofenol) en un compuesto de color violeta (Fossati *et al.*, 1982).

Se colocaron 10  $\mu$ l de plasma en una microplaca y se adicionaron 200  $\mu$ l de una solución reactiva provista por el kit comercial Bayer Sera-Pack Cat. 6684. La reacción se incubó a temperatura ambiente durante 10 min. y se registró la absorbancia a 540 nm.

#### **Determinación del colesterol.**

Los ésteres de colesterol son hidrolizados por la colesterol éster hidrolasa para liberar colesterol y ácidos grasos. El colesterol libre existente junto con el producido por esta reacción, se oxida por la colesterol oxidasa en  $\Delta^4$  - colesteno y peróxido de hidrógeno. Este último en presencia de peroxidasa oxida el sistema cromógeno (4 - aminoantiripina / fenol) en un compuesto de color rosa (Allain, 1974).

Se colocaron 10  $\mu$ l de plasma en una microplaca y se adicionaron 200  $\mu$ l de una solución reactiva provista por el kit comercial Bayer Sera-Pack Cat. 6670. La reacción se incubó a temperatura ambiente durante 15 min. y se registró la absorbancia a 540 nm.

#### **Determinación de las proteínas.**

Se determina la concentración de proteína solubilizada a través de la acción de una solución ácida de color azul Coomassie G- 250, el cual se liga a los aminoácidos primariamente básicos y aromáticos, especialmente la argina.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Para la evaluación de las proteínas se tomo 10  $\mu$ l de plasma y se diluyeron en 1000  $\mu$ l de agua destilada. Posteriormente se coloco 10  $\mu$ l del plasma diluido en una microplaca y se adicionaron 200  $\mu$ l de una solución reactiva provista por el kit comercial BIO-RAD Cat. 500-0006 (Bradford, 1976). La reacción se incubó a temperatura ambiente durante 5 min. y se registró la absorbancia a 595 nm. La concentración de las proteínas (mg/ml) se calculó con una curva patrón a partir de diluciones de una menor a mayor concentración de la solución estándar de las proteínas.

### **3.3.6 Determinación del glucógeno en la glándula digestiva.**

La cantidad de glucógeno se determinó de acuerdo a Dubois *et al.*, (1965). Se extrajo un corte del tejido (0.025 – 0.050 g ) y se pesó en una balanza analítica OHAUS E 011440, se homogeneizó en 200  $\mu$ l de ácido tricloroacético (5 %), después se centrifugó a 7000 rpm en una centrífuga Eppendorf 5415 C durante 6 min. Se utilizó 100  $\mu$ l del sobrenadante y se le añadió 500  $\mu$ l de etanol (95 %). Se incubó durante 3 h a 37°C y se centrifugó a 7000 rpm por 15 min. Posteriormente se descartó el sobrenadante y el precipitado se disolvió con 20  $\mu$ l de agua hirviendo y se agregó 1 ml de ácido sulfúrico , 200  $\mu$ l de fenol (5%). A continuación se colocaron 200  $\mu$ l de la muestra en microplacas y se registró la absorbancia a 490 nm.

## **IV. Análisis Estadístico.**

Se utilizó el Análisis de Varianza de dos vías para evaluar la tasa de crecimiento de los camarones alimentados con los diferentes tipos de dietas en los diferentes días experimentales. Una ANOVA de una vía con replica para el análisis de los efectos de los diferentes tipos de alimentos suministrados sobre cada uno de los indicadores fisiológicos e inmune utilizados. Además se aplico la Prueba de Duncan para establecer diferencias específicas entre los tratamientos ( $p < 0.05$ ).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## V. Resultados.

### 5.1 Evaluación de las dietas con o sin $\beta$ - glucanos elaboradas en el laboratorio.

#### 5.1.1 Crecimiento.

Los resultados obtenidos mostraron que las dietas con o sin BG no afectaron significativamente el % coeficiente diario de crecimiento (% CDC) ( $P > 0.05$ ). Un valor promedio de  $1.9 \pm 0.07$  fue obtenido como % CDC de los camarones alimentados con las tres dietas (Tabla 8).

*Tabla. 8 % Coeficiente diario de crecimiento de camarones juveniles L. vannamei alimentados con tres Dietas experimentales elaboradas en el laboratorio.*

Dietas	% Coeficiente Diario de Crecimiento
BGP	$1.9 \pm 0.09$
BGC	$2.0 \pm 0.02$
C	$1.8 \pm 0.10$

#### 5.1.2 Sobrevivencia antes del reto.

El análisis de varianza indico que no existen diferencias significativas entre los tratamientos ( $P > 0.05$ ), mostrando una sobrevivencia promedio  $78 \pm 7.0$ .

*Tabla. 9 Sobrevivencia de camarones juveniles L. vannamei alimentados con tres Dietas experimentales elaboradas en el laboratorio.*

Dietas	Sobrevivencia
BGP	$83.4 \pm 6.64$
BGC	$64.4 \pm 10.9$
C	$85.4 \pm 4.60$

#### 5.1.3 Sobrevivencia después del reto salino.

Se observó que los animales alimentados con la dieta BGP presentaron la mayor sobrevivencia con un resultado final del 70 %. El tratamiento BGC registró un valor del 68%, mientras que en el grupo control fue del 62 %. Es notorio observar que la evaluación del índice de estrés acumulativo en los camarones alimentados con la dieta BGP y BGC presentaron una mayor tendencia a la resistencia, en contraste con los camarones de la dieta C, pero estadísticamente no fue significativo ( $P > 0.05$ ; Fig. 5).

TESTS CON  
FALLA DE ORIGEN

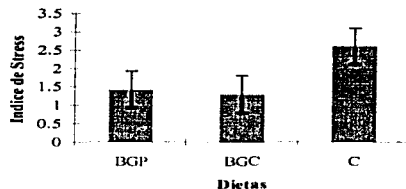


Figura 5. Variaciones del índice de estrés acumulativo de camarones juveniles *L. vannamei* después de ser expuesto al cambio salino. Valores dados en promedio.

## 5.2 Evaluaciones Bioquímico Fisiológicas.

### 5.2.1 Presión Osmótica.

El ANOVA realizado a los resultados de la presión osmótica mostró un efecto significativo del tipo de dieta, del período experimental y su interacción ( $P < 0.05$ ; Tabla 10). Una reducción significativa fue observada a las 48 h del reto en todas las dietas experimentales. Los valores observados resultaron ser 673, 542, 476  $\text{mOsm kg}^{-1}$  de los valores observados en el tiempo 0, respectivamente ( $P < 0.05$ , Fig. 6).

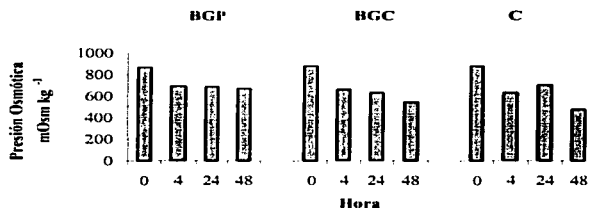


Figura 6. Variaciones de los niveles de la presión osmótica de camarones *L. vannamei* después de ser expuestos a un reto salino. Valores dados en promedio  $\pm$  Error Estándar.

### 5.2.2 Glucógeno en la glándula digestiva.

Veinticuatro horas después del reto salino un aumento significativo del glucógeno se observó en los tratamientos BGP y C ( $P < 0.05$ ; Tabla 10) estos valores resultaron ser 161 y 172 % mayores que los registrados antes del reto salino. Sin embargo a las 48 h del cambio salino se observó claramente que los camarones alimentados con las dietas BGP y BGC

mostraron una reducción significativa del 43 y 64 % respectivamente. Mientras que los camarones alimentados con la dieta C regresaron a sus valores iniciales ( $P > 0.05$  ; Fig. 7).

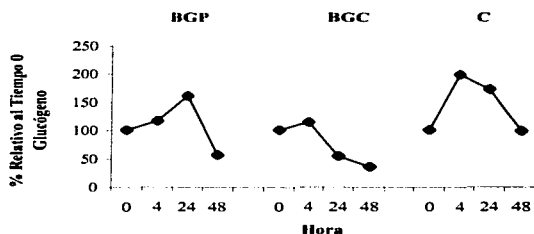


Figura 7. Variaciones de los niveles de glucógeno en la glándula digestiva de camarones *L. vannamei* después de ser expuestos a un reto salino. Valores dados en promedio  $\pm$  Error Estándar.

### 5.2.3 Glucosa.

La frecuencia de aplicación de las dietas con BG afectó de manera distinta a los ajustes de la glucosa sanguínea llevados a cabo por los camarones expuestos a un reto salino ( $P < 0.05$ ; Tabla 10). Un aumento significativo del 65 % de la glucosa fue observada después de 4 h del cambio de salinidad en los camarones alimentados con BGP. En contraste, una reducción del 37% de la glucosa fue detectada después del reto salino a las 48 h en los camarones alimentados con la dieta C ( $P < 0.05$ ). Los camarones alimentados con dietas BGC no mostraron un cambio significativo en los niveles de glucosa después de haber sido sometidos al reto salino ( $P > 0.05$ ; Fig. 8).

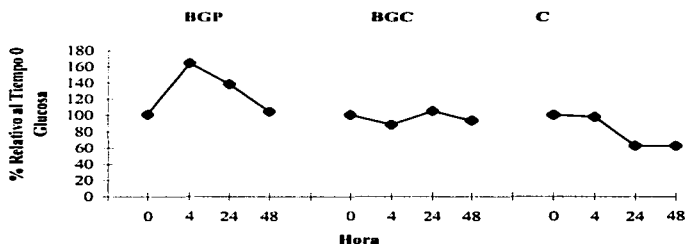


Figura 8. Variaciones de los niveles de glucosa sanguínea de camarones *L. vannamei* después de ser expuestos a un reto salino. Valores dados en promedio  $\pm$  Error Estándar.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



### 5.2.4 Lactato.

Una reducción significativa del lactato sanguíneo fue observada como consecuencia del cambio de salinidad ( $P < 0.05$ ; Tabla 10) . Es notorio que a las 48 h de haber cambiado la salinidad los niveles de lactato fueron 89.8, 8.7 y 6.7 % de los valores observados antes del reto ( $P < 0.05$ ; Fig.9).

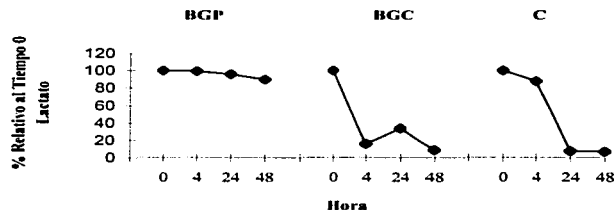


Figura 9. Variaciones de los niveles de lactato en sangre de camarones *L. vannamei* después de ser expuestos a un reto salino. Valores dados en promedio  $\pm$  Error Estándar.

### 5.2.5 Acilglicéridos.

Una reducción del 57 % de acilglicéridos fue observada después de las 48 h del cambio salino en los camarones alimentados con la dieta C ( $P < 0.05$ ; Tabla 11). En contraste, un decremento paulatino se mostró en los alimentados con las dietas BGP y BGC mostrando una reducción final del 35 % y 26 % de acilglicéridos con respecto a los valores iniciales ( $P < 0.05$ ; Fig.10).

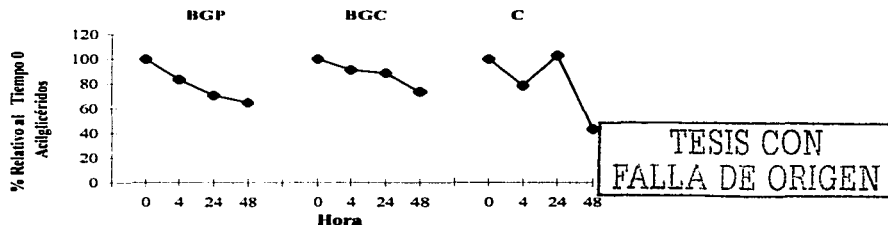


Figura 10. Variaciones de los niveles de Acilglicéridos en sangre de camarones *L. vannamei* después de ser expuestos a un reto salino. Valores dados en promedio  $\pm$  Error Estándar.

**Tabla 10.** Metabolitos sanguíneos de juveniles de *L. Vannamei* alimentados con dos dietas elaboradas en el laboratorio y expuestos a un cambio brusco de salinidad. Valores como promedio  $\pm$  Error Estándar.

Metabolitos	BGP		BGC		C	
<b>Presión Osmótica, mOsm kg<sup>-1</sup></b>						
0	871.0 <sup>a</sup>	$\pm$ 29.80	884.0 <sup>a</sup>	$\pm$ 28.74	886.0 <sup>a</sup>	$\pm$ 10.09
4	694.4 <sup>a</sup>	$\pm$ 20.74	660.0 <sup>b</sup>	$\pm$ 4.930	631.0 <sup>b</sup>	$\pm$ 12.52
24	691.0 <sup>a</sup>	$\pm$ 11.52	633.0 <sup>b</sup>	$\pm$ 16.56	704.2 <sup>b</sup>	$\pm$ 8.32
48	673.4 <sup>b</sup>	$\pm$ 24.87	542.2 <sup>c</sup>	$\pm$ 33.81	476.0 <sup>c</sup>	$\pm$ 8.56
<b>Glucógeno, mg g<sup>-1</sup></b>						
0	8.74 <sup>a</sup>	$\pm$ 0.916	11.90 <sup>a</sup>	$\pm$ 0.439	5.39 <sup>b</sup>	$\pm$ 1.59
4	10.25 <sup>a</sup>	$\pm$ 3.141	13.69 <sup>a</sup>	$\pm$ 0.723	10.70 <sup>a</sup>	$\pm$ 1.62
24	14.08 <sup>a</sup>	$\pm$ 4.131	6.477 <sup>a</sup>	$\pm$ 0.912	9.30 <sup>a</sup>	$\pm$ 2.74
48	5.02 <sup>b</sup>	$\pm$ 2.095	4.307 <sup>b</sup>	$\pm$ 1.605	5.35 <sup>b</sup>	$\pm$ 0.58
<b>Glucosa, mg ml<sup>-1</sup></b>						
0	0.320 <sup>abcd</sup>	$\pm$ 0.040	0.430 <sup>bcd</sup>	$\pm$ 0.060	0.600 <sup>a</sup>	$\pm$ 0.060
4	0.530 <sup>abcd</sup>	$\pm$ 0.030	0.380 <sup>bcd</sup>	$\pm$ 0.100	0.590 <sup>ab</sup>	$\pm$ 0.080
24	0.450 <sup>abcd</sup>	$\pm$ 0.050	0.450 <sup>abcd</sup>	$\pm$ 0.060	0.380 <sup>bcd</sup>	$\pm$ 0.020
48	0.340 <sup>bcd</sup>	$\pm$ 0.020	0.400 <sup>bcd</sup>	$\pm$ 0.050	0.380 <sup>bcd</sup>	$\pm$ 0.030
<b>Lactato, mg ml<sup>-1</sup></b>						
0	0.056 <sup>ab</sup>	$\pm$ 0.027	0.092 <sup>bc</sup>	$\pm$ 0.041	0.140 <sup>ab</sup>	$\pm$ 0.065
4	0.055 <sup>abc</sup>	$\pm$ 0.029	0.015 <sup>ab</sup>	$\pm$ 0.011	0.203 <sup>abc</sup>	$\pm$ 0.098
24	0.054 <sup>abc</sup>	$\pm$ 0.029	0.031 <sup>abc</sup>	$\pm$ 0.021	0.017 <sup>a</sup>	$\pm$ 0.007
48	0.050 <sup>bc</sup>	$\pm$ 0.024	0.008 <sup>bc</sup>	$\pm$ 0.002	0.015 <sup>c</sup>	$\pm$ 0.008

Promedios seguidos de letras diferentes en cada metabolito indica diferencias significativa ( $P < 0.05$ ).

### 5.2.6 Colesterol.

El ANOVA aplicado mostró que los niveles de colesterol fueron afectados por el tiempo de exposición ( $P < 0.05$ ; Tabla 11). Después de las 4 h del reto salino un aumento significativo del 85 % fue observado en los camarones alimentados con BGC y del 25 % en los alimentados con la dieta C. Sin embargo los valores a las 48 h resultaron ser 47, 49 y 29 % de los obtenidos antes de aplicar el reto salino, BGP, BGC, C, respectivamente ( $P < 0.05$ ; Fig. 11).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

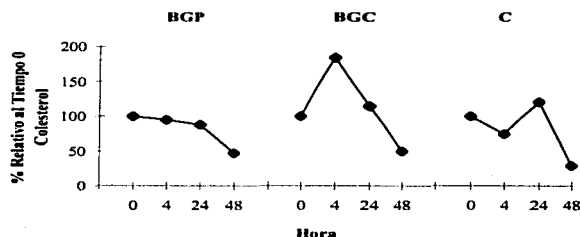


figura 11. Variaciones de los niveles de colesterol en sangre de camarones *L. vannamei* después de ser expuestos a un reto salino. Valores dados en promedio  $\pm$  Error Estándar.

Tabla 11. Metabolitos sanguíneos de juveniles de *L. Vannamei* alimentados con dos dietas elaboradas en el laboratorio y expuestos a un cambio brusco de salinidad. Valores como promedio  $\pm$  Error Estándar.

Metabolitos	BGP		CBG		C	
<b>Acilglicéridos, mg ml<sup>-1</sup></b>						
0	0.30 <sup>a</sup>	$\pm$ 0.06	0.25 <sup>a</sup>	$\pm$ 0.04	0.32 <sup>a</sup>	$\pm$ 0.02
4	0.25 <sup>a</sup>	$\pm$ 0.03	0.23 <sup>a</sup>	$\pm$ 0.06	0.26 <sup>a</sup>	$\pm$ 0.02
24	0.21 <sup>b</sup>	$\pm$ 0.02	0.22 <sup>a</sup>	$\pm$ 0.04	0.33 <sup>a</sup>	$\pm$ 0.04
48	0.20 <sup>b</sup>	$\pm$ 0.02	0.18 <sup>b</sup>	$\pm$ 0.01	0.14 <sup>b</sup>	$\pm$ 0.01
<b>Colesterol, mg ml<sup>-1</sup></b>						
0	0.30 <sup>ab</sup>	$\pm$ 0.04	0.23 <sup>bc</sup>	$\pm$ 0.02	0.36 <sup>ab</sup>	$\pm$ 0.07
4	0.29 <sup>abc</sup>	$\pm$ 0.03	0.43 <sup>ab</sup>	$\pm$ 0.04	0.27 <sup>abc</sup>	$\pm$ 0.03
24	0.27 <sup>abc</sup>	$\pm$ 0.03	0.27 <sup>abc</sup>	$\pm$ 0.03	0.43 <sup>a</sup>	$\pm$ 0.06
48	0.14 <sup>bc</sup>	$\pm$ 0.02	0.12 <sup>bc</sup>	$\pm$ 0.03	0.10 <sup>c</sup>	$\pm$ 0.01

Promedios seguidos de letras diferentes en cada metabolito indica diferencias significativa ( $P < 0.05$ ).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### 5.2.7 Proteínas.

Como resultado de la prueba de estrés salino se observó que la frecuencia de aplicación de las dietas no arrojó diferencias significativamente en los ajustes de proteínas en sangre ( $P < 0.05$ ; Tabla 12). Los valores observados de las proteínas sanguíneas en todos los tratamientos mostraron un incremento significativo en los dos primeros tiempos de exposición al cambio salino. En contraste, a las 48 h del reto salino se observó que las

proteínas regresaron a sus valores iniciales, excepto los camarones alimentados con BGC que presentaron un aumento significativo del 17 % ( $P < 0.05$ ; Fig. 12).

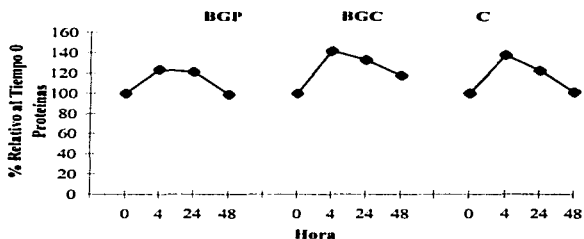


Figura 12. Variaciones de los niveles de proteína en sangre de camarones *L. vannamei* después de ser expuestos a un reto salino. Valores dados en promedio  $\pm$  E.S

### 5.2.8 Hemocianina.

Las variaciones de hemocianina no mostraron diferencias significativas por el tipo de dieta y ni por el cambio salino ( $P > 0.05$  ; Tabla 12, Fig. 13) .

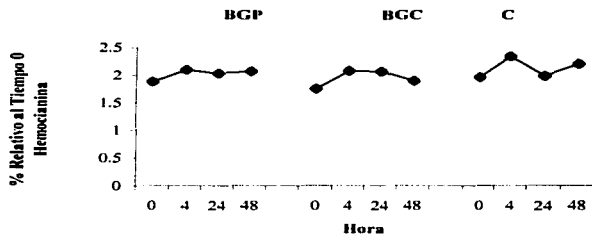


Figura 13. Variaciones de los niveles de hemocianina en sangre de camarones *L. vannamei* después de ser expuestos a un reto salino. Valores dados en promedio  $\pm$  Error Estándar.

TESIS CON  
PALABRA DE ORIGEN

**Tabla 12.** Metabolitos sanguíneos de juveniles de *L. Vannamei* alimentados con tres dietas elaboradas en el laboratorio y expuestos a un cambio brusco de salinidad. Valores como promedio  $\pm$  Error Estándar.

Metabolitos	BGP			CBG			C		
<b>Proteínas, mg ml<sup>-1</sup></b>									
0	104.26 <sup>ab</sup>	$\pm$	6.54	103.26 <sup>b</sup>	$\pm$	4.49	81.92 <sup>a</sup>	$\pm$	6.83
4	128.55 <sup>a</sup>	$\pm$	5.64	116.36 <sup>ab</sup>	$\pm$	23.53	142.27 <sup>ab</sup>	$\pm$	3.28
24	126.13 <sup>a</sup>	$\pm$	7.75	109.06 <sup>ab</sup>	$\pm$	16.62	126.23 <sup>a</sup>	$\pm$	4.47
48	102.97 <sup>ab</sup>	$\pm$	2.10	96.16 <sup>ab</sup>	$\pm$	4.35	104.20 <sup>ab</sup>	$\pm$	5.86
<b>Hemocianina, mmol l<sup>-1</sup></b>									
0	1.88 <sup>a</sup>	$\pm$	0.19	1.75 <sup>a</sup>	$\pm$	0.25	1.95 <sup>a</sup>	$\pm$	0.15
4	2.09 <sup>a</sup>	$\pm$	0.14	2.08 <sup>a</sup>	$\pm$	0.41	2.33 <sup>a</sup>	$\pm$	0.19
24	2.03 <sup>a</sup>	$\pm$	0.10	2.06 <sup>a</sup>	$\pm$	0.12	1.99 <sup>a</sup>	$\pm$	0.18
48	2.06 <sup>a</sup>	$\pm$	0.06	1.89 <sup>a</sup>	$\pm$	0.26	2.19 <sup>a</sup>	$\pm$	0.03

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### 5.3 Evaluaciones inmunológicas.

#### 5.3.1 profenoloxidas (proPO).

La actividad de la proPO fue afectada significativamente por la interacción Dieta - Tiempo. No obstante, se observó que 4 h después del reto los resultados de la proPO de los camarones alimentados con la dieta BGP fue significativamente mayor que la observada en los demás tratamientos. En contraste, a las 48 h se observó una reducción significativa del 19 % ( $P < 0.05$ ; Tabla 13; Fig. 14). Mientras que, en el tratamiento BGC mostró una disminución de la proPO a las 4 h del reto y posteriormente incremento sus niveles. Sin embargo los camarones alimentados con la dieta C mostraron un decremento significativo de la actividad de la proPO a las 24 h del reto del 59 % ( $P < 0.05$ ).

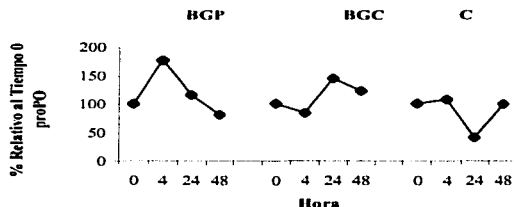
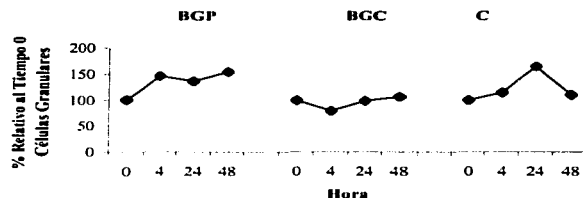


Figura 14. Variaciones de los niveles de proPO de camarones *L. vannamei* después de ser expuestos a un reto salino. Valores dados en promedio  $\pm$  Error Estándar.

#### 5.3.2 Células Granulares.

El ANOVA aplicado mostró que los niveles de CG no fueron afectados significativamente por la interacción Dieta - Tiempo ( $P > 0.05$ , Tabla 13). Cabe mencionar que los camarones alimentados con la dieta BGP registraron concentraciones mayores a las observadas antes del reto, mientras que los camarones alimentados con BGC mostraron una reducción a las 4 h del cambio salino del 21 % de su valor inicial respectivamente ( $P > 0.05$ ; Fig.15).

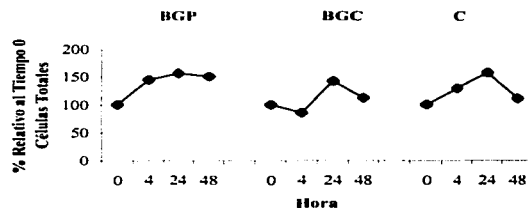
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



**Figura 15.** Variaciones de los niveles de la células granulares de camarones *L. vannamei* después de ser expuestos a un reto salino. Valores dados en promedio  $\pm$  Error Estándar

### 5.3.3 Células Totales.

Las dietas suministradas no produjeron diferencias significativas en los niveles de células totales de los camarones expuestos a un cambio salino ( $P > 0.05$ ; Tabla 13). Aunque el tratamiento BGC mostró una concentración menor de células totales del 14 % a las 4 h de ser expuestos al cambio salino, pero estadísticamente no fue significativo. ( $P > 0.05$ ; Fig. 16).



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Figura 16.** Variaciones de los niveles de la células totales de camarones *L. vannamei* después de ser expuestos a un reto salino. Valores dados en promedio  $\pm$  Error Estándar.

### 5.3.4 Relación proPO/Células Granulares.

Una reducción significativa del 75 % de los niveles de la relación proPO/CG fue observada a las 24 h como consecuencia del cambio de salinidad en los camarones alimentados con la dieta BGC ( $P < 0.05$ ; Fig 17). Además es notorio observar que los camarones alimentados con la dieta BGP mostraron una disminución continua de la razón proPO/CG después de las 4 h del reto salino del 15 y 48 % respectivamente (Fig. 17;  $P < 0.05$ ). En contraste, en

los camarones alimentados con la dieta C se observó un aumento significativo de la relación proPO/CG, durante el cambio brusco de salinidad ( $P < 0.05$ ; Fig 17).

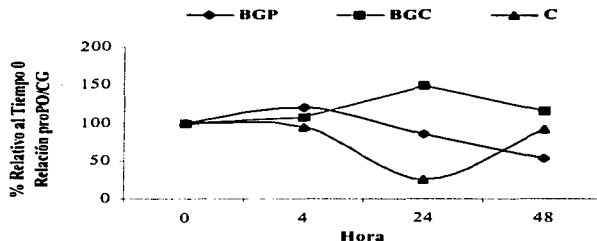


Figura 17. Variaciones de los niveles de la Relación proPO / Células granulares de camarones *L. vannamei* después de ser expuestos a un reto salino. Valores dados en promedio  $\pm$  Error Estándar.

Tabla.13 Indicadores inmunológicos de la respuesta inmune de juveniles de *Litopenaeus vannamei* alimentados con dos dietas elaboradas en el laboratorio y expuestos a un cambio brusco de salinidad. Valores promedio  $\pm$  Error Estándar.

Metabolitos	BGP	CBG	C
proPO, 490 nm			
0	0.634 <sup>b</sup> $\pm$ 0.90	0.466 <sup>b</sup> $\pm$ 0.13	0.712 <sup>a</sup> $\pm$ 0.04
4	1.119 <sup>a</sup> $\pm$ 0.13	0.393 <sup>b</sup> $\pm$ 0.33	0.768 <sup>a</sup> $\pm$ 0.02
24	0.734 <sup>a</sup> $\pm$ 0.12	0.675 <sup>a</sup> $\pm$ 0.19	0.294 <sup>b</sup> $\pm$ 0.05
48	0.511 <sup>b</sup> $\pm$ 0.12	0.573 <sup>b</sup> $\pm$ 0.17	0.712 <sup>a</sup> $\pm$ 0.04
Cél. Totales, cel mm <sup>3</sup>			
0	13600.0 <sup>a</sup> $\pm$ 2180.0	12160.0 <sup>a</sup> $\pm$ 3103.6	10666.7 <sup>a</sup> $\pm$ 1782.8
4	19733.3 <sup>a</sup> $\pm$ 8279.5	10400.0 <sup>a</sup> $\pm$ 5600.0	13733.3 <sup>a</sup> $\pm$ 1804.5
24	21333.3 <sup>a</sup> $\pm$ 6255.7	17300.0 <sup>a</sup> $\pm$ 3823.6	16853.3 <sup>a</sup> $\pm$ 4051.5
48	20533.3 <sup>a</sup> $\pm$ 3892.7	13706.7 <sup>a</sup> $\pm$ 2941.3	11866.6 <sup>a</sup> $\pm$ 968.80
Cél. Granulares, cel mm <sup>3</sup>			
0	8066.60 <sup>a</sup> $\pm$ 1057.6 <sup>a</sup>	7946.6 <sup>a</sup> $\pm$ 1697.9	6613.3 <sup>a</sup> $\pm$ 981.24
4	11882.2 <sup>a</sup> $\pm$ 4366.4 <sup>a</sup>	6266.6 <sup>a</sup> $\pm$ 2533.3	7533.3 <sup>a</sup> $\pm$ 689.60
24	10933.3 <sup>a</sup> $\pm$ 3244.1 <sup>a</sup>	7766.6 <sup>a</sup> $\pm$ 1674.5	10880 <sup>a</sup> $\pm$ 2568.0
48	12426.6 <sup>a</sup> $\pm$ 2525.0 <sup>a</sup>	8480.0 <sup>a</sup> $\pm$ 2463.4	7226.6 <sup>a</sup> $\pm$ 918.35

Promedios seguidos de letras diferentes en cada respuesta inmune indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).

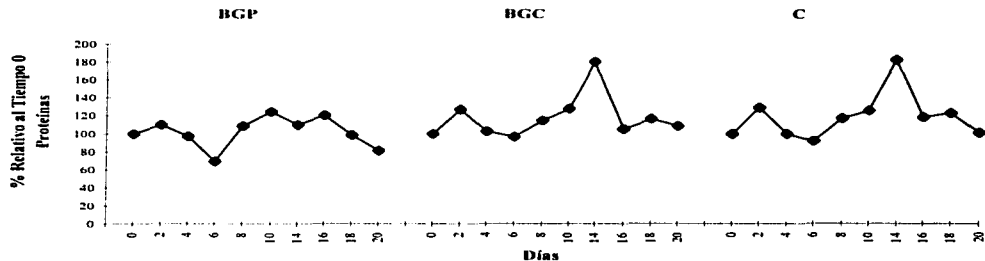
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



## 5.4 Cinética Inmunológica.

### 5.4.1. Proteínas.

El ANOVA mostró que las dietas experimentales produjeron variaciones significativas de los niveles de proteínas sanguíneas de los camarones durante el periodo experimental (Tabla 14;  $P < 0.05$ ). En los camarones alimentados con BGP una reducción del 31 % de las proteínas fue observada al día 6, mientras que en los organismos alimentados con BGC y la dieta C se observó un aumento significativo 14 días después de haber iniciado el experimento del 180 y 182 % respectivamente (Fig 18;  $P < 0.05$ ).



*Figura 18. Variaciones de las proteínas sanguíneas de juveniles *L. vannamei* durante la aplicación de diferentes frecuencia de alimentación. Valores dados en promedio  $\pm$  Error Estándar.*

### 5.4.2 Estallido Respiratorio.

La frecuencia de aplicación de las dietas no afectó de manera significativa al estallido respiratorio ( $P > 0.05$ ; Tabla 14). Los camarones alimentados con la dieta BG y la dieta C mostraron comportamientos similares con intervalos de variación entre 87 % - 164 %, y 82 % - 169 % ( $P > 0.05$ ). En contraste, los animales alimentados con la dieta BGC presentaron una disminución a los 8 días experimentales del 39 % con respecto a sus valores iniciales y del 229 % al día 16 ( $P > 0.05$ ; Fig. 19).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

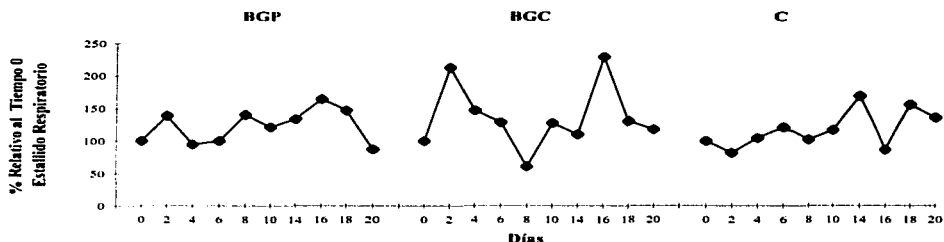


Figura 19. Variaciones del Estallido respiratorio de juveniles *L. vannamei* durante la aplicación de diferentes frecuencia de alimentación. Valores dados en promedio  $\pm$  Error Estándar.

Tabla. 14. Variaciones de las proteínas sanguíneas, estallido respiratorio, de juveniles *Litopenaeus vannamei* durante la aplicación de diferentes frecuencias de alimentación con las dietas elaboradas en el laboratorio. Valores dados en promedio  $\pm$  Error Estándar.

Repuesta Inmune	BGP			BGC			C		
<b>Proteínas ng/ ml</b>									
0	172.66 <sup>bcd</sup>	$\pm$	7.91	172.66 <sup>bcd</sup>	$\pm$	7.91	172.66 <sup>bcd</sup>	$\pm$	7.91
2	189.08 <sup>bc</sup>	$\pm$	21.67	219.03 <sup>b</sup>	$\pm$	15.29	222.87 <sup>b</sup>	$\pm$	21.78
4	167.02 <sup>bcd</sup>	$\pm$	9.90	176.48 <sup>bcd</sup>	$\pm$	5.94	171.92 <sup>bcd</sup>	$\pm$	10.10
6	177.17 <sup>cd</sup>	$\pm$	30.19	166.82 <sup>bcd</sup>	$\pm$	26.89	158.03 <sup>bcd</sup>	$\pm$	11.12
8	186.67 <sup>bc</sup>	$\pm$	5.97	196.76 <sup>bc</sup>	$\pm$	12.05	202.22 <sup>bc</sup>	$\pm$	23.85
10	214.99 <sup>b</sup>	$\pm$	13.35	220.34 <sup>b</sup>	$\pm$	7.99	217.20 <sup>b</sup>	$\pm$	9.78
14	240.66 <sup>bc</sup>	$\pm$	55.79	310.44 <sup>a</sup>	$\pm$	9.34	313.99 <sup>a</sup>	$\pm$	11.47
16	207.15 <sup>bcd</sup>	$\pm$	8.75	181.48 <sup>bcd</sup>	$\pm$	12.96	204.19 <sup>bc</sup>	$\pm$	6.15
18	224.48 <sup>bcd</sup>	$\pm$	10.17	201.27 <sup>bc</sup>	$\pm$	17.69	212.46 <sup>bc</sup>	$\pm$	7.85
20	183.99 <sup>bcd</sup>	$\pm$	3.65	186.77 <sup>bc</sup>	$\pm$	5.24	173.38 <sup>bcd</sup>	$\pm$	30.82
<b>Estallido Respiratorio (Cel 10<sup>5</sup>)</b>									
0	13.75 <sup>bc</sup>	$\pm$	4.16	13.75 <sup>bc</sup>	$\pm$	4.16	13.75 <sup>bc</sup>	$\pm$	4.16
2	19.09 <sup>abc</sup>	$\pm$	3.22	29.37 <sup>a</sup>	$\pm$	5.75	11.24 <sup>bc</sup>	$\pm$	2.47
4	13.03 <sup>bc</sup>	$\pm$	3.50	20.19 <sup>abc</sup>	$\pm$	6.95	14.45 <sup>abc</sup>	$\pm$	0.94
6	13.73 <sup>bc</sup>	$\pm$	2.91	17.74 <sup>abc</sup>	$\pm$	6.08	16.74 <sup>abc</sup>	$\pm$	4.58
8	19.33 <sup>abc</sup>	$\pm$	5.03	8.38 <sup>bc</sup>	$\pm$	1.24	14.07 <sup>bc</sup>	$\pm$	3.14
10	16.67 <sup>abc</sup>	$\pm$	3.59	17.56 <sup>abc</sup>	$\pm$	7.78	16.11 <sup>abc</sup>	$\pm$	3.75
14	18.47 <sup>abc</sup>	$\pm$	4.44	15.18 <sup>abc</sup>	$\pm$	3.64	23.27 <sup>abc</sup>	$\pm$	2.00
16	22.60 <sup>abc</sup>	$\pm$	5.03	31.61 <sup>a</sup>	$\pm$	4.24	11.88 <sup>bc</sup>	$\pm$	1.69
18	20.28 <sup>abc</sup>	$\pm$	5.74	18.01 <sup>abc</sup>	$\pm$	4.93	21.54 <sup>abc</sup>	$\pm$	5.63
20	11.96 <sup>bc</sup>	$\pm$	1.84	16.18 <sup>abc</sup>	$\pm$	2.17	18.72 <sup>abc</sup>	$\pm$	6.47

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### 5.4.3. Células Granulares.

Los resultados obtenidos mostraron que las CG fueron afectadas por el tiempo experimental. ( $P < 0.05$  ; Tabla 15). En los camarones alimentados con BGP y BGC un aumento de las CG fueron observadas al día 4, 18 y 20 por arriba del 200 %, mientras que en los organismos alimentados con la dieta C ese incremento se observó continuo. (Fig. 20;  $P < 0.05$ ).

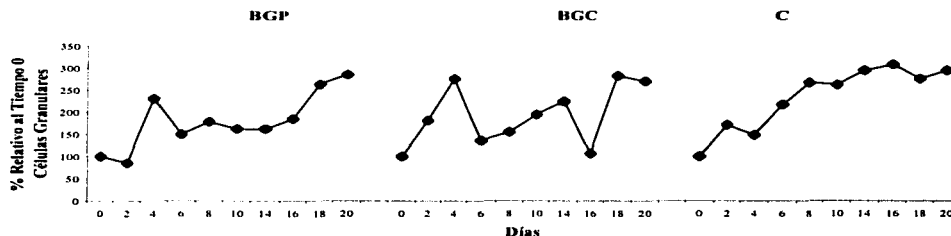


Figura 20. Variaciones de las células granulares de juveniles *L. vannamei* durante la aplicación de diferentes frecuencia de alimentación. Valores dados en promedio  $\pm$  Error Estándar.

### 5.4.4. Células Totales.

El ANOVA aplicado mostró que las CT no fueron afectadas significativamente por las dietas experimentales y ni por el tiempo de aplicación ( $P > 0.05$  ; Tabla 15; Fig. 21).

### 5.4.5 proPO.

La actividad de la proPO fue afectada por la forma de aplicación de la dieta y por el tiempo de aplicación ( $P < 0.05$  ; Tabla 15). En los camarones alimentados con la dieta BGP se observó un aumento significativo al día 4, 16 de experimento y una reducción en los días 14 y 18 ( $P < 0.05$ ). En los camarones alimentados con la dieta BGC se observó un aumento al día 10, 16 de experimento y una disminución al día 6, 8 y 18 ( $P < 0.05$ ). Sin embargo en los camarones alimentados con la dieta C se produjo un aumento significativo al día 8, 16 y 20, una disminución significativa de la proPO al día 18 ( Fig. 22;  $P < 0.05$ ).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

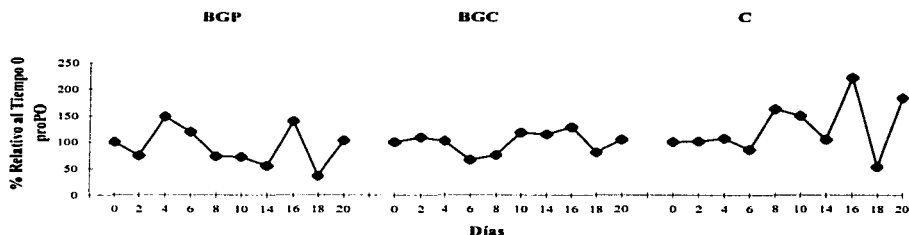


Figura 22. Variaciones del sistema proPO de juveniles *L. vannamei* durante la aplicación de diferentes frecuencia de alimentación. Valores dados en promedio  $\pm$  Error Estándar.

#### 5.4.6 Relación ProPO/Células Granulares.

Un decremento significativo de los niveles de la relación proPO/CG fue observado en los camarones alimentados con la dieta BGP y la dieta C. En contraste, los camarones alimentados con BGC presentaron un incremento al día 16 de experimento del 120 % ( $P < 0.05$  ; Fig. 23).

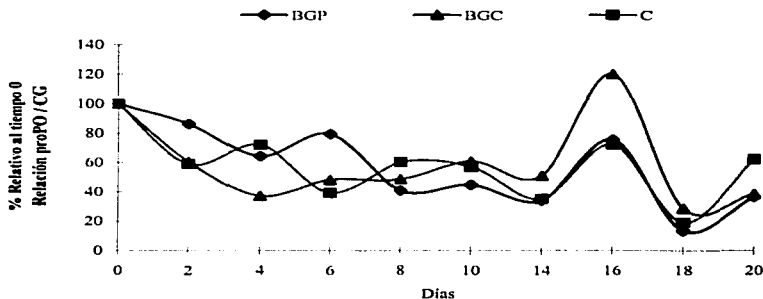


Figura 23. Variaciones de los niveles de la Relación proPO / Células granulares de camarones *L. vannamei* durante la aplicación de diferentes frecuencia de alimentación. Valores dados en promedio  $\pm$  Error Estándar.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Tabla. 15. Variaciones de las células granulares, células totales y la actividad de la proPO, de juveniles *Litopenaeus vannamei* durante la aplicación de diferentes frecuencias de alimentación con las dietas elaboradas en el laboratorio. Valores dados en promedio  $\pm$  Error Estándar.**

Respuesta inmune	BGP		BGC		C	
<b>C. Granulares</b>						
<b>Cél mm<sup>3</sup></b>						
0	1152 <sup>b</sup>	$\pm$ 333	1152 <sup>b</sup>	$\pm$ 819	1076 <sup>b</sup>	$\pm$ 756
2	987 <sup>b</sup>	$\pm$ 429	2080 <sup>a</sup>	$\pm$ 1481	1840 <sup>a</sup>	$\pm$ 1233
4	2667 <sup>a</sup>	$\pm$ 484	3173 <sup>a</sup>	$\pm$ 2184	1600 <sup>a</sup>	$\pm$ 1087
6	1733 <sup>a</sup>	$\pm$ 614	1573 <sup>a</sup>	$\pm$ 1077	2347 <sup>a</sup>	$\pm$ 1905
8	2053 <sup>a</sup>	$\pm$ 808	1786 <sup>a</sup>	$\pm$ 1285	2880 <sup>a</sup>	$\pm$ 1592
10	1867 <sup>a</sup>	$\pm$ 590	2240 <sup>a</sup>	$\pm$ 1443	2827 <sup>a</sup>	$\pm$ 2211
14	1867 <sup>a</sup>	$\pm$ 558	2587 <sup>a</sup>	$\pm$ 1586	3173 <sup>a</sup>	$\pm$ 1514
16	2133 <sup>a</sup>	$\pm$ 404	1227 <sup>a</sup>	$\pm$ 952	3307 <sup>a</sup>	$\pm$ 2897
18	3040 <sup>a</sup>	$\pm$ 466	3253 <sup>a</sup>	$\pm$ 2149	2960 <sup>a</sup>	$\pm$ 2151
20	3280 <sup>a</sup>	$\pm$ 653	3120 <sup>a</sup>	$\pm$ 2811	3173 <sup>a</sup>	$\pm$ 2407
<b>C. Totales</b>						
<b>Cél mm<sup>3</sup></b>						
0	11762 <sup>a</sup>	$\pm$ 3151	10978 <sup>a</sup>	$\pm$ 3036	10978 <sup>a</sup>	$\pm$ 3036
2	8613 <sup>a</sup>	$\pm$ 2540	12053 <sup>a</sup>	$\pm$ 3294	14160 <sup>a</sup>	$\pm$ 4895
4	20747 <sup>a</sup>	$\pm$ 4079	17467 <sup>a</sup>	$\pm$ 4616	12587 <sup>a</sup>	$\pm$ 2891
6	11653 <sup>a</sup>	$\pm$ 5622	19280 <sup>a</sup>	$\pm$ 5163	16960 <sup>a</sup>	$\pm$ 4195
8	15067 <sup>a</sup>	$\pm$ 6189	17520 <sup>a</sup>	$\pm$ 4610	21813 <sup>a</sup>	$\pm$ 9007
10	11680 <sup>a</sup>	$\pm$ 3384	11893 <sup>a</sup>	$\pm$ 4494	19307 <sup>a</sup>	$\pm$ 6084
14	10933 <sup>a</sup>	$\pm$ 4147	15493 <sup>a</sup>	$\pm$ 3477	13840 <sup>a</sup>	$\pm$ 6096
16	11360 <sup>a</sup>	$\pm$ 2514	8960 <sup>a</sup>	$\pm$ 2647	20480 <sup>a</sup>	$\pm$ 4771
18	14827 <sup>a</sup>	$\pm$ 4657	16267 <sup>a</sup>	$\pm$ 4267	14107 <sup>a</sup>	$\pm$ 5697
20	18640 <sup>a</sup>	$\pm$ 3897	13093 <sup>a</sup>	$\pm$ 2031	16507 <sup>a</sup>	$\pm$ 5152
<b>proPO</b>						
0	0.82 <sup>b</sup>	$\pm$ 0.13	0.82 <sup>b</sup>	$\pm$ 0.13	0.82 <sup>b</sup>	$\pm$ 0.13
2	0.60 <sup>b</sup>	$\pm$ 0.27	0.90 <sup>b</sup>	$\pm$ 0.42	0.83 <sup>b</sup>	$\pm$ 0.42
4	1.22 <sup>a</sup>	$\pm$ 0.41	0.84 <sup>b</sup>	$\pm$ 0.22	0.88 <sup>b</sup>	$\pm$ 0.10
6	0.89 <sup>b</sup>	$\pm$ 0.42	0.54 <sup>b</sup>	$\pm$ 0.13	0.71 <sup>b</sup>	$\pm$ 0.29
8	0.60 <sup>b</sup>	$\pm$ 0.16	0.62 <sup>b</sup>	$\pm$ 0.14	1.33 <sup>a</sup>	$\pm$ 0.27
10	0.60 <sup>b</sup>	$\pm$ 0.26	0.97 <sup>ab</sup>	$\pm$ 0.26	1.23 <sup>a</sup>	$\pm$ 0.30
14	0.45 <sup>c</sup>	$\pm$ 0.20	0.94 <sup>b</sup>	$\pm$ 0.27	0.86 <sup>b</sup>	$\pm$ 0.28
16	1.15 <sup>a</sup>	$\pm$ 0.24	1.05 <sup>a</sup>	$\pm$ 0.30	1.82 <sup>a</sup>	$\pm$ 0.15
18	0.29 <sup>c</sup>	$\pm$ 0.08	0.67 <sup>b</sup>	$\pm$ 0.25	0.43 <sup>c</sup>	$\pm$ 0.14
20	0.85 <sup>b</sup>	$\pm$ 0.25	0.86 <sup>b</sup>	$\pm$ 0.36	1.50 <sup>a</sup>	$\pm$ 0.29

Promedios seguidos de letras diferentes en cada metabolito y respuesta inmune indican diferencias significativa (P < 0.05)

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## 5.5 Evaluación de dietas comerciales con ( T 1) o sin BG (T2) en estanques externos.

### 5.5.1 Crecimiento.

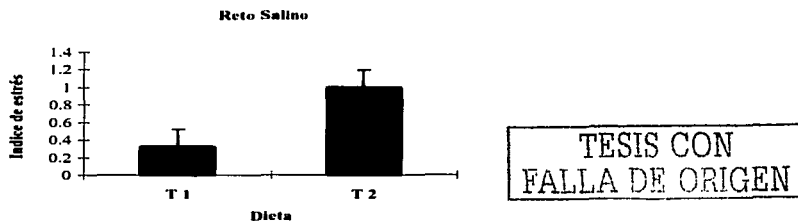
Los resultados obtenidos mostraron que las dietas T1 y T2 no afectaron significativamente el coeficiente diario de crecimiento(% CDC) ( $P > 0.05$ ). Un valor promedio de  $1.2 \pm 0.04$  y  $1.13 \pm 0.05$  fue obtenido como % CDC en los camarones alimentados con las dos dietas respectivamente.

### 5.5.2 Supervivencia antes del reto.

El análisis de varianza no mostró diferencias significativas entre los tratamientos ( $P > 0.05$ ). Una supervivencia promedio del  $85 \pm 0.05$  % y  $84.3 \pm 0.04$  % fue obtenida en los tratamientos T1 y T2 respectivamente.

### 5.5.3 Supervivencia después del reto.

Se observó que los camarones alimentados con el tratamiento T1 presentaron la mayor supervivencia a las 48 h de ser sometidos al reto salino, con un valor final del 84 %. En contraste el tratamiento T2 presentó una supervivencia final del 66 %. Es notorio observar que la evaluación del índice de estrés acumulado en los camarones alimentados con la dieta T1 presentaron una mayor tendencia a la resistencia, en contraste con los camarones de la dieta T2, pero estadísticamente no fue significativo ( $P > 0.05$ ; Fig. 24).



*Figura 24* Variaciones del índice de estrés acumulado de camarones juveniles *L. vannamei* después de ser expuesto al cambio salino. Valores dados en promedio.

### 5.5.4 Evaluaciones Bioquímico – Fisiológicas.

#### 5.5.4.1 Presión Osmótica.

La presión osmótica se vio afectada significativamente por el tipo de dietas suministradas y por el tiempo de exposición al cambio salino ( $P < 0.05$ ; Tabla 16). Los camarones alimentados con la dieta T1 presentaron una disminución del 16 % de los valores obtenidos

antes de ser expuestos al reto salino. En contraste, los camarones alimentados con la dieta T2 fueron más tolerantes al cambio salino presentando un decremento del 7 % ( $P < 0.05$ ; Fig. 25).

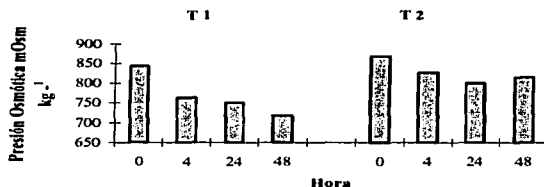


Figura 25. Variaciones de los niveles de presión osmótica en sangre de juveniles *L. vannamei* después de ser expuestos a un reto salino. Valores dados en promedio  $\pm$  Error Estándar.

#### 5.5.4.2 Glucógeno en la glándula digestiva (GD).

Los resultados de la concentración del glucógeno en la GD presentaron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ; Tabla 16). No obstante, a las 4 h del cambio salino los camarones alimentados con la dieta T1 aumentaron el 51 % de su valor inicial, mientras que los camarones alimentados con la dieta T2 se observó una disminución del 21 % ( $P < 0.05$ ; Fig. 26).

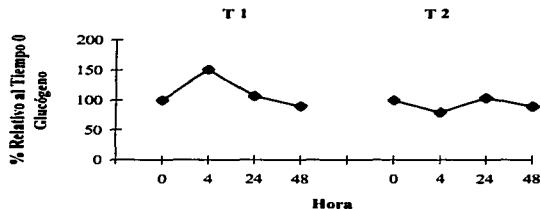
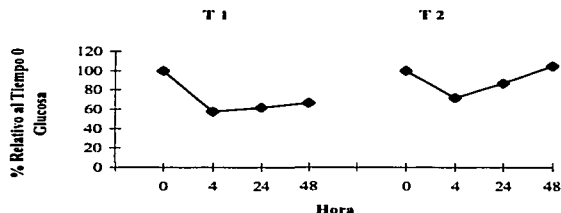


Figura 26. Variaciones de los niveles de glucógeno en la glándula digestiva de juveniles *L. vannamei* después de ser expuestos a un reto salino. Valores dados en promedio  $\pm$  Error Estándar.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### 5.5.4.3 Glucosa.

Se observó que la salinidad y el tipo de dieta afectaron significativamente los niveles de glucosa sanguínea de los camarones alimentados con la dieta T1 y la dieta T2 ( $P < 0.05$ ; Tabla 16). Una reducción significativa del 42 y 28 % de la glucosa sanguínea fue observada después de 4 horas del cambio de salinidad en los organismos alimentados con las dos dietas suministradas, T1 y T2 respectivamente. En contraste un aumento significativo del 5% de la glucosa sanguínea fue detectada a las 48 h de ser expuestos al cambio salino en los camarones alimentados con la dieta T2 ( $P < 0.05$ ; Fig. 27). A las 4 h del reto salino los camarones alimentados con la dieta T2 mostraron un valor del 33 % de su valor inicial ( $P < 0.05$ ).



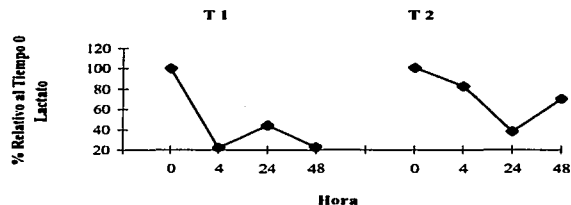
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

*Figura 27. Variaciones de los niveles de glucosa sanguínea de juveniles *L. vannamei* después de ser expuestos a un reto salino. Valores dados en promedio  $\pm$  Error Estándar.*

### 5.5.4.4 Lactato.

Una reducción significativa del lactato sanguíneo fue observada en los camarones alimentados con la dieta T1 y T2 por el tiempo de exposición al cambio salino y la dieta suministrada ( $P < 0.05$ ; Tabla 16). La dieta T1 afectó de manera muy marcada el metabolismo del lactato produciendo un decremento de su concentración del 78 y 77 % a las 4, 48 h respectivamente del cambio salino, en comparación con los valores observados antes del reto. En contraste los camarones alimentados con la dieta T2 presentaron una mayor tolerancia al cambio salino, ya que a pesar de haber una reducción significativa del 62 % de los niveles de lactato a las 24 horas, este metabolito aumentó posteriormente a las 48 h del reto salino, presentando una concentración final del 70 % ( $P < 0.05$ ; Fig. 28).





TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

**Figura 28.** Variaciones de los niveles de lactato en sangre de juveniles *L. vannamei* después de ser expuestos a un reto salino. Valores dados en promedio  $\pm$  Error Estándar.

**Tabla 16.** Metabolitos sanguíneos de juveniles *Litopenaeus vannamei* alimentados con dietas comerciales. Valores dados en promedio.

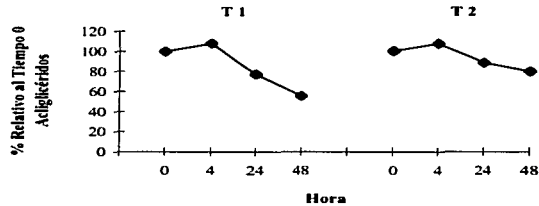
Metabolitos	T 1			T 2		
<b>Presión Osmótica, mOm kg<sup>-1</sup></b>						
0	839 <sup>ab</sup>	±	3.80	857 <sup>a</sup>	±	12.0
4	756 <sup>cd</sup>	±	8.0	803 <sup>bc</sup>	±	24.0
24	745 <sup>d</sup>	±	6.70	786 <sup>bcd</sup>	±	16.0
48	701 <sup>e</sup>	±	16.0	798 <sup>bc</sup>	±	17.0
<b>Glucógeno, mg g<sup>-1</sup></b>						
0	2.5 <sup>b</sup>	±	0.22	3.14 <sup>ab</sup>	±	0.29
4	3.8 <sup>a</sup>	±	0.26	2.47 <sup>b</sup>	±	0.32
24	2.7 <sup>b</sup>	±	0.33	3.25 <sup>ab</sup>	±	0.22
48	2.3 <sup>b</sup>	±	0.15	2.80 <sup>b</sup>	±	0.15
<b>Glucosa, mg ml<sup>-1</sup></b>						
0	0.27 <sup>a</sup>	±	0.02	0.26 <sup>ab</sup>	±	0.02
4	0.16 <sup>bc</sup>	±	0.02	0.19 <sup>bc</sup>	±	0.02
24	0.17 <sup>bc</sup>	±	0.03	0.22 <sup>abc</sup>	±	0.02
48	0.18 <sup>abc</sup>	±	0.03	0.27 <sup>a</sup>	±	0.02
<b>Lactato, mg ml<sup>-1</sup></b>						
0	0.20 <sup>ab</sup>	±	0.02	0.26 <sup>a</sup>	±	0.03
4	0.04 <sup>bc</sup>	±	0.01	0.22 <sup>a</sup>	±	0.03
24	0.09 <sup>bc</sup>	±	0.03	0.10 <sup>c</sup>	±	0.01
48	0.05 <sup>bc</sup>	±	0.02	0.19 <sup>bc</sup>	±	0.04

Promedios seguidos de letras diferentes en cada metabolito indican diferencias significativa ( $P < 0.05$ ).

#### 5.5.4.5 Acilglicéridos.

Los resultados de los acilglicéridos fueron afectados por el tiempo de exposición al cambio salino. Después de 4 h del reto salino los camarones alimentados con la dieta T1 y T2

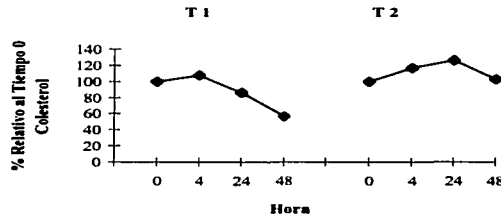
presentaron un aumento significativo de los acilglicéridos del 8 y 7 % respectivamente ( $P < 0.05$ ; Tabla 17). En contraste, a las 48 h mostraron una reducción de los acilglicéridos del 44 % en la dieta T1 y del 20 % en la dieta T2 ( $P < 0.05$  ; Fig. 29).



**Figura 29.** Variaciones de los niveles de acilglicéridos en sangre de juveniles *L. vannamei* después de ser expuestos a un reto salino. Valores dados en promedio  $\pm$  Error Estándar.

#### 5.5.4.6 Colesterol.

Los resultados del ANOVA mostraron que los niveles de colesterol en sangre fueron afectados por el tiempo de exposición al cambio salino ( $P < 0.05$  ; Tabla 17). Se observó en las dos últimas horas de exposición al reto salino una reducción del colesterol en los camarones alimentados con la dieta T1 del 14 y 43 %. En contraste, en los camarones alimentados con la dieta T2 presentaron un aumento del 17 y 27 % de los niveles de colesterol ( $P < 0.05$ ; Fig. 30).



**Figura 30.** Variaciones de los niveles de colesterol en sangre de juveniles *L. vannamei* después de ser expuestos a un reto salino. Valores dados en promedio  $\pm$  Error Estándar

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### 5.5.4.7 Proteínas.

Los niveles de proteínas en sangre fueron afectados significativamente por el tipo de dieta y por el tiempo de exposición al cambio salino ( $P < 0.05$  ; Tabla 17). Una reducción significativa del 30 % de las proteínas de la sangre fue observada en los camarones alimentados con la dieta T1 a las 48 h del reto salino. En contraste, los camarones alimentados con la dieta T2 presentaron una concentración final de las proteínas sanguíneas del 105 % ( $P < 0.05$ ; Fig. 31).

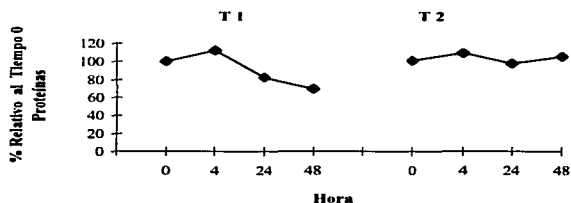


Figura 31. Variaciones de los niveles de proteínas en sangre de juveniles *L. vannamei* después de ser expuestos a un reto salino. Valores dados en promedio  $\pm$  Error Estándar..

### 5.5.4.8 Hemocianina.

El ANOVA aplicado mostró que la hemocianina se vio afectada por la interacción Dieta – Tiempo ( $P < 0.05$ ). En los camarones alimentados con la dieta T1 se puede apreciar un incremento del 14 % de la hemocianina a las 4 h del reto, mientras que en los alimentados con la dieta T2 se observó un decremento del 16 % ( $P < 0.05$  ; Tabla 17). En contraste, a las 48 h de ser expuestos a un cambio salino los camarones alimentados con la dieta BG presentaron una mayor reducción de la concentración de hemocianina que la observada en los alimentados con la dieta control ( $P < 0.05$  ; Fig. 32).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

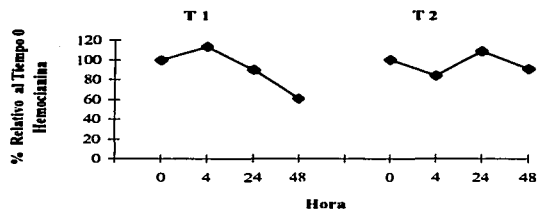


Figura 32. Variaciones de los niveles de hemocianina en sangre de juveniles *L. vannamei* después de ser expuestos a un reto salino. Valores dados en promedio  $\pm$  E.S.

#### 5.5.4.9 proPO.

En los camarones alimentados con la dieta T2 la actividad de la proPO se mantuvo constante, excepto a la 48 h presentó un incremento significativo del 22 % de su valor inicial ( $P < 0.05$  ; Tabla 17). En contraste, en los camarones alimentados con la dieta T1 , mostraron un decremento paulatino hasta las 24 h del 47 %, posteriormente a las 48 h se observó un aumento del 87 % muy cerca de su valor inicial ( $P < 0.05$  ; Fig. 33).

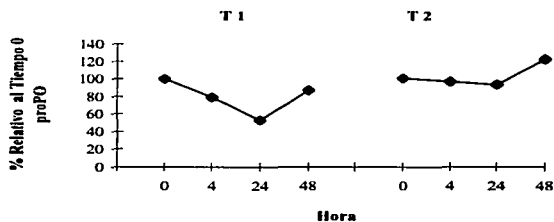


Figura 33. Variaciones de los niveles del sistema proPO de juveniles *L. vannamei* después de ser expuestos a un reto salino. Valores dados en promedio  $\pm$  Error Estándar..

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Tabla 17. Metabolitos sanguíneos y la actividad de la proPO de juveniles *L. vannamei* alimentados con dietas comerciales y sometidos a un cambio brusco de salinidad. Valores dados en promedio  $\pm$  Error Estándar.**

<b>Metabolitos</b>	<b>T 1</b>			<b>T 2</b>		
<b>Acilglicéridos, mg ml<sup>-1</sup></b>						
0	0.60 <sup>ab</sup>	$\pm$	0.05	0.50 <sup>abcd</sup>	$\pm$	0.06
4	0.64 <sup>a</sup>	$\pm$	0.06	0.53 <sup>abc</sup>	$\pm$	0.05
24	0.46 <sup>abd</sup>	$\pm$	0.02	0.44 <sup>abd</sup>	$\pm$	0.02
48	0.33 <sup>abd</sup>	$\pm$	0.06	0.40 <sup>abd</sup>	$\pm$	0.03
<b>Colesterol, mg ml<sup>-1</sup></b>						
0	0.26 <sup>a</sup>	$\pm$	0.02	0.23 <sup>a</sup>	$\pm$	0.02
4	0.28 <sup>a</sup>	$\pm$	0.02	0.27 <sup>a</sup>	$\pm$	0.03
24	0.22 <sup>a</sup>	$\pm$	0.01	0.29 <sup>a</sup>	$\pm$	0.04
48	0.15 <sup>b</sup>	$\pm$	0.02	0.24 <sup>a</sup>	$\pm$	0.02
<b>Proteínas, mg ml<sup>-1</sup></b>						
0	169 <sup>a</sup>	$\pm$	3.50	165 <sup>a</sup>	$\pm$	6.40
4	190 <sup>a</sup>	$\pm$	7.80	177 <sup>b</sup>	$\pm$	11.0
24	139 <sup>bc</sup>	$\pm$	12.0	161 <sup>a</sup>	$\pm$	7.70
48	118 <sup>bc</sup>	$\pm$	16.0	173 <sup>a</sup>	$\pm$	5.60
<b>Hemocianina, mmol l<sup>-1</sup></b>						
0	0.60 <sup>a</sup>	$\pm$	0.05	0.50 <sup>abc</sup>	$\pm$	0.06
4	0.64 <sup>a</sup>	$\pm$	0.06	0.53 <sup>bc</sup>	$\pm$	0.05
24	0.46 <sup>bc</sup>	$\pm$	0.02	0.44 <sup>ab</sup>	$\pm$	0.02
48	0.33 <sup>d</sup>	$\pm$	0.06	0.40 <sup>bc</sup>	$\pm$	0.03
<b>Respuesta inmune ProPO, 490 nm</b>						
0	0.41 <sup>a</sup>	$\pm$	0.06	0.41 <sup>ab</sup>	$\pm$	0.06
4	0.39 <sup>ab</sup>	$\pm$	0.07	0.39 <sup>ab</sup>	$\pm$	0.07
24	0.38 <sup>b</sup>	$\pm$	0.06	0.38 <sup>ab</sup>	$\pm$	0.06
48	0.50 <sup>ab</sup>	$\pm$	0.03	0.50 <sup>a</sup>	$\pm$	0.03

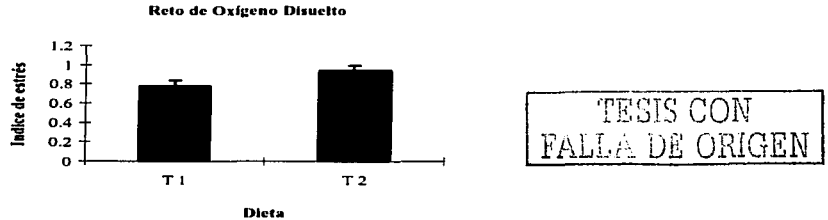
Promedios seguidos de letras diferentes en cada metabolito y respuesta inmune indican diferencias significativa ( $P < 0.05$ )

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## 5.6 Reto Oxígeno disuelto.

### 5.6.1. Supervivencia después del reto.

Se observó que los camarones alimentados con el tratamiento T1 presentó una supervivencia del 75 %. En contraste, los camarones alimentados con el tratamiento T2 mostraron una supervivencia del 69 %. No obstante, al evaluar el índice de estrés acumulativo en los camarones alimentados con ambas dietas no presentaron diferencias significativas, un valor promedio de  $0.8 \pm 0.04$  y de  $0.9 \pm 0.04$  fue observado en la dieta T1 y T2 ( $P > 0.05$  ; Fig. 34).



*Figura34. Variaciones del índice de estrés acumulativo de camarones juveniles *L. vannamei* después de ser expuesto al cambio salino. Valores dados en promedio.*

### 5.6.2. Presión Osmótica.

El ANOVA aplicado no mostró un efecto significativo en la presión osmótica de los camarones experimentales después de ser expuesto a una disminución de oxígeno disuelto ( $P > 0.05$  ; Tabla 18).

### 5.6.3 Glucógeno.

El glucógeno en la GD presentó un efecto significativo por la Dieta y el Tiempo de exposición al reto salino ( $P < 0.05$ ). Los camarones alimentados con la dieta T1 presentaron un incremento del glucógeno del 114 % a las 24 h del reto y una disminución del 5 % a las 48 h. En contraste, los camarones alimentados con la dieta T2 mostraron una disminución del 10 % del glucógeno en las primeras 4 h y posteriormente en los dos últimos tiempos de exposición al reto se observó un incremento significativo del 138 y 128 % de los valores iniciales observados en el tiempo 0 ( $P < 0.05$  ; Tabla 18 ; Fig. 35).

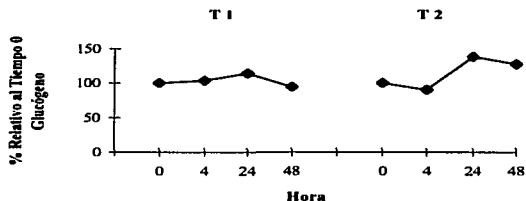


Figura 35. Variaciones de los niveles de glucógeno en la GD de juveniles *L. vannamei* después de ser expuestos a una concentración baja de OD  $\text{mg l}^{-1}$ . Valores dados en promedio  $\pm$  Error Estándar.

#### 5.6.4 Glucosa.

Los resultados de la glucosa sanguínea presentaron un efecto significativo por el tiempo de exposición a la baja concentración de oxígeno disuelto ( $P < 0.05$ ). En los camarones alimentados con la dieta T1 la glucosa incrementó 11 % y en un 61 % en los organismos alimentados con la dieta T2, 24 h después del reto. A sí mismo se observó que 48 h después del reto la glucosa regresó a sus valores iniciales en los camarones alimentados con la dieta T2. En contraste, en los alimentados con la dieta T1 la glucosa disminuyó 20 % de los valores observados en el tiempo 0 ( $P < 0.05$ ; Tabla 18; Fig. 36).

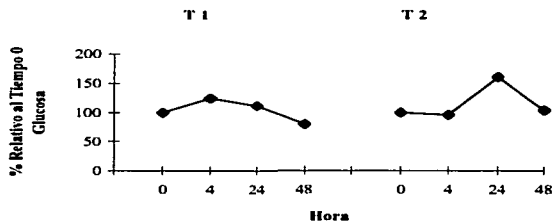


Figura 36. Variaciones de los niveles de glucosa sanguínea de juveniles *L. vannamei* después de ser expuestos a una concentración baja de OD  $\text{mg l}^{-1}$ . Valores dados en promedio  $\pm$  Error Estándar.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

#### 5.6.5 Lactato.

Los resultados del lactato en sangre de los camarones alimentados con el tratamientos T1 y T2 no presentaron diferencias significativas por el cambio de la concentración de oxígeno

disuelto ( $P > 0.05$ ). Aunque una disminución progresiva del lactato en ambos tratamientos fue observada en relación al tiempo de exposición al reto ( $P > 0.05$ ; Tabla 18).

**Tabla 18.** Metabolitos sanguíneos de juveniles *L. vannamei* alimentados con dos dietas comerciales y expuestos a una disminución de oxígeno disuelto. Valores dados en promedio  $\pm$  Error Estándar.

Metabolitos	T 1		T 2			
Presión Osmótica mOsm kg <sup>-1</sup>						
0	836.7 <sup>a</sup>	††	4.3	833.8 <sup>a</sup>	††	4.9
4	837.4 <sup>a</sup>	††	14	823.3 <sup>a</sup>	††	5.8
24	827.0 <sup>a</sup>	††	6.6	847.8 <sup>a</sup>	††	12.9
48	850.3 <sup>a</sup>	††	8.7	829.4 <sup>a</sup>	††	11.5
Glucógeno mg g <sup>-1</sup>						
0	2.49 <sup>b</sup>	†††	0.14	2.67 <sup>b</sup>	†††	0.17
4	2.58 <sup>b</sup>	†††	0.31	2.41 <sup>b</sup>	†††	0.31
24	2.84 <sup>ab</sup>	†††	0.28	3.70 <sup>a</sup>	†††	0.08
48	2.37 <sup>b</sup>	†††	0.27	3.42 <sup>a</sup>	††	0.18
Glucosa mg ml <sup>-1</sup>						
0	0.24 <sup>a</sup>	†††††	0.02	0.23 <sup>a</sup>	†††††	0.02
4	0.30 <sup>a</sup>	†††††	0.04	0.22 <sup>a</sup>	†††††	0.02
24	0.27 <sup>a</sup>	†††††	0.04	0.37 <sup>b</sup>	†††††	0.01
48	0.19 <sup>a</sup>	†††††	0.04	0.24 <sup>a</sup>	†††††	0.04
Lactato mg ml <sup>-1</sup>						
0	0.16 <sup>a</sup>	†††††	0.18	0.18 <sup>a</sup>	†††††	0.02
4	0.15 <sup>a</sup>	†††††	0.02	0.14 <sup>a</sup>	†††††	0.02
24	0.12 <sup>a</sup>	†††††	0.009	0.11 <sup>a</sup>	†††††	0.01
48	0.09 <sup>a</sup>	†††††	0.010	0.14 <sup>a</sup>	†††††	0.02
Acilglicéridos mg ml <sup>-1</sup>						
0	0.54 <sup>a</sup>	†††††	0.04	0.54 <sup>a</sup>	†††††	0.03
4	0.63 <sup>a</sup>	†††††	0.06	0.68 <sup>a</sup>	†††††	0.05
24	0.59 <sup>a</sup>	†††††	0.04	0.57 <sup>a</sup>	†††††	0.06
48	0.51 <sup>a</sup>	†††††	0.05	0.52 <sup>a</sup>	†††††	0.05
Colesterol mg ml <sup>-1</sup>						
0	0.24 <sup>ab</sup>	†††††	0.01	0.25 <sup>ab</sup>	†††††	0.01
4	0.29 <sup>a</sup>	†††††	0.02	0.30 <sup>a</sup>	†††††	0.01
24	0.25 <sup>ab</sup>	†††††	0.01	0.20 <sup>b</sup>	†††††	0.02
48	0.23 <sup>ab</sup>	†††††	0.02	0.28 <sup>ab</sup>	†††††	0.03

Promedios seguidos de letras diferentes en cada metabolito y respuesta inmune indican diferencias significativa ( $P < 0.05$ )

### 5.6.6 Acilglicéridos.

Los acilglicéridos en sangre no fueron afectados significativamente por el tipo de dieta y ni por el cambio de la concentración de oxígeno disuelto ( $P > 0.05$ ; Tabla 18).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



### 5.6.7 Colesterol.

Los resultados del ANOVA mostraron un efecto significativo del colesterol por la baja concentración de oxígeno disuelto en los camarones alimentados con la dieta T1 y la dieta T2 ( $P < 0.05$ ; Tabla 18). Un aumento significativo fue observado a las 4 h del reto en ambos tratamientos del 123 y 120 % respectivamente. Sin embargo, a las 24 h del reto los camarones alimentados con la dieta T2 mostraron una disminución del 18 % del colesterol ( $P < 0.05$ ; Fig. 37).

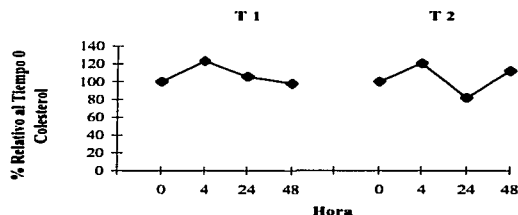


Figura 37. Variaciones de los niveles de colesterol en sangre de juveniles *L. vannamei* después de ser expuestos a una concentración baja de OD  $\text{mg l}^{-1}$ . Valores dados en promedio  $\pm$  Error Estándar.

### 5.6.8 Proteínas.

Las proteínas en sangre mostraron diferencias significativas en los dos tratamientos por el cambio de concentración de oxígeno disuelto ( $P < 0.05$ ; Tabla 19). Una disminución significativa del 10 % fue observado en los camarones alimentados con la dieta T1 y del 15 % en los alimentados con la dieta T2, 48 h después del reto ( $P < 0.05$ ; Fig.38).

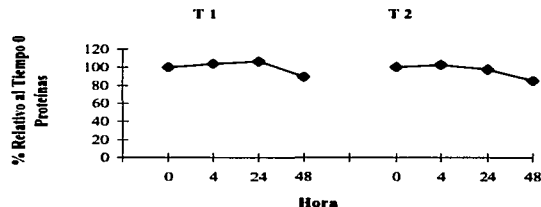


Figura 38. Variaciones de los niveles de proteínas en sangre de juveniles *L. vannamei* después de ser expuestos a una concentración baja de OD  $\text{mg l}^{-1}$ . Valores dados en promedio  $\pm$  Error Estándar.

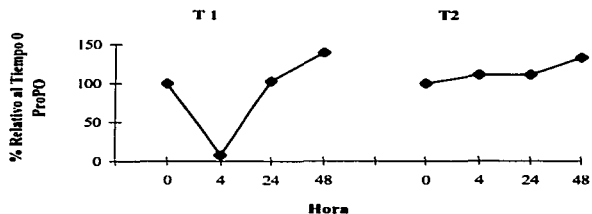
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### 5.6.9 Hemocianina.

La concentración de hemocianina sanguínea en los camarones alimentados con ambos tratamientos no mostró diferencias significativas al ser expuestos al reto de oxígeno disuelto ( $P > 0.05$  ; Tabla 19).

### 5.6.10 proPO.

La actividad de la proPO fue afectada significativamente por el tiempo experimental y por el tipo de dieta suministrada. ( $P < 0.05$  ; Tabla 19). La concentración de la proPO en los camarones alimentados con la dieta T1 disminuyó significativamente en un 93 % 4 h después del reto. Sin embargo, a las 24 y 48 h los niveles de proPO aumentaron significativamente registrando un valor final del 139 % mayor que el observado en el tiempo 0. En contraste, los camarones alimentados con la dieta T2 mantuvieron sus valores de proPO por arriba de su concentración inicial antes de ser expuestos al reto ( $P < 0.05$  ; Fig. 39).



**Figura 39.** Variaciones de los niveles del sistema proPO de juveniles *L. vannamei* después de ser expuestos a una concentración baja de OD  $\text{mg l}^{-1}$ . Valores dados en promedio  $\pm$  Error Estándar.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Tabla 19.** Metabolitos sanguíneos y la actividad de la proPO de juveniles *L. vannamei* alimentados con dos dietas comerciales. Valores dados en promedio  $\pm$  Error Estándar.

Metabolitos	T 1			T 2		
<b>Proteínas mg ml<sup>-1</sup></b>						
0	160 <sup>a</sup>	$\pm$	4.4	163 <sup>a</sup>	$\pm$	3.0
4	167 <sup>a</sup>	$\pm$	6.9	168 <sup>a</sup>	$\pm$	3.3
24	171 <sup>a</sup>	$\pm$	3.7	159 <sup>a</sup>	$\pm$	6.9
48	144 <sup>b</sup>	$\pm$	6.6	139 <sup>b</sup>	$\pm$	12
<b>Hemocianina mmol L<sup>-1</sup></b>						
0	1.49 <sup>a</sup>	$\pm$	0.07	1.55 <sup>a</sup>	$\pm$	0.07
4	1.76 <sup>a</sup>	$\pm$	0.12	1.73 <sup>a</sup>	$\pm$	0.08
24	1.84 <sup>a</sup>	$\pm$	0.04	1.66 <sup>a</sup>	$\pm$	0.13
48	1.54 <sup>a</sup>	$\pm$	0.14	1.77 <sup>a</sup>	$\pm$	0.14
<b>Respuesta inmune proPO, 490 nm</b>						
0	0.50 <sup>a</sup>	$\pm$	0.030	0.51 <sup>a</sup>	$\pm$	0.02
4	0.35 <sup>b</sup>	$\pm$	0.006	0.57 <sup>a</sup>	$\pm$	0.12
24	0.51 <sup>a</sup>	$\pm$	0.066	0.57 <sup>a</sup>	$\pm$	0.05
48	0.70 <sup>a</sup>	$\pm$	0.035	0.68 <sup>a</sup>	$\pm$	0.06

Promedios seguidos de letras diferentes en cada metabolito y respuesta inmune indican diferencias significativa ( $P < 0.05$ )

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## **VI. Discusión.**

### **6.1 Línea Base de camarones en condiciones experimentales.**

En los organismos acuáticos la magnitud del crecimiento ha sido considerado un indicador de amplio espectro, ya que depende en gran medida de la capacidad de los organismos para responder a las condiciones ambientales, incluido el alimento (Bureau *et al.*, 2000). En la presente investigación se elaboró una dieta base a la que se le adicionó un inmunoestimulante derivado de paredes de hongos ( $\beta$ -1,3 glucanos a razón de 2000 mg Kg<sup>-1</sup> de dieta). Al comparar los resultados del crecimiento se observó claramente que los organismos experimentales no presentaron diferencias significativas ni en el crecimiento, ni en la sobrevivencia. Estos resultados concuerdan con los observados por Rengpipat *et al* (2000), quienes no observaron diferencias significativas en los crecimientos de *P. monodon* alimentados con una dieta tratada con *Bacillus* S11 y una dieta control sin *Bacillus* S1. De igual manera Itami *et al.*, (1998) reportó que en *P. japonicus* alimentados con una dieta a la que le adicionaron Peptidoglucanos (PG) a razón de 2000 mg kg<sup>-1</sup> de dieta y una dieta alternada 7 días con PG y 7 días con una dieta control sin PG los camarones no presentaron diferencias significativa en el crecimiento y sobrevivencia. La razón por la cual las dietas con inmunoestimulantes no mejoran el crecimiento de los camarones es debido a que éstos aportan muy poca energía a la dieta. Aunque los camarones están bien equipados con glucanasas (Laminarinasas) y puede digerir muy bien diferentes tipos de los glucanos (Wigglesworth y Griffith 1994), estudios recientes han demostrado que el aporte de los carbohidratos al crecimiento de los camarones es poco importante (Rosas *et al.*, 2002). Por esa razón las dietas actualmente utilizadas no afectaron el crecimiento de los camarones aun cuando éstos pudieran haber digerido parte de los glucanos suministrados.

Otros de los elementos evaluados en este primer experimento fueron los metabolitos sanguíneos y la respuesta inmune de los camarones. Estas mediciones se llevaron a cabo después de 40 días de experimento con el fin de obtener la línea base (Tiempo 0) cuyos valores fueron usados como referencia de camarones antes de ser expuestos al reto salino. Como se puede apreciar de los resultados obtenidos, la glucosa, el lactato, las

células granulares y las células totales experimentaron alteraciones por el efecto de la dieta mostrando los valores más altos de glucosa y lactato en los camarones alimentados con la dieta control. Mientras que, en los resultados de las concentraciones de las células granulares y células totales se observó una menor concentración.

De acuerdo con Rosas *et al* (2000), las variaciones de la glucosa y el lactato en la hemolinfa han sido identificados como indicadores del metabolismo de carbohidratos (CBH) en crustáceos, ya que se ha observado que el lactato puede ser utilizado como fuente de carbono para la síntesis de CBH. Así las diferencias de los niveles de glucosa y lactato sanguínea entre los camarones alimentados con las diferentes dietas mostraron que cada dieta jugó un papel nutricional diferente.

Los alimentos con  $\beta$ - glucanos mostraron valores menores a los observados con la dieta control, indicando que la inclusión de glucanos pudiera alterar la absorción de glucosa en la glándula digestiva, alterando también la producción de lactato en músculo. De acuerdo con los resultados de los niveles de glucógeno de la GD de los camarones, es posible asumir que la mayor eficiencia de degradación de CBH promovida por los  $\beta$ -glucanos fue dirigida a la síntesis de glucógeno. El glucógeno es la molécula de almacenamiento de CBH en los crustáceos decápodos, y el sitio de acumulación es en la glándula digestiva (GD) (Gibson, 1979; Loret, 1993). Su función principalmente es como materia prima para la formación de la quitina (Abdel-Rahman, 1979; Loret, 1993; Omondi and Stark, 1996 Rosas *et al.*, 1995, Sánchez A, 1991, Van Handel, 1965; Shiau, 1992).

En un estudio previo (Wiggleworth y Griffith 1994), se observó que aunque los camarones están bien equipados enzimáticamente para la degradación de CBH, incluidos los  $\beta$ -glucanos, este proceso es limitado, debido a la reducida capacidad de la  $\alpha$  amilasa para degradar altas concentraciones de almidón dietético. No obstante esta limitación la presencia de  $\beta$ -glucanos en las dietas experimentales al parecer promovió una mayor conversión de almidón en energía al estimular a la maquinaria enzimática de la GD a procesar con mayor eficiencia los CBH dietéticos. Estudios llevados a cabo en *L. vannamei* han demostrado que los componentes de la dieta pueden modular la

capacidad Enzimática de los camarones activando ó desactivando genes involucrados en la síntesis de estas enzimas (Le Chevalier and Van wormhoudt., 1998; Le Moullac 1998). Aunque no se tiene evidencias directas de que estos mecanismos regulatorios operaron en los camarones, la baja concentración de glucosa en sangre observada ahora podría estar indicando que los  $\beta$ -glucanos estimularon la asimilación de los CBH dietéticos los cuales fueron dirigidos a la producción de energía metabólica. Así es posible concluir que en el presente estudio los  $\beta$  - 1,3 glucanos de ser degradados por las  $\beta$  -glucanasas, estimularon el uso de la glucosa para la formación de glucógeno.

Estudios recientes han demostrado que se requiere de una poca cantidad de  $\beta$  - 1,3 glucanos (picogramos) para estimular el sistema inmune de los camarones (Soderhall, 1982; Chang *et al.*, 2000). Por lo tanto los  $\beta$  - glucanos que no formaron parte del glucógeno, es decir los que no se degradaron completamente pudieron pasar al interior de las células y fueron suficientes para inmunoestimular el sistema inmune de los camarones experimentales, estimulando directamente al tejido hematopoyético. Esto último fue observado a partir del aumento de células sanguíneas observado en los animales inmuno estimulados. Según Johansson *et al* (2000) el tejido hematopoyético es el órgano de producción y el lugar donde se diferencian las células sanguíneas. En muchos crustáceos el tejido hematopoyético esta situado como una hoja que cubre la parte dorsal y dorsolateral del estomago y la GD.

Estudios posteriores han demostrado que el tejido hematopoyético sintetiza las células pero que el contenido celular es producto del metabolismo de las propias células sanguíneas (Johansson *et al.*, 2000). Esto se observó a partir de la observación de que el sistema proPO aparece en las células sanguíneas después de la síntesis de éstas en el tejido hematopoyético. Así es posible proponer que después de la ingestión de los  $\beta$ -glucanos dietéticos la estimulación recayó sobre la síntesis celular en el tejido hematopoyético aumentando la producción de células sanguíneas, sin afectar la síntesis de proPO. De acuerdo con Vargas-Albores *et al.*, (1993a); Perazzolo and Barraco, (1997), Johanson *et al.*, (2000) la síntesis celular del sistema proPO en camarones peneidos es expresado en los hemocitos circulantes, es decir están localizados en las

células granulares y semi-granulares. Esto concuerda con Sritunyalucsana *et al.*, (1999a), quién en un estudio reciente con *P. monodon* mostró que solamente en los hemocitos circulantes que contenían proPO es expresado un RNAm.

## **6.2 Reto salino en condiciones de laboratorio.**

Los organismos acuáticos frecuentemente afrontan retos debido a cambios ambientales lo que viene a generar situaciones de estrés desencadenando una serie de respuestas fisiológicas e inmunológicas. El índice de estrés acumulativo utilizado para este estudio (Merchie *et al* 1995) mostró que el tipo de dieta no afectó la mortalidad de los camarones ( $P < 0.05$ ), indicando que una dieta con o sin glucanos, siempre y cuando cubra adecuadamente los requerimientos nutricionales de los camarones, puede hacer que la respuesta de los camarones a una condición adversa de esta naturaleza sea adecuada. Itami *et al.*, (1998) reportaron que en camarones *P. japonicus* retados con *V. penaeicida* y *V. baculovirus* de la mancha blanca, la tasa de sobrevivencia fue significativamente más alta en camarones alimentados con Peptidoglucanos (PG) (63.4% y 82 % respectivamente), en comparación con los camarones alimentados con la dieta control sin PG (25 %, 20 %). En el mismo sentido, Chang *et al* (2000) señalaron que en *P. monodon* alimentados con dietas con  $\beta$ -1,3 glucanos presentaron una mayor resistencia a una infección bacterial, con una sobrevivencia del 70 %, en contraste al 35.5 % observado en camarones alimentados con la dieta sin  $\beta$ -1,3 glucanos.

Por otro lado Rengpipat *et al* (2000) en un estudio con *P. monodon* y dietas formuladas con Bacillus S11, demostraron que la sobrevivencia después de ser expuesto a un reto bacteriano (*V. harveyi*) fue del 54.3 % en los camarones alimentados con la dieta experimental, en comparación el 35.5% observado en camarones alimentados con la dieta control. Dichos resultados demuestran que el uso  $\beta$ -glucanos en la dieta favorece la sobrevivencia de los camarones cuando son expuestos a patógenos, hecho que no pudo observarse cuando son expuestos a un estrés salino.

Como era de esperar el cambio brusco de salinidad modificó significativamente la presión osmótica, el glucógeno de la GD, los metabolitos sanguíneos y los indicadores de la respuesta inmune de los organismos. Bajo estas condiciones los camarones

tuvieron que desviar parte de la energía metabólica para responder al cambio salino. Cuando los camarones experimentales fueron expuestos a un cambio brusco de salinidad de 35 ‰ a 0 ‰ la presión osmótica se redujo significativamente, provocando un desequilibrio osmótico en todos los tratamientos.

Los acilglicéridos y el colesterol fueron reducidos significativamente después del cambio de salinidad indicando la movilización de reservas. Estudios realizados en diferentes especies de crustáceos han demostrado que entre los mecanismos de regulación osmótica se encuentran los relacionados con el cambio de la permeabilidad de las membranas y por ende con los acilglicéridos, los cuales en última instancia formarán parte de los lípidos que conforman las membranas de las branquias donde se realiza el intercambio de agua (Lignot, *et al* 2000). Los cambios de la permeabilidad al agua implican cambios en el contenido de lípidos de las células branquiales haciéndolas más hidrófobas lo que permite reducir la entrada de agua (Rosas *et al.*, 2000). Al mismo tiempo una fuerte movilización de aminoácidos desde el músculo y un aumento de la captación de iones dan lugar al proceso de regulación osmótica (Rosas *et al.*, 2000). Así la desaparición de acilglicéridos y colesterol de la sangre de los camarones en el presente estudio pudiera estar asociada con la movilización de estos para modificar los lípidos de las membranas o como fuente de energía para responder a las necesidades generadas por los mecanismos de regulación (Teshima *et al.*, 1998; Angus, 1989).

Las proteínas están estrechamente vinculadas con la capacidad para tolerar los cambios de salinidad en crustáceos (Chen *et al.*, 1994). Los resultados del presente estudio demuestran que las proteínas sanguíneas participan de manera importante en la regulación del medio interno. Se observó que después de un cambio de salinidad el nivel de proteínas aumentó significativamente en las primeras horas (4 - 24 h), para después regresar a los niveles iniciales 48 h después del reto (Fig. 12).

Estos resultados ejemplifican el proceso de regulación osmótica descrito anteriormente para *L. vannamei* (Rosas *et al* 2002). Para regular el volumen celular los organismos están obligados a transformar iones y aminoácidos desde las células a la sangre. Los iones normalmente se pierden a través de las branquias y los aminoácidos son



degradados hasta amonio. No obstante si el estrés salino es extremo como en el experimento 1 el movimiento de aminoácidos es permanente provocando una carga osmótica adicional a la sangre. Para compensar esto los camarones almacenan los aminoácidos como hemocianina ahorrando recursos y aumentando su capacidad respiratoria. Dado que en la sangre entre el 60 y 90 % de las proteínas es hemocianina, un cambio en la concentración de proteínas sanguíneas pudiera reflejar un cambio también en la hemocianina. Así el aumento de las proteínas observado después del cambio de salinidad puede estar asociado con el aumento de hemocianina como consecuencia del ahorro de aminoácidos tal como ha sido observado en otros estudios (Rosas *et al.*, 2001b). Este mecanismo puede tener ventajas inmunológicas ya que se ha observado que la hemocianina tiene funciones fungistáticas (Destoumieux-Garzón *et al.*, 2001).

Un aumento de la glucosa sanguínea fue observada después del cambio brusco de salinidad en los camarones alimentados con BGP en contraste con la reducción observada en los animales alimentados con la dieta C. Valores intermedios fueron observados en los camarones alimentados con BGC. Estos resultados ponen en evidencia el papel nutricional de los  $\beta$ - glucanos en la reserva de CBH dietéticos, los cuales favorecieron la acumulación de glucógeno y su posterior utilización como fuente de energía y moléculas durante el estrés salino. Los camarones aumentaron la concentración de glucosa en sangre debido a un estrés inmediato a las primeras 4 horas del reto, utilizaron las reservas acumuladas en la GD para prepararse y enfrentarse a una condición adversa (Fig. 8).

Estudios recientes han demostrado que los niveles de glucosa sanguínea pueden ser utilizados como indicadores de estrés (Racotta y Palacios, 1998), debido a que la glucosa es utilizada como fuente de energía primaria cuando los camarones son expuestos a cambios ambientales bruscos. Así mismo la glucosa es utilizada como base para la formación de glucosamina la cual participa en la formación de la quitina (Rosas *et al.*, 2002). Esto pone de manifiesto que los camarones alimentados con la dieta con  $\beta$  glucanos respondieron mejor fisiológicamente al estrés producido por la salinidad.

Asociado al metabolismo de CBH se encuentra el metabolismo del lactato, el cual es producto de la degradación de glucosa. De acuerdo con Vinagre and Dasilva (1992), el lactato puede ser una fuente de carbono para la síntesis de glucógeno y glucosa en crustáceos el cual puede ser usado en condiciones extremas cuando la primera etapa de la glucólisis es saturada como piruvato. Tomando en cuenta esto se podría pensar que los camarones expuestos al estrés salino utilizaron el lactato disponible como fuente de energía. Sobre todo en aquellos camarones que fueron alimentados con dietas combinadas con BG y con la dieta control. Así aunque el lactato se ha considerado como un metabolito indicador de estrés, debido a que es un producto del metabolismo anaerobio (Rivonker et al 1997; Paterson, 1993), evidencias recientes han demostrado que los camarones podrían estar muy bien adaptados para aprovechar la carga de lactato sanguínea con fines metabólicos (Vinagre y Da Silva, 1992).

La actividad de la profenoloxidasa (proPO) , el conteo y la caracterización de las células sanguíneas han sido utilizados para evaluar el potencial inmune de los peneidos. La proPO es una enzima clave en los mecanismos de defensa de los crustáceos (Le Moullac *et al* 1998). Después del reto salino el aumento de la relación proPO/células granulares en los organismos alimentados con la dieta BGC, indicó que estos camarones aumentaron más rápido los componentes del sistema inmune de los camarones. En contraste la reducción de la relación proPO/células granulares en los camarones alimentados con la dieta BGP, demostró que los camarones alimentados permanentemente con glucanos liberaron el equipo inmunológico para responder al estrés de manera continua.

Estos resultados ponen de manifiesto que además de provocar una fatiga inmunológica a los organismos también les produce un agotamiento fisiológico impidiendo la recuperación del sistema inmune cuando son expuestos a una concentración brusca de salinidad. En el caso de los camarones alimentados con la dieta sin BG se observó que estos camarones utilizaron la maquinaria inmunológica durante cambio salino, pudiendo recuperar sus niveles 48 h después del reto salino. Una vez más esto demuestra que dietas formuladas con todos los requerimientos nutricionales pueden mantener en buen

estado de salud a los camarones, lo cual ayudan a responder de manera adecuada cuando los organismos son expuestos a un cambio adverso de su medio. Así estos resultados indican que el uso de inmunoestimulantes puede llegar a producir fatiga inmunológica la cual fue compensada a través del uso de la energía metabólica la que se observó a partir de las variaciones de los metabolitos sanguíneos los que jugaron un papel fundamental en la regulación de la respuestas inmunológicas de los organismos.

### **6.3. Cinética Inmunológica**

Establecer el estado de salud de los camarones permite la detección de inmunodeficiencias y consecuentemente reduce la vulnerabilidad de los organismos a las enfermedades, también contribuye para el control mejoramiento de la calidad ambiental (Bachere *et al.*, 1995). Para comprender mejor como funcionan los mecanismos fisiológicos involucrados en el mantenimiento del estado de salud es necesario realizar evaluaciones a lo largo del tiempo, siguiendo la cinética del comportamiento de los indicadores del estado nutricional e inmunológico. En esta parte del estudio se realizó un seguimiento del estado de salud de los camarones durante la aclimatación a las dietas experimentales. Se utilizó la relación proPO/células granulares como un índice que sintetiza la capacidad de los organismos de producir células sanguíneas y de la capacidad de estas de sintetizar los componentes del sistema inmune a lo largo de 20 días de seguimiento.

Dado que la proPO, al igual que las demás moléculas tienen un fuerte componente proteico, se consideró que las variaciones de esta podrían ser utilizadas como un indicador más general del metabolismo de las proteínas el cual, en última instancia es el más importante para los camarones (Rosas *et al.*, 2000). Utilizando esta relación se observó que en los camarones alimentados con BG, aumentó la capacidad inmunológica con el período de aclimatación a la dieta experimental hasta alcanzar un máximo después del cual la respuestas inmune fue disminuida. La reducción en la capacidad inmune después del pico máximo fue interpretado como fatiga inmunológica, tal y como ha sido observadas en adultos de *Penaeus monodon* después de 20 días de haber sido alimentados con inmunoestimulantes (Chang *et al.*, 2000).

El oxígeno es el primer producto liberado durante el estallido respiratorio, la concentración de  $O_2$  puede ser aceptado como un parámetro cuantitativo de la intensidad del estallido respiratorio (Chang *et al.*, 2000). En el presente estudio se observó que los tres tratamientos presentaron tres picos de máxima producción de oxígeno. En los camarones alimentados con la dieta BGP se presentó la máxima producción de oxígeno al día 2, 8 y 16, mientras que en los camarones alimentados con la dieta BGC fue al día 2, 10 y 16. En contraste los camarones alimentados con la dieta control presentaron la máxima producción al día 6, 14 y 18. Estudios recientes han demostrado que el estallido respiratorio puede ser usado como un método de diagnóstico de la capacidad inmunológica de los camarones pues indica la capacidad fagocítica de los hemocitos (Itami *et al.*, 1998). Así de los resultados obtenidos en el presente estudio resultó evidente que la dieta con inmunoestimulantes no produjo diferencias marcadas en la capacidad fagocítica cuando se le comparó con la dieta control. Nuevamente ha sido demostrado que una dieta nutricionalmente bien diseñada puede inducir un adecuado estado inmunológico sin la necesidad del uso de aditivos inmunoestimulantes (Fig.19).

#### **6.4 Experimento en estanques externos: Crecimiento y sobrevivencia.**

Cuando los camarones son cultivados en condiciones de laboratorio no es posible suministrar todos los componentes de la dieta que tendrían en un estanque de cultivo comercial. Así el efecto del tipo de alimento en ambas condiciones deberá ser distinto debido a los aportes del alimento vivo. Por esta razón en el presente estudio diferentes dietas experimentales fueron probadas en estanques externos, simulando las condiciones que los camarones experimentaron en condiciones de cultivo comercial. Los camarones alimentados con los diferentes tratamientos tuvieron un comportamiento similar en el coeficiente diario de crecimiento y una sobrevivencia del 85 %. Estos resultados indican que, que al igual que en el estudio de laboratorio, los  $\beta$ -glucanos no estimulan el % crecimiento de los camarones.

### **6.5 Reto salino y de oxígeno disuelto.**

Debido a la problemática de enfermedades que actualmente esta enfrentando la camaronicultura, se ha creado la necesidad de buscar alternativas para su posible control. En el presente estudio después de los 115 días de cultivo los camarones fueron sometidos a un estrés salino (35 ‰ 15 ‰) con la finalidad de conocer los mecanismos de defensa de los camarones experimentales en los estanques externos. Para tal efecto se evaluó la sobrevivencia después del reto, los metabolitos sanguíneos y la proPO. El índice de estrés acumulativo en este estudio mostró que las dietas experimentales no afectaron la mortalidad de los organismos indicando nuevamente que un alimento bien diseñado con o sin inmunoestimulantes favorece la tolerancia a los cambios ambientales extremos.

Una vez que los camarones fueron sometidos al reto salino los indicadores sanguíneos e inmune fueron modificados significativamente. Cuando los camarones fueron sometidos al cambio de salinidad la presión osmótica presentó menores concentraciones provocando un desequilibrio iónico en ambos tratamientos. Por lo tanto los organismos tuvieron que utilizar la energía disponible para compensar el cambio en su medio.

Los resultados obtenidos indican que la energía para compensar provino de los acilglicéridos y colesterol los cuales fueron reducidos significativamente después del cambio salino. De los resultados obtenidos ahora es evidente que después del reto salino los camarones utilizaron las reservas sanguíneas para realizar los ajustes metabólicos necesarios para responder al estrés al que fueron sometidos. Estos resultados muestran que los camarones alimentados con dietas con inmunoestimulantes presentaron una menor capacidad para regular la concentración de proteínas del plasma en comparación con el observado en los camarones alimentados con la dieta C (Fig. 31).

Aunque ahora no se tiene una explicación para tal respuesta es posible pensar que cuando los camarones son inmunoestimulados se modifica el metabolismo de las proteínas, afectando el posible papel que estos tienen en la regulación del medio interno. Así, nuevamente la inmunoestimulación pudiera ser una forma de desviar moléculas y energía del metabolismo de proteínas hacia la producción de moléculas componentes del sistema inmune, reduciendo la capacidad de los camarones de responder

adecuadamente ante un cambio en la salinidad. Así mismo y tomando en cuenta el papel fungistático de la hemocianina (Destoumieux - Garzón *et al.*, 2001) , es evidente que las dietas con inmunoestimulantes podrían ser adversos cuando los organismos son expuestos a cambios de salinidad reduciendo contradictoriamente la capacidad inmunológica al impedir una adecuada regulación de esta molécula ante un cambio de salinidad.

El presente estudio se realizó considerando que los organismos cultivados en un estanque externo estuvieron en condiciones similares a la que estarían los camarones en un estanque de cultivo comercial. Aunque esta es sólo una aproximación el hecho de que en los estanques externos los animales tienen acceso al alimento vivo, permite vislumbrar las variaciones fisiológicas que experimentan éstos cuando se les alimenta con una dieta balanceada con inmunoestimulantes en combinación con el alimento vivo. Al hacer esto se esperaba además, que las dietas con inmunoestimulantes fueran verdaderamente estimuladoras de la respuesta inmune mejorando integralmente además el estado nutricional y de salud de los animales. De acuerdo con los resultados obtenidos ahora es evidente que la concentración de BG adicionados en las dietas no mejoraron la condición nutricional ya que no ayudaron a los camarones a tolerar adecuadamente el reto salino.

Cuando se les expuso a un reto bajo de oxígeno disuelto tampoco se observó que las dietas con BG promovieran una mejor condición nutricional que los camarones del grupo C. Así mismo cuando se evaluó la capacidad inmunológica de estos organismos a través de la evaluación de las variaciones de la proPO se observó que en ambos casos, reto salino y el reto de oxígeno, los camarones alimentados con la dieta BG no fueron capaces de mantener elevados los niveles de esta molécula, la cual es un efector central de la repuesta inmune (Vargas-Albores *et al.* , 1993 a ; Perazzolo and Barraco, 1997 ; Johanson *et al.*, 2000).

Aunque en condiciones de laboratorio las dietas con inmunoestimulantes efectivamente promovieron la respuesta inmune de los camarones y mejoraron aparentemente la condición nutricional general, cuando se les aplicó a los organismos un estrés ambiental, la capacidad de inmunoestimular no sólo no mejoró la capacidad de los organismos si

no además modificó los patrones metabólicos reduciendo la capacidad de responder a retos ambientales tales como la baja de la salinidad o la concentración de oxígeno disuelto.

De acuerdo a Scidman and Lawrence, (1985), las variaciones ambientales suelen ser en las granjas el botón disparador del estrés en los camarones cultivados. Si el estrés es el primer paso en la cadena de eventos entre un estado de salud deficiente y la vulnerabilidad a las enfermedades, los alimentos utilizados en tales condiciones deberían de ser capaces de fortalecer a los camarones para poder tolerar tales situaciones ambientales. Es evidente de los resultados obtenidos ahora, que las dietas con BG suministradas en los camarones cultivados no cumplen con estos requisitos y evidentemente reducen aún la capacidad de los organismos de tolerar contingencias ambientales.

Al mismo tiempo, los resultados obtenidos ahora pusieron en evidencia que dietas bien diseñadas y que cubren con los requerimientos nutricionales de los camarones son suficientes para mantener el sistema inmunológico en alerta y proporcionar a los organismos las moléculas y la energía suficiente para tolerar cambios ambientales extremos. De acuerdo con Bachere, (2000) la profilaxis y la buena nutrición son dos elementos esenciales para el mantenimiento de una camaronicultura sana y libre de enfermedades. Ese tipo de estrategias acopladas con un manejo adecuado de los residuos de las granjas, del agua de desecho y del tipo de alimento conducirá al establecimiento de una industria auto sostenible con proyección a futuro capaz de producir camarones en un esquema ecológicamente sano y económicamente viable.

## **VII. Conclusiones.**

1. Los camarones alimentados con  $\beta$ - glucanos en los experimentos a nivel de laboratorio y en estanques externos no estimularon el crecimiento de los camarones.
2. Los camarones alimentados en condiciones de laboratorio con ambas frecuencias de aplicación de  $\beta$ - glucanos mostraron una resistencia de estrés salino similar a la dieta control.
3. Los  $\beta$ - glucanos favorecieron la formación de CBH en los organismos experimentales y fueron utilizados como fuente de energía durante el estrés salino.
4. Las dietas con  $\beta$ - glucanos no mejoraron la resistencia de los camarones a un estrés salino en condiciones de laboratorio, mostrando una respuesta inmune similar a la observada en los camarones alimentados con la dieta C.
5. La aplicación de  $\beta$ - glucanos continuo posiblemente provocó fatiga inmunológica a los organismos experimentales. En contraste la dieta C presento la mejor respuesta inmunológica en este experimento.
6. Aunque el uso de inmunoestimulantes en alimentos para camarón puede ayudar en primera instancia a la resistencia alas condiciones de estrés, en el presente estudio se observó que una dieta sin inmunoestimulante y que cubra el requerimiento nutricional de los camarones favorece un estado nutricional más apropiado que el observado en camarones alimentados con dosis de BG ya sea en forma permanente o intermitente.



### **VIII. Literatura Citada.**

- Abdel-Rahman, S. H., Kanazawa, A., Teshima, S. 1979. Effects of dietary carbohydrate on the growth and the level of the hepatopancreatic glycogen and serum glucose of prawn. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*. 45:1491 – 1494.
- Allain, C. A. 1974. Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin Chem* 20: 470.
- Angus, F. 1989. Triacylglycerol content as a condition index for fish, bivalve, and crustacean larvae. *Can. J. Fish. Aquaculture. Society*. 46:1868 – 1872.
- Ashida, M., Söderhäll, K. 1984. The prophenoloxidase activating system in crayfish. *Comp. Biochemistry. Physiology*. 77 B:21 – 26.
- Bachere, E. 2000. Shrimp immunity and disease control. *Aquaculture* 132: 3 -11.
- Bachere, E., Mialhe, E., Noel, D., Boulo, V., Morvan, A. y Rodríguez, J. 1995. Knowledge and research prospects in marine mollusc and crustacean immunology. *Aquaculture* 132: 17-32.
- Bedier, E., Cochard, J. C., Le Mullac, G., Y Patrois, J. 1998. Selective breeding and pathology in penaeid shrimp culture: The genetic approach to pathogen resistance. *World Aquaculture*. 29, 46 – 51.
- Bradford, M. M. 1976. A refined and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochemistry*. 72: 248.

- Bureau, D.P, Azevedo, P. A. Tapia-Salazar, M. and Cuzon G. 2000. Pattern and cost de growth and nutrient deposition in fish and shrimp: Potential implications and applications. V SIMPOSIUM INTERNACIONAL DE NUTRICION ACUICOLA. Mérida, Yucatan, México. 111- 140.
- Burrin, J. M., Price, C. P. 1985. Measurement of blood glucose. *Ann. Clin. Biochem.* 22: 237.
- Chang, C. F., Chen, H. Y., Su, M. S., and Liao, I-C. 2000. Immunomodulation by dietary B 1-3, glucan in the brooders of the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Fish & Shellfish Immunology* 10: 505 –514.
- Chen, J: C., Cheng, S. Y. 1993. Hemolymph PCO<sub>2</sub> hemocyanin, protein level and urea excretions of *Penaeus monodon* exposed to ambient ammonia. *Aquatic Toxicology.* 27 : 281 - 292.
- Cruz – Suárez., E. Ricque-Maric., D. Tapia – Salazar., M. 2000. Uso de Macrocystris en alimento para camarón. V SIMPOSIUM INTERNACIONAL DE NUTRICION ACUICOLA. Mérida, Yucatán, México. 28.
- Cuzon, G., Ceccaldi, J. 1971. Évolution des proteíns de hemólympe de *Penaeus keraturus* Durant le Jeúne. *Tethys.* 3: 247-250.
- Cuzon, G., Dos Santos, R., Hew, M., Poullaouec, G. 1981. Use of Spirulina in shrimp *Penaeus japonicus* diet. *J. World Maricul. Soc.* 12: 282-291.
- Destoumieux, D., Saulnier, D., Garnier, J., Jouffrey, C., Bulet, P., Bachere, E. 2001. Antifungal peptides are generated from the C terminus of shrimp hemocynin in response to microbial challenge. *The journal of Biological Chemistry.* 276: 47070 – 47077.

- Dubois, M. K., Lilles, L:A., Hamilton, J: C., Rebers, P. A., Smith, F. 1965. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analyt. Chemistry* 28: 350 – 356.
- Fossati, P., Prencipe. L.1982. Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide. *Clin. Chem.* 28: 2077.
- Gibson, R., P. L. Barker. 1979. The decapod hepatopáncreas. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.* 17:285– 346.
- Guzmán –Murillo, A., Ochoa, J. L., Vargas-Albores, F. 1996. The hemolytic activity in the haemolymph from brown shrimp *Penaeus californiensis* Holmes. *Comp. Biochemistry. Physiology.* 106 A:271 – 275.
- Hernández- López, J., Vargas-Albores, F. 1996. Implementación de un método de microplaca para la determinación de glucosa, colesterol, acilglicéridos, lactato y proteínas totales de la hemolinfa de camarón. CIB-NOR, La Paz, BC. 20 –39.
- Itami, T. Asano, M. Tokushige K. Kubono K. Nakagawa A. Takeno, N. Nishimura, H. Maeda, M. Kondo, M. Takahashi, Y. 1998. Enhancement of disease resistance of kuruma shrimp *Penaeus japonicus*, after oral administration of peptidoglycan derived from *Bifidobacterium thermophilum*. *Aquaculture* 164: 277 – 288.
- Johansson, M. W., Keyser, P., Sritunyalucksana, K., Söderhall, K. 2000. Crustacean hemocytes and haemotopoiesis. *Aquaculture* 191: 45-52.
- Johansson, M. W., Söderhall, K. 1985. Exocytosis of the prophenoloxidase activating system from crayfish haemocytes. *J. Comp. Physiology.* 156B: 175-181.

- Le Chevalier, P. and A. Van Wormhoudt. 1998. Alpha-glucosidase from the hepatopáncreas of the shrimp, *Penaeus vannamei* (Crustácea-Decapoda). *Journal of experimental zoology*. 280: 384-394.
- Le Moullac, G., de Laboric, L., Saulnier, D., Goarant, C. & Dehasque, M. 1998 a. Principles and problems involved in the evaluation of immunostimulants on juvenil shrimp. En *IV Simposium Internacional de Nutrición Acuicola*, La Paz, méxico. 1-12.
- Le Moullac, G., Le Groumellec, M. L., Ansquer, D., Froissard, S., Levy, P., Aquacop., 1997. Heamatological and phenoloxidase activity changes in the shrimp *Penaeus stylirostris* in relation with the moult cycle: protection against vibriosis. *Fish & Shellfish immunology* 7: 227 – 234.
- Le Moullac, G., Soyez, C., Saulnier, D., Ansquer, D., Avarre, J., Levy, P. 1998 . Effect of hipoxic stress on the immune response and the resistance to vibriosis of the shrimp *Penaeus*. *Fish & Shellfish Immunology* 8: 1 –18.
- Lignot, Jm H., Cochard, J. C., Soyez, C., Lemaire, P., G., C. 1999. Osmoregulatory capacity according to nutritional status, molt stage and body weight in *Penaeus stylirostris*. *Aquaculture* 170: 79 – 92.
- Lignot, J. H. Spaning-Peirrot, C. Charmantier, G. 2000. Osmoregulatory capacity as a tool in monitoring the physiologiacial condition and the effect of stress in crustaceans. *Aquaculture* 191, 209 – 245.
- Loret, S. M. 1993. Hemocyte differentiation in the shore crab (*Carcinus maenas*) could be accompanied by a loos of glycogen synthesis capability. *Journal of esperimental zoology*. 267: 548– 555.
- Marbach, E. P., Weil, M. H. 1967. Rapid enzymatic measurement of blood lactate and pyruvate. *Clin Chem*. 13: 314.

- Merchie, G., Kontara, E. K. M., Lavens, P., Robles, R., Kurmaly, K., and Sogeloos, P. 1995. Effect of vitamin C and astaxanthin on stress and disease resistance of postlarval tiger shrimp *Penaeus monodon* (Fabricius). *Aquaculture Research*. 29: 579-585.
- Meyers, S. P., Latscha, T. 1997. Carotenoids In: D'Abramo, L.C.D.E. and A.D.M. Ed. Crustacean Nutrition 6. *World Aquaculture Society*, Baton Rouge, Louisiana. 164 – 186.
- Muñoz, M., Cedeño, Rodríguez, J., Van der Knaap, W., Mialhe, E., Bachère, E. 2000. Measurement of reactive oxygen intermediate production in haemocytes of the penaeid shrimp, *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*. 29: 579-585.
- Molina, C., Rodríguez, J., Arango, J. I., Echeverría, F., Sotomayor, M. 2002. Efecto de las vitaminas C y E. En la inmunorespuesta de *L. vannamei*. con o sin glucanos. *Panorama Acuicola*. Vol. 7, 4: 52 -55.
- Ocean Garden, 1996. Comportamiento del mercado de camarón. *Bol.* 76: 13 .
- Omondi, J. G. and J. R. Stark. 1996. In vitro carbohydrate digestibility test in the Indian white shrimp, *Penaeus indicus* . *Aquaculture*. 139: 315-328.
- Paterson, B. D. 1993. The rise in inosine monophosphate and L-lactate concentrations in muscle of live penaeid prawns *Penaeus japonicus*, *Penaeus monodon* stressed by storage out of water. *Comp. Biochemistry. Physiology*. 106B: 395-400.
- Perazzolo, L. y Barraco, M. 1997. The prophenoloxidase activating system of the shrimp *Penaeus paulensis* and associated factors. *Dev. Comp. Immunol.* 21: 385-395.

- Racotta , I. S. Y Palacios, E. 1998. Hemolymph metabolic variables in response to experimental manipulation stress and serotonin injection in *Penaeus vannamei*. *Journal World Aquaculture Society* 29: 351 - 356.
- Rengpipat, S. Rukpratanporn, S. Piyatiratitivorakul, S. Menasaveta, P. 2000. Immunity enhancement in black tiger shrimp. *Penaeus monodon* by a probiont bacterium (Bacillus S11). *Aquaculture* 191:271 - 288.
- Rivonker , C. U., J. K. Thakur and U. M. X. Sangodkar. 1997. Food utilization, growth and lactate dehydrogenase activity of the prawn, *Metapenaeus dobsoni* (Miers) fed with commercial diet.. *Indian Journal of marine sciences* 26: 356 - 360.
- Rosas, C., Cuzon G., Gaxiola, G. Arena., L. Lemaire, P., Soyez, C., Wormhoudt, A. 2000. influence of dietary carbohydrate on the metabolism of juvenile *Litopenaeus stylirostris*. *J. Exp.Mar. Ecol.* 4. 127: 1 - 18.
- Rosas, C., Cuzon G., Gaxiola, G. Pascual. C., Taboada, G., Arena., L., Van Wormhoudt, A. 2002. An energetic and cibceptual model of the physiological role of dietary carbohydrates and salinity on *Litopenaeus vannamei*. juveniles *J. of Experimental Marine Biology and Ecology*. 268: 47 - 67.
- Rosas, C., Cuzon., Pascual. C., G., Gaxiola., Van Wormhoudt, A. 2001b. Effect of dietary protein and energy levels (P/E) in growth, oxygen consumption, hemolymph and digestive gland carbohydrates, nitrogen excretion and osmotic pressure of *Litopenaeus vannamei* and *Litopenaeus setiferus*. Juveniles (Crustacea, Decapoda; Penaeidae). *Aquaculture Research*. 32: 1 - 20.
- Rosas, C., Martínez, E., ., Gaxiola, G., Brito, R., Diaz-Iglesias, E and Soto, L. A. 1998. Effect of dissolved oxygen on the energy balance and survival of *Penaeus setiferus*, juveniles. *Mar Ecol. Prog. Ser.* 174: 67 - 75.

- Saidman, E. R., Lawrence, A. L. 1985. Growth, feed digestibility, and proximate body composition of juvenile *Penaeus monodon* growth at different dissolved oxygen levels. *J World. Maricul. Soc.* 16: 333 - 346.
- Sánchez, A., Rosas, C., Escobar, E., Soto, L. A. 1991. Skeleton weight free oxygen consumption related to adaptation to environment and habits of six crustacean species. *Comparative Biochemistry and Physiology.* 100A: 69 - 73.
- Shiau, S. Y., and Peng, C. Y. 1992. Utilization of different carbohydrates at different dietary protein levels in grass prawn, *Penaeus monodon*, reared in seawater. *Aquaculture.* 101 : 241 - 250.
- Söderhäll, K., Aspan, A. & Duvic, B. 1990. The proPo system and associated proteins - Role in cellula communication in arthropods. *J. immunology.* 141: 896 - 907.
- Söderhäll, K. 1992. Biochemical and molecular aspects of cellular communication in arthropods. *Boll. Zool.* 59: 141 - 151.
- Söderhäll, K., Cerenius, L. 1998. Role of the prophenoloxidase - activating system in invertebrate immunity. *Curr. Opin. Immunology.* 10: 23 - 28.
- Söderhäll, K. 1982. Prophenoloxidase activating system and melanization - a recognition system of arthropods. A reviem. *Develop. Comp. Immunology.* 6: 601 - 611.
- Söderhäll, K., Vey, A. y Ramstedt, M. 1984. Hemocyte lysate enhancement of fungal spore encapsulation by crayfish hemocytes.. *Develop. Comp. Immunology.* 8: 23 - 29
- Sritunyalucksana, K. and Söderhäll, K. 2000. The proPO and clotting system in crustaceans. *Aquaculture.* 191: 53 - 69.

- Teshima, S. I. 1998. Nutrition of *Penaeus japonicus*. *Reviewa in Fisheries Science*. 6: 97 - 111.
- Van-Handel, E. 1965. Estimation of glycogen in small amounts of tissue. *Analytical Biochemistry*. 11: 256-265.
- Vargas-Albores, F. 1995. The defense system of Brown shrimp (*Penaeus californiensis*): Humoral recognition and cellular responses. *J. Mar. Biotechnol.* 3: 153-156.
- Vargas-Albores, F., Guzmán-Morillo., A., Ochoa, J. L. 1993. An anticoagulant solution for haemolymph collection and prophenoloxidase studies of penaeid shrimp (*Penaeus californiensis*). *Comp. Biochemistry. Physiology*. 106A: 299-303.
- Vargas-Albores, F., Guzmán-Morillo., A., Ochoa, J. L. 1992. Size-dependent haemagglutinating activity in the haemolymph from sub-adult blue shrimp (*Penaeus stylirostris* Stimpson). *Comp. Biochemistry. Physiology*. 103A: 487-491.
- Vargas-Albores, F., Higuera- Ciapara, I., Jiménez-Vega, F., Hernández-López, J., Gollas-Galván, T., Yepiz-Plascencia, G. 1996. Posibilidades de inmunoestimulación del camarón a través del alimento. In *III Simposium Internacional de Nutrición Acuicola, Monterrey, México*.
- Vargas-Albores, F., Jiménez-Vega, F., Yepiz-Plascencia, G. 1997. Purification and comparison of  $\beta$ -1,3glucan binding protein from white shrimp (*Penaeus vannamei*). *Comp. Biochemistry Physiology*. 116B: 453-458.
- Vinagre, A., Da Silva, R. 1992. Effect of starvation on the carbohydrate and lipid metabolism in crabs previously maintained on a high protein or carbohydrate-rich diet. *Comp. Biochemistry. Physiology. Mar.* 102A: 579-583.



Wigglesworth, J. M., Griffith, D. R. W. 1994. Carbohydrate digestion in *Penaeus monodon*.  
Mar. Biol. 120: 571-578.

W. S. F. 1998. World Shrimp Farming. In Annual Report Shrimp News International, San  
Diego, C.A.

Zar, J. H. 1974. Bioestatistical Analysis, Prentice Hall, Englewood Cliffs, N J.

# ANEXOS

**PAGINACIÓN  
DISCONTINUA**

**PHYSIOLOGICAL, NUTRITIONAL AND IMMUNOLOGICAL ROLE OF DIETARY  $\beta$  1-3 GLUCAN AND ASCORBIC ACID 2-MONOPHOSPHATE ON *L. vannamei* JUVENILES.**

Nelda López<sup>1</sup>, Gerard Cuzon<sup>2</sup>, Gabriela Gaxiola<sup>3</sup>, Gabriel Taboada<sup>3</sup>, Manuel Valenzuela<sup>3</sup>,  
Cristina Pascual<sup>3</sup>, Ariadna Sánchez<sup>3</sup> and Carlos Rosas<sup>3</sup>.

1. Universidad Centroamericana, Managua, Nicaragua
2. Centre Oceanologique du Pacifique (COP), IFREMER, BP 700, BP 7004, Taravao, Tahiti, Polynesie Francaise.
3. Grupo de Biología Marina Experimental, Fac. de Ciencias UNAM, Apdo. Post. 69, Cd. del Carmen, Campeche, Mexico. e-mail CR: crv@hp.ciencias.unam.mx.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## Abstract

The present paper was aimed at determining the effect of dietary  $\beta$  1-3 glucan (BG) and a megadose of vitamin C on the nutrition (growth, and survival, blood glucose, lactate, acylglycerides, cholesterol, hemocyanin, digestive gland glycogen) and on the immunological system (blood cells, proPo) in *L. vannamei* juveniles. Each treatment was run five times. Nutritional condition and immunological response of shrimp were recorded after 40 days of feeding, and during 48 h after a salinity shock (35 to 0‰). A significant greater growth rate was observed in shrimp fed with BG or vitamin C diets than in the control group. Higher blood proteins, total blood cells, granular cells, and proPo activity were recorded in shrimp fed vitamin C as compared to the remainder treatments. According to these results two different metabolic routes could be involved in growth rate of shrimp and protein metabolism. The first one could be related to BG degradation in the digestive gland by  $\beta$ -glucanases to produce energy, permitting the use of more proteins for growth. The second could be related with the role of vitamin C in animal health, enhancing general metabolism in shrimp. The salinity stress induced a rapid use of reserves, acylglycerides and cholesterol were reduced in blood and probably used as a source of energy or synthesis in the digestive gland. The increment in digestive gland glycogen 24 h after the salinity shock could evidence the use of these reserves by shrimp fed with any of the diets. In general, after the salinity shock blood cells increased in shrimp fed with glucans and decreased in shrimp fed with vitamin C, whereas proPO decreased in all shrimp after the salinity shock. It means that after the salinity shock shrimp fed with glucans could synthesize cells and proPO, whereas in shrimp fed vitamin C, blood cells were just used to respond to the stress. After the salinity shock, an increment in the proPO/granular cell ratio was observed in shrimp fed with vitamin C, indicating that these shrimp could rapidly increase the components of their immune system. In contrast, a continuous reduction in proPO/granular cell ratio was observed in shrimp fed with glucans, revealing that, with this type of immunostimulant, shrimp drive their immunological equipment to respond continuously to the stress. These results could explain why shrimp fed with immunostimulants present immunological fatigue in contrast to shrimp fed with additives that improve their nutritional status, like vitamin C.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## Introduction

World production of farmed shrimp has been increasing during the last twenty years, mainly as a result of an increase in farming areas and due to higher stocking densities. In the process, environmental conditions have deteriorated both inside and outside these farms in many regions, inducing increments in disease incidence and, consequently, affecting production negatively. The environmental stress caused by farms discharges into estuaries and bays and the stress induced in ponds by high densities are factors predisposing the animals to become more receptive to pathogens (Xu et al., 2001). According to Bachere, (2000) the long-term sustainability of the shrimp industry depends on the equilibrium among: 1) environmental quality, 2) prevention of diseases by adequate diagnoses and epidemiological surveys of the pathogens, and 3) the health status of the shrimp, as well as selection programs to obtain disease-resistant animals.

To reduce stress, the shrimp industry has been using antibiotics, immunostimulants, and diverse types of food additives (carotenoids, kelp powder, *Spirulina*, vitamin E, C, etc.) trying to offer an adequate diet to maintain the health of cultured shrimp. Bacteriosis can be controlled by antibiotic treatment, but the use of antibiotics represents environmental hazards and spreads antibiotic-resistant genes. Additionally, the viral origin of some epizootics limits the efficiency of this treatment (Alday-Sanz et al., 1998).

Biological compounds, called immunostimulants, are available as alternative treatments, playing the role of alarm molecules that activate the immune system.  $\beta$  1-3 glucan has successfully been used as immunostimulant to enhance resistance of shrimp against bacterial or viral infections. Itami et al., (1998) reported that dietary administration of the peptidoglycan ( $\beta$  1-3 glucan) derived from *Bifidobacterium thermophilum* increases the resistance of *Fenneropenaeus japonicus* against vibriosis. Using a different glucan,  $\beta$  1-3-1-6 glucan, extracted from the yeast cell wall, Sung et al., (1998) demonstrated enhanced resistance of *P. monodon* to vibriosis and white spot syndrome virus (WSSV) infection. Chang et al., (2000) showed that  $\beta$  1-3 glucan enhances hemocyte phagocytic activity, cell adhesion, and superoxide anion production when added to *P. monodon* diets.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Peptidoglycans are cell wall fragments of micro-organisms that render animals more resistant to microbial infections. Shrimp fed with peptidoglycans respond to an immunostimulant in the same manner as to a microbe aggression. Shrimp immune system has a strong proteinic base. Proteins are involved in recognizing foreign glucans through lipopolysaccharide binding protein (LPSBP) and  $\beta$  glucan binding protein (BGBP) (Vargas-Albores and Yepiz-Plascencia, 2000). The clotting protein is involved in engulfing foreign invading organisms and prevents blood loss upon wounding (Hall et al., 1999; Montaña-Pérez et al., 1999). Defense reactions in shrimp are often accompanied by melanization. ProPO activating system, mediated by hemocytes, is a zymogen of phenoloxidase (PO) enzyme that catalyzes both o-hydroxylation of monophenols and oxidation of phenols to quinones leading to the synthesis of melanin (Sritunyalucksana and Söderhall, 2000). Conversion of proPO to PO is through a serine protease called prophenoloxidase activating enzyme (ppA) that is regulated by another protein, the  $\alpha$ -2 macroglobulin, a trypsin inhibitor (Perazzolo and Barracco, 1997). The innate immune response of shrimp also relies upon the production, in hemocytes, of antimicrobial peptides called penaeidins that are active against a large range of pathogens essentially directed against Gram-positive bacteria via a strain-specific inhibition mechanism (Destoumieux et al., 2000).

Nutritional status is considered one of the important factors that determines the ability of animals to withstand infections; hence, nutritional status is considered a good health indicator of shrimp (Bachere, 2000; Merchie et al., 1998). In previous studies, we determined some blood metabolites and hemocyanin, together with growth and survival in *L. vannamei*, *L. stylirostris*, and *L. setiferus* to assess the nutritional role of dietary carbohydrates and proteins (Rosas et al., 2001a; Rosas et al., 2000; Rosas et al., 2001b; Rosas et al., 2002). The results demonstrated that blood glucose, acylglycerides, cholesterol, and lactate together with blood protein, hemocyanin ([Hc]), and osmotic pressure are good indicators of nutritional health, the latter understood as a dietary and environmental condition in which shrimp growth is maximal under experimental conditions.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Vitamin C plays an important roles in animal health as antioxidant by inactivating damaging free radicals produced through normal cellular activity and diverse stressors (Halver, 1995). Inadequate dietary levels of vitamin C in juvenile shrimp may result in black dead syndrome, reduced growth rates, poor feed conversion ratios, decreased resistance to stress, and reduced capability to heal wounds (Lightner et al., 1979; Magarelli et al., 1979). According to Catacutan and Lavilla-Pitogo, (1994) and Merchie et al., (1998) vitamin C plays a role as immunostimulant, as evidenced by the ability of *P. monodon* postlarvae and juveniles to avoid vaculovirus and to resist disease (*Vibrio harveyi*), and saline shock. Teshima, (1998) reported that vitamin C was effective in increasing resistance of *Feneroppenaeus japonicus* to *Vibrio spp.* Although the optimal supplemental level of vitamin C for *L. vannamei* shrimp is around 100 mg kg<sup>-1</sup> diet, a level of 2000 mg kg<sup>-1</sup> has been proposed to ensure high resistance of shrimp postlarvae to stressful environmental conditions and as protection against bacterial infection (Montoya and Molina, 1995; Lavens et al., 1999; Kontara et al., 1995). The mode of action of vitamin C as an immunostimulant is not clear, although its antioxidant role and in consequence cell protection could be a mechanism to preserve hemocytes, improving the general immunological system of shrimp.

One of the problems with the application of dietary immunostimulants or vitamin C is the lack of information about the optimal doses (frequency and quantity) to be included in diets. Immunostimulatory fatigue was reported after 24 days in *P. monodon* brooders, when a diet with 2g kg<sup>-1</sup> of  $\beta$  1-3 glucan was administered permanently during 40 days (Itami et al., 1998). In a study with *F. japonicus*, a positive increase in disease resistance was reported using 0.2 mg  $\beta$  1-3 glucan per kilogram of diet fed with different feeding schedules: permanently for 95 days, 7 days  $\beta$  1-3 glucan diet-7 days of control diet, and 2 days  $\beta$  1-3 glucan diet-5 days of control diet (Rengpipat et al., 1998). In another study, enhanced immune response was observed in *P. monodon* fed permanently for 30 days with fresh *Bacillus* S11 mixed with a commercial feed at 1:3 wet weight proportion (Rengpipat et al., 2000).

The present paper was aimed at assessing the effect on nutrition (growth, and survival, blood glucose, lactate, acylglycerides, cholesterol, hemocyanin, digestive gland glycogen)

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



and on the immunological system (blood cells, proPo) of dietary  $\beta$  1-3 glucan and a megadose of vitamin C on *L. vannamei* juveniles fed with different feeding schedules: permanently, and 7 days experimental diet diet-7 days of control diet. A diet without  $\beta$  1-3 glucan supplemented with an optimal vitamin C level was used as the control diet.

## Material and methods

### *Preparation of diets*

Juveniles of *L. vannamei* were fed during 40 days with artificial diets, prepared with: a) 2 g/kg of  $\beta$  1-3 glucan and 0.2g/kg vitamin C, b) mega dose of vitamin C (5g per kg diet) and without  $\beta$  1-3 glucan and c) a diet without  $\beta$  1-3 glucan, supplemented with 0.2g of vitamin C (Table 1). The experimental diets were prepared by thoroughly mixing the dry ingredients with oil and then adding water until a stiff dough resulted. This was then passed through a mincer with a die, and the resulting spaghetti-like strings were air dried at 60 °C. After drying, the material was broken up and sieved to a convenient pellet size and stored at -4 °C. Five tanks were randomly assigned to each diet.

### *Growth and survival experiments*

A group of 250 shrimp ( $2.01 \pm 0.02$  g wet weight) were used. *L. vannamei* were obtained from Pecis Industries S.C., in Yucatan, Mexico. Shrimp were reared for 40 d in 90-L tanks (10 shrimp/tank) and fed with different types of diet and feeding schedules : permanently experimental and control diets (treatment 1:  $\beta$  1-3 glucan diet; treatment 2: vitamin C diet; treatment 3 control diet), 7 days with  $\beta$  1-3 glucan diet-7 days control diet (treatment 4) and 7 days mega dose of vitamin C diet-7 days control diet (treatment 5). Every treatment was repeated five times. The photoperiod was 12h:12h, water temperature was  $28 \pm 1$  °C, dissolved oxygen was > 5.0 mg/L, salinity was 35 ‰, and pH was > 8.1. The shrimp were fed *ad libitum* two times a day (0800 and 2000). Uneaten food particles and feces were removed regularly.

Growth rate was evaluated as the difference between wet weight at the beginning and the end of the experiment and calculated as daily growth coefficient (DGC,%) (Bureau et al., 2000):

$$DGC = 100 * [(Final\ weight)^{1/3} - (Initial\ weight)^{1/3}]/Time\ (days)$$

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Survival was calculated as the difference between the number of live animals at the beginning and the end of the experiment.

### *Salinity Challenge*

After day 40, 40 shrimp per treatment were separated in two groups: one was maintained in 35‰ (10 shrimp; one experimental tank per treatment) and the other one (30 shrimp; three experimental tanks per treatment) were exposed to a rapid change of salinity, from 35‰ to fresh water (0‰). For this, the seawater volume of every tank was reduced in 50%, letting fresh water to flow in until 0‰ salinity was reached. The change in salinity took 30 min. A similar procedure was applied to shrimp maintained in 35‰ but using only sea water (35‰) and were used as a control shrimp. Once 0‰ salinity was obtained, survival, as well as the physiological, nutritional and immunological status of shrimp, was followed at 4, 24, and 48 h. During this time, shrimp were fed only once every 24h. Survival was expressed as the cumulative stress index (CSI) proposed by Merchie et al., (1998) and calculated as the average value of cumulative mortalities obtained from each replicated diet in relation to the experimental time.

### *Physiological, nutritional and immunological evaluations*

#### *Blood constituents*

After day 40, nine shrimp per treatment were sampled for nutritional (hemolymph glucose, lactate, cholesterol, acylglycerol, proteins, hemocyanin, and digestive gland glycogen), immunological (ProPo oxidase activity in degranulated of hemocytes and blood cells) and physiological (osmotic pressure) evaluations. These results were considered as the base line before the salinity challenge.

Blood metabolite measurements were made in living fasted (12h) shrimp. Before sampling, shrimp were placed in pre-chilled (18 °C) and aerated seawater for 5 min to reduce the effect of manipulation before hemolymph extraction. Only shrimp in inter-molt stage (C stage) were used. Hemolymph (approximately 200-300 µL per shrimp) was individually sampled through a pre-chilled syringe needle inserted at the base of the fifth pereopod after the shrimp had been dried with a paper towel. The individual weight ( $\pm$  0.05 g) was

recorded and molting stage was observed using uropod characteristics (Drach and Tchernigovtzeff, 1967).

**Osmotic pressure.** Osmotic pressure of the hemolymph and water was measured in a Micro-osmometer with 20  $\mu\text{L}$  of sample per titration (3 MO-PLUS; Advanced Instruments, Inc. USA). The osmotic capacity (OC) was defined as the difference between the osmotic pressure of hemolymph and the external medium (Lignot et al., 1999).

**Hemocyanin.** For hemocyanin [Hc] measurements, 10  $\mu\text{L}$  hemolymph were immediately diluted with 990  $\mu\text{L}$  distilled water in a 10-mm cuvette, absorbance was measured at 335 nm. Hemocyanin concentration was calculated using an extinction coefficient of  $\epsilon = 17.26$  calculated on the basis of the 74000 Da functional subunit, (Chen and Cheng, 1993).

Commercial kits were used for glucose (GH) (GOD-PAD, Merck-740393), lactate (Sigma-cat. 735), triacylglycerol (TAG; GPO-PAP, Merck, cat 14354) and, cholesterol (CHOD-PAP, Merck, cat. 14349). Determinations were adapted to a micro plate using 20  $\mu\text{L}$  of plasma obtained at 8000 g centrifugation and 200  $\mu\text{L}$  of enzyme chromogen reagent. Absorbance was recorded in a micro-plate reader (BIO-RAD model 550) and concentrations were calculated from a standard substrate solution. Plasma was further diluted 1:500 for protein (HP) determination by the Bradford, (1976) technique adapted to a micro plate method using commercial chromogen reagent (Sigma, cat. 610) and bovine serum albumin as standard.

Glycogen in digestive gland was extracted in the presence of sulfuric acid and phenol (Dubois et al. 1965). The digestive gland was first homogenized in trichloroacetic acid (TCA, 5%) for 2 min at 6,000 rpm. After centrifugation (7000 g) the supernatant was quantified, this procedure was done twice. One milliliter of supernatant was pipetted into a tube and mixed with 5 volumes of 95% ethanol. The tubes were placed in a oven at 37-40°C for 3 h. After precipitation, the tubes were centrifuged at 7000 g for 15 min. The glycogen (pellet) was dissolved by adding 0.5 mL of boiling water, then, 5 mL of

concentrated sulfuric acid and phenol (5%) was added and mixed. The content of the tubes was transferred to a cuvette and read at 490 nm in a spectrophotometer.

#### *Immune response*

Chemicals and solutions. Because the ProPo system can be activated by endotoxins, all glassware was washed with E-Toxa-Clean® and all solutions were prepared using pyrogen-free water. Shrimp salt solution was prepared according to Vargas-Albores *et al.* (1993); 450 mM NaCl, 10 mM KCL, 10 mM HEPES, pH 7.3, 850 mOsm kg<sup>-1</sup>. The anticoagulant solution for hemolymph extraction was prepared by adding 10 mM of EDTA-Na<sub>2</sub> to the shrimp salt solution. A sodium cacodylate buffer (Cac, 10 mM cacodylate, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7.0) was used to determine phenoloxidase activity.

Prophenoloxidase (ProPo) activity. A sample of 50 µL was incubated 3 min at 25 °C with 50µL of trypsin type IX (0.1 mg/mL). Then 50 µL of L-DOPA (3 mg/mL in Cac buffer) was added and incubated 10 min. The absorbance at 490 nm was measured (Hernández-López, *et al.*, 1996).

Hemocyte counting. A sample of 150 µL of hemolymph was mixed with an Alsever solution (113 mM glucose, 27.2 mM sodium citrate, 2.8 mM citric acid, 71.9 mM NaCl) and 10% formaldehyde (v/v). This sample was stored frozen until analysis. Hemocyte counting was done with a microscope and a Neubauer chamber. Cellular characterization was done taking into account size, form, and granular content of the cells (Le Moullac *et al.*, 1997).

#### *Statistical analysis*

ANOVA was applied to results of immunological and nutritional parameters. A comparison was made first to know the differences between type of diet and type of feeding after the salinity challenge. A two-way ANOVA was applied to assess the effect of

the salinity challenge in relation to exposure time on immunological and nutritional parameters.

## Results

### *Growth rate and survival*

The DGC % was affected by the type of diet and the type of feeding (Fig. 1;  $P < 0.05$ ). A significant lower DGC% was observed in shrimp fed with control diet as compared to the other treatments ( $P < 0.05$ ). Survival was not affected by diet or type of feeding ( $P > 0.05$ ). A mean value of 90% survival was obtained with all treatments.

### *Salinity Challenge*

#### *Physiological, nutritional, and immunological evaluations*

**Base line.** Before the saline shock, glucose and lactate blood levels in shrimp fed with control diet were significantly higher than those observed in shrimp fed with any of the remaining treatments ( $P < 0.05$ ; Fig. 2). Acylglycerides, cholesterol, and oxyhemocyanin (mean value of 2.34 mmol/l) did not show significant changes among treatments ( $P > 0.05$ ). In contrast, blood protein of shrimp fed permanently (VCP with vitamin C) resulted significantly higher than that observed with the other treatments. A low value of protein was observed in shrimp fed with control diet. Digestive gland glycogen was affected more by the diet with high values in BGC and VCC than with the other treatments ( $P < 0.05$ ). A higher osmotic pressure was observed in shrimp fed with control diets and BGC than with the other treatments (Table 2).

Immune response was affected by the type of food (Fig. 3). Before the saline shock, higher values of total hemocytes, granular cells, and ProPo were observed in shrimp fed with VCP and VCC as compared to those obtained in shrimp fed with  $\beta$ -glucans and control diets (Table 2;  $P < 0.05$ ).

*Stress index, physiological, nutritional and immunological evaluations*

*After salinity shock.*

A lower sensitivity to saline shock was observed in shrimp fed with PBG, CBG and PVC diets (CSI mean value of 3.17), than that observed in shrimp fed with VCC (4.38) and control diets (5.24) (Fig. 4). After the salinity shock the nutritional and physiological blood parameters were differentially affected by the type of diet (Table 2 and 4). After the shock a significant increase in blood glucose was observed after 4 h in shrimp fed with PBG, PVC and CVC ( $P < 0.05$ ). This increment was of 165, 145, and 141% higher than that observed before the salinity shock (Fig. 5). There was a significant positive interaction between type of diet and time after the salinity shock ( $P < 0.05$ ) (Table 4). In shrimp fed with CBG, glucose remained stable after the salinity shock and in the control group at 24 and 48 h blood glucose was 38% lower than that observed before the salinity shock (Fig. 5; Table 2). Type of diet and interaction between type of diet and time after salinity shock were significant ( $P > 0.05$ ; Table 4). Shrimp fed with PBG maintained the lactate blood levels without changes after the salinity challenge with a mean value of 0.055 mg/ml (Table 2; Fig. 5). Shrimp fed with CBG and control showed a reduction in blood lactate 4 and 24 h after the salinity shock, respectively (Fig. 5). In contrast, an increment in blood lactate after the salinity shock was observed in shrimp fed with PVC and CVC (Table 2). In shrimp fed with PVC and 48 h after the salinity shock blood lactate concentration was 350% (0.070 mg/ml) higher than that observed before salinity shock (0.020 mg/ml). Shrimp fed with CVC showed a more erratic behavior with high values at 4 h, similar values to the control ones at 24 h, and high values (0.080 mg/ml) at 48 h (Table 2, Fig. 5). A significant reduction in AG was observed in all shrimp 48 h after the salinity shock (Table 2, 4;  $P < 0.05$ ), values were between 44 to 73% of those observed before the salinity shock (Fig. 5). Type of diet, time after salinity shock, and the interaction between both effects affected blood cholesterol levels (Tables 2 and 4; fig. 5;  $P < 0.05$ ), which decreased 48 h after the shock.

Type of diet and time after salinity shock affected blood protein ( $P < 0.05$ ; Table 2 and 4). In shrimp fed with PBG, CBG, PVC, and control diets an increment in blood protein was recorded 4 h after salinity shock (23, 42, 19, and 37% respectively) (Fig. 6). Forty-eight

hours after the salinity shock, blood protein from all shrimp reached a value similar to that obtained before the salinity shock (Fig. 6). Hemocyanin was affected only by the exposure time to the salinity shock. Only shrimp fed with PBG and CBG showed a significant increment in OxyHc 48 h after the shock ( $P < 0.05$ ; Fig. 6). In all the other treatments OxyHc was not affected by the salinity shock ( $P > 0.05$ ).

Osmotic pressure was affected by type of diet, time after salinity shock, and the interaction between both effects ( $P < 0.05$ ; Table 4). A significant reduction in osmotic pressure was observed in all shrimp but it was more pronounced in shrimp fed the control diet (Fig. 6). Digestive gland glycogen (DGG) was affected by type of diet, time after salinity shock, and interaction between both effects ( $P < 0.05$ ; Tables 2 and 4). Four hours after the salinity shock a 77% reduction in DGG was observed in all shrimp as compared to the pre-challenge value. (Fig. 6). Twenty four hours after the salinity shock DGG increased 63, 33, 49, 67, and 62% of its values before the salinity shock in all shrimp (Table 2; Fig. 6). Forty eight hours after the salinity shock DGG was reduced anew, reaching 5, 8, 10, 7, and 30% of the concentration observed before the salinity shock with PBG, CBG, PVC, CVC, and control diets, respectively (Table 2, Fig. 6).

The immune response was affected by diet and time after salinity shock (Table 3 and 5). Before salinity shock ProPO levels were similar among diets with a mean value of 1.0  $DO_{490nm}$  ( $P > 0.05$ ). However, 4 h after salinity ProPO of shrimp fed with PBG showed a concentration 29% higher than that observed before the salinity challenge. In contrast, ProPo levels with the other treatments were reduced 4 after the salinity shock (Fig. 7). In shrimp fed with CBG and PVC, ProPO levels decreased, reaching its lowest value 48 h after the salinity shock (Fig. 7). In shrimp fed with CVC and control, ProPO levels were almost recovered 48 h after the salinity shock with values close to those obtained before the salinity shock.

Total hemocytes were affected by both type of diet and time after salinity shock (Fig. 7; table 3). Before salinity shock, total hemocytes concentration was significantly higher in shrimp fed with PVC and CVC than in shrimp fed with glucans and control diet ( $P < 0.05$ ;

Table 3). After the salinity shock, the behavior of total hemocytes was related with the diet (Fig. 7). In shrimp fed with glucans combined or permanent and with control diet an increment in total hemocytes was observed 4 or 24 h after the salinity shock ( $P < 0.05$ ). In contrast, in shrimp fed with vitamin C permanent or combined a reduction in hemocytes was observed 4 or 24 h after salinity shock ( $P > 0.05$ ; Fig. 7). All shrimp reached a total hemocytes concentration 48 h after the salinity shock similar to the pre-challenge concentration (Fig. 7). The same behavior was observed in granular cells (Fig. 7).

#### Discussion.

$\beta$ -glucans (BG) and vitamin C given permanently or combined with the control diet enhanced growth rate (Fig. 1). Although improvement of growth rate has been observed in *F. japonicus* (Itami et al., 1998) and *P. monodon* (Rengpipat et al., 1998) fed with peptidoglycan or probiotics there is no explanation on how these additives work to enhance growth rate. The mode of penetration of BG through the digestive track remains to be determined, however Wigglesworth and Griffith, (1994) observed that *P. monodon* is well equipped to digest BG. If BG can be digested by shrimp and is a source of energy, it can be suggested that growth rate was enhanced by the energetic benefits obtained through BG. In this situation, BG could be lost during the digestion process affecting the available BG concentration as immunostimulant but not as a source of energy. This loss would not be important since the shrimp immune system can react with very small amounts of BG (in the range of picograms) (Johansson et al., 2000).

An excess of vitamin C either combined with the control diet or given permanently produced a significant greater growth rate than that observed in shrimp fed with the control diet. Although vitamin C in excess enhanced the growth rate of several shrimp species there are no reports showing an increment in growth rate according to its concentration.

Lavens et al., (1999) reported significantly increased growth rate and survival for postlarvae of *L. vannamei* fed with ascorbic acid (AA), between 100 and 2000 mg/kg diet. Merchie et al., (1998) observed a significant increment in biomass production of *P. monodon* postlarvae fed with 1700 or 3400 mg AA/kg diet. In another study Shiau and Hsu, (1994) reported similar growth rates in *P. monodon* juveniles fed between 500 to 2000 mg



AA/kg diet showing that for postlarvae or juveniles of this species ascorbate absorption could be limited in the digestive gland, justifying the growth rate plateau observed when shrimp are fed with vitamin C in excess of 100 mg/kg diet. Whether vitamin C in excess is limited or not in the digestive gland, it is clear that growth rate was enhanced in *L. vannamei* by the improved physiological conditions in the shrimp fed with these diets through the role of vitamin C in “reducing stress” (Itami et al., 1998).

Acylglycerides and cholesterol were not modified by type of diet showing that the differences in growth rate were not associated with either type of nutrients. In contrast, blood glucose presented an inverse relation with growth rate, i.e., low values of blood glucose in shrimp fed with BG and vitamin C and high values in shrimp fed with the control diet. Inversely the digestive gland glycogen and blood protein were higher in shrimp fed with BG and vitamin C than in shrimp fed with the control diet (Fig. 2). According to these results, two different metabolic routes could be involved in the effect of dietary immunostimulants or vitamin C on glycogen synthesis and protein metabolism. The first one could be related with BG degradation in the digestive gland by  $\beta$ -glucanases (Wigglesworth and Griffith, 1994) to produce energy and of glucose to glycogen through the UDP-glucose pathway (Rosas et al., 2002). In this situation the high amount of dietary protein could be absorbed through the digestive gland passing to the blood without having been used as a source of energy. The second one could be related to the role of vitamin C in biological functions. According to Shigueno and Itoh, (1988), vitamin C improves the general physiological status of shrimp through its role in animal health as antioxidant by inactivating damaging free radicals produced through normal cellular activity and as a cofactor in carnitine synthesis. Taking into account that carnitine, synthesized from lysine and methionine, is involved in the effective utilization of stored lipid for energy (Masumoto et al., 1991; Catacutan and Lavilla-Pitogo, 1994), it can be suggested that the increment in glycogen observed in shrimp fed with vitamin C in excess is related with the improvement of the general metabolism of shrimp, including glycogen synthesis (favored by carnitine synthesis and lipid metabolism) (Abdel-Rahman et al., 1979) and protein metabolism (Reddy et al., 1999).

Vitamin C and BG have been demonstrated to have immunostimulant properties in shrimp (Itami et al., 1998; Merchie et al., 1998). The main problem is that the minimum effective dose of both additives to enhance the immune system remains to be determined. In the present study we used a dose of 2 g/kg (0.2%) of BG and 2000 mg/kg of vitamin C as recommended to enhance the immune response in *L. vannamei* shrimp (Rodriguez et al., 2000; Kontara et al., 1995). Before the saline challenge and using 2g/kg diet of BG, total hemocytes and granular cells were not different from shrimp fed with the control diet, with BG, or 7 days combined with the control diet (Fig. 3). In contrast a significantly higher concentration of total cells and granular cells was observed in shrimp fed with vitamin C permanently and combined with the control diet (Fig. 3). ProPO activity was higher in shrimp fed with vitamin C combined with 7 days of control diet, indicating that both hemocytes and proPo content in shrimp fed with these diets were positively improved.

According to Bachere, (2000), the immune response needs to be analyzed under stress conditions in cultured shrimp. In this sense we used a salinity shock as stressor as has been described before for both *P. monodon* (Merchie et al., 1998) and *L. vannamei* (Kontara et al., 1995) fed with an excess of vitamin C. An increased resistance to the salinity shock was observed in relation with the use of BG or vitamin C. Although there are no reports of enhanced stress resistance in shrimp fed with BG, this type of response has been observed in shrimp fed with vitamin C in excess and astaxanthin (Merchie et al., 1998). Blood lactate has been used as an index of stress in *L. vannamei* when values exceed 0.5 mg/ml (Racotta and Palacios, 1998). Taking into account that in the present work we observed values lower than in stressed shrimp, it can be expected that the observed lactate concentration has a metabolic role during the stress probably through the gluconeogenic pathway (Vinagre and Da Silva, 1992).

During a saline shock several physiological and immunological functions are involved. In low salinity, shrimp need to use protein as a source of amino acids to maintain the osmotic pressure (Claybrook, 1983). During salinity acclimation, a very rapid change in free amino acid content occurs (Gerard and Gilles, 1972) suggesting that the regulation of cell volume after a hypo osmotic change is a rapid process. Although in *L. vannamei* the final free

amino acid pool (FAA) level is reached 24 h after a hypo osmotic shock from 37.5‰ to 28‰ salinity (Richard et al., 1975), in the present study there was a decrease in blood osmotic pressure in all shrimp fed with any of the diets, indicating that with the applied saline shock extra cellular regulation is not powerful enough to ensure homeostaticity, and the tissue will in consequence undergo osmotic stress. According to Rosas et al., (2001a) protein metabolism is basic to ensure FAAs allowing shrimp to compensate its homeostaticity, for this reason shrimp are more dietary proteins dependent in diluted environments. Recently Shiau, (1998) showed that protein requirements of *P. monodon* reared at 16‰ salinity was higher (44%) than that observed in shrimp maintained in 40‰ salinity (40%).

Protein in hemolymph was elevated 4 h after the salinity shock returning to initial values 48 h after in all shrimp, evidencing that dietary protein level was adequate to ensure a rapid response to the saline shock. Marangos et al. (1989) suggested that high hemolymph protein concentration indicates that hemolymph, through hemocyanin, is able to store proteins after salinity acclimation. After a salinity change, the loss of FAAs from muscle results from their excretion into the blood. This must impose an additional osmotic load on the blood, which would increase water inflow from an external medium. Transfer of FAAs to the gastric fluids of the digestive gland (Dall, 1975) or the synthesis of hemocyanin (Van Holde et al., 2001) provides a means of minimizing this additional load. The digestive gland is thought to be an important synthesizing organ of hemocyanin, and products of this synthesis might cause an increase in hemolymph protein content when the FAAs are transferred from blood (Rosas et al., 2002). In the present study, an increment on hemocyanin concentration was observed 48 h after the salinity shock in shrimp fed with BGP or BGC. Although we do not know why hemocyanin is enhanced in shrimp fed with BGP or BGC and not in PVC- or CVC- fed shrimp, we propose that this response is related with the stimulating role of glucans on the immune system of shrimp. According to Johansson et al., (2000) shrimp hemocytes are synthesized in hematopoietic tissue located in the paired epigastric nodules just over the digestive gland where hemocyanin is synthesized (Gellissen et al., 1991). If glucans enhance the synthesis of hemocytes (Itami et al., 1998; Rengpipat et al., 2000) it is possible to think that glucans could stimulate at the

same time the sites of protein synthesis, such as the digestive gland where hemocyanin is synthesized. Considering that the hemocyanin antifungal activity was demonstrated recently (Destoumieux et al., 2001) it can be suggested that during the saline stress shrimp fed with glucans stimulated all the immunological equipment, including protein, hemocyanin, and hemocytes synthesis (Figs. 6 and 7). It is interesting to note that vitamin C is apparently not involved in this process because shrimp fed with vitamin C in excess had similar variations in blood protein and hemocyanin that those observed in shrimp fed with control diet.

During salinity stress a rapid use of reserves was observed; acylglycerides and cholesterol were reduced in blood and were probably used as a source of energy or synthesis in the digestive gland. An increment in digestive gland glycogen 24 h after the salinity shock could evidence the use of these reserves by all shrimp independently from the diets.

Circulating hemocytes are essential for immunity because of their role in phagocytosis, encapsulation and lysis of foreign cells (Johansson et al., 2000). Recent results have demonstrated that in stressed shrimp hemocytes are produced continuously reaching their maximum level and immunological role every two to three days indicating that they are released continuously (Pascual et al., 2002). Depending on the diet, total hemocytes, granular cells and proPO responded differently after the salinity shock (Fig. 7). In general, after the salinity shock, an increment in blood cells was observed in shrimp fed with glucans, whereas their decrease was observed in shrimp fed with vitamin C. Besides, a reduction in ProPo was observed in all shrimp after the salinity shock. Only shrimp fed with CVC recovered their ProPo levels after 48 h of the salinity shock, meaning that after the salinity shock shrimp fed with glucans could synthesize cells and ProPo, whereas blood cells were used by those fed with vitamin C (Fig. 7). After the salinity shock shrimp fed with control diet synthesized cells but not ProPo, indicating that a well-nourished shrimp can respond adequately to the salinity stress. The difference between immunostimulated (glucans) and control shrimp was that shrimp fed with glucans responded faster than shrimp fed with the control diet.

Different responses were observed between shrimp fed with glucans or vitamin C evidencing that these dietary additives work differently. According to Sritunyalucksana and Söderhall (2000) ProPo is synthesized in hemocytes whereas hemocytes are synthesized in hematopoietic tissue, hence both processes develop at different times. Using a relation between ProPo and granular cells it is possible to know how both additives used in the present study are related with both components of the immune system (Fig. 8). As expected, shrimp fed with glucans and control diet had the highest level of ProPo granular/granular cell index. This value was higher than that observed in shrimp fed with PVC or CVC (Fig. 8a). Surprisingly, after the salinity shock an increment in this ProPo granular/granular cell index was observed in shrimp fed with vitamin C indicating that they could increase rapidly the components of the immune system showing an increment in ProPo/granular cell index 4 h after the salinity shock. In contrast a continuous reduction in ProPo/granular cell index was observed in shrimp fed with glucans, revealing that with this type of immunostimulant shrimp drive their immunological equipment to respond at the stress continuously without a rapid recuperation. Vitamin C is a cell protector avoiding the normal oxidation produced by cell metabolism (Halver, 1995). According to Bachere, (2000) and Johansson et al., (2000) granular cells are filled with different zymogens that together with ProPo work to defend shrimp against foreign material. During reactions, peroxidase combined with SOD (superoxide dismutase) might produce  $H_2O_2$  and hypochloric acid, which are used as toxic substances to attack invading organisms (Chang et al., 2000). At the same time  $O_2^-$  is released during respiratory burst that can be enhanced 15.7 times when shrimp are fed with glucans (Chang et al., 2000). If shrimp are immunostimulated with glucans all these substances could be delivered all the time maintaining the shrimp in a constant immunological alert but at the same time inducing toxicity in its cells. At the end, when shrimp fed with glucans are exposed to stress, they are able to respond but many studies have demonstrated that this response occurs only once, afterwards immunostimulants are non longer efficient, indicating immunologic fatigue (Chang et al., 2000; Le Moullac et al., 1998). On the contrary, if the shrimp diet is optimal and includes a megadose of vitamin C, shrimp will be prepared for the stress because all the system is working adequately and, at the same time, is protected by the joint action of vitamin C and good nutrition.

Oral administration of BG can enhance the production of cell activating factors in the hemocytes thus increasing ProPo activity (as shown in this study) and phagocytosis (Itami et al., 1998). At present, evidences exist that demonstrate that shrimp fed with BG can responde only once to the stress, because immunostimulation produces imunological fatigue. The capacity of shrimp to respond to successive stress when fed with vitamin C, will be proven when well-nourished shrimp respond better than immunostimulated shrimp.

#### Acknowledgments

This project was partially supported by Dirección General de Atención al Personal Académico - UNAM (IN206199), and CONACYT (31137-B). The English text was edited by Brush Masher.

#### References

- Abdel-Rahman,S.H., Kanazawa,A., Teshima,S., 1979. Effects of dietary carbohydrate on the growth and the level of the hepatopancreatic glycogen and serum glucose of prawn. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries 45, 1491-1494.
- Alday-Sanz,V., Thaikua,S., Yousif,A.N., Albright,L.J., Flegel,T.W., 1998. Studies on IgY for passive immunization of shrimp against white spot syndrome virus. In: Flegel,T.W. (Ed.), Advances in shrimp biotechnology., Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok, pp. 141-143.
- Bachere,E., 2000. Shrimp immunity and disease control. Aquaculture 191, 3-11.
- Bradford,M.M., 1976. A refined and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248.
- Bureau,D.P., Azevedo P.A., Tapia-Salazar M., Cuzon G, 2000. Pattern and cost of growth and nutrient deposition in fish and shrimp: potential implications and applications. In: Cruz-Suárez,E., Ricque-Marie,D., Tapia-Salazar,M., Civera-Cerecedo,R. (Eds.), Vol. V, Avances de Nutrición Acuícola, Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola, CINVESTAV -Mérida, Mérida Yucatán, México, 111-140 pp.
- Catacutan, M. R. and Lavilla-Pitogo, C. R. 1994. L-ascorbyl-2-monophosphate Mg as a source of vitamin C for juvenile *Penaeus monodon*. The Israeli Journal of

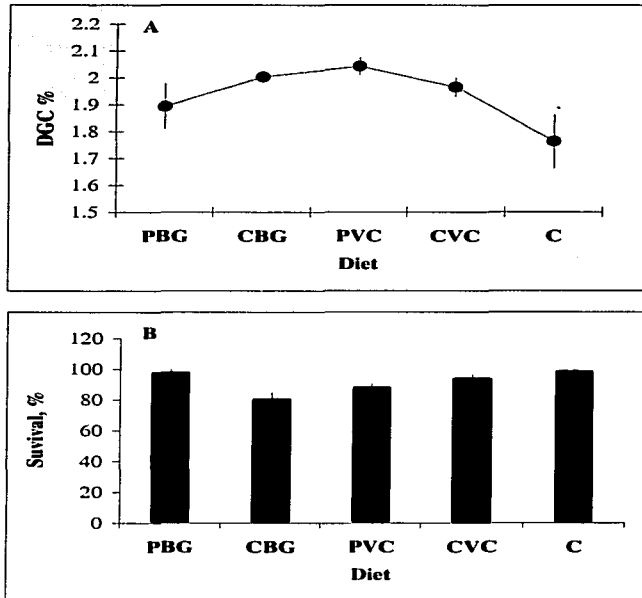
- Aquaculture-Bamidgeh 46, 40-47. Chang, C. F., Chen, H. Y., Su, M. S., and Liao, I-C. Immunomodulation by dietary  $\beta$  1-3 glucan in the brooders of the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. Fish & Shellfish Immunology 10, 505-514. 2000.
- Chen, J.C., Cheng, S.-Y., 1993. Hemolymph PCO<sub>2</sub>, hemocyanin, protein level and urea excretions of *Penaeus monodon* exposed to ambient ammonia. Aquatic Toxicology 27, 281-292.
- Destoumieux, D., Moñoz, M., Bulet, P., Bachere, E., 2000. Peneidins, a family of antimicrobial peptides from penaeid shrimp (Crustace, Decapoda). Cellular and Molecular Life Sciences 57, 1260-1271.
- Destoumieux, D., Saulnier, D., Garnier, J., Jouffrey, C., Bulet, P., Bachere, E., 2001. Antifungal peptides are generated from the C terminus of shrimp hemocyanin in response to microbial challenge. The Journal of Biological Chemistry 276, 47070-47077.
- Drach, P., Tchernigovtzeff, C., 1967. Sur le method de détermination des stades d'intermue et son application générale aux crustacés. Biologie Marine 8, 595-610.
- Gellissen, G., Hennecke H., Spindler K.D, 1991. The site of synthesis of hemocyanin in the crayfish *Astacus leptodactylus*. Experientia. 47, 194-195.
- Hall, M., Wang, R., Van Antwerpen, R., Sottrup-Jensen, L., and Söderhall, K. 1999. The crayfish plasma clotting protein: a vitellogenin-related protein responsible for clot formation in crustacean blood. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 1965-1970.
- Halver, J. E. 1995. Vitamin requirement study techniques. J. Appl. Ichthyol. 11, 215-224.
- Itami, T., Asano, M., Tokushige, K., Jubono, K., Nakagawa, A., Takeno, N., Nishimura, H., Maeda, M., Kondo, M., Takahashi, Y., 1998. Enhancement of disease resistance of karuma shrimp, *Penaeus japonicus*, after oral administration of peptidoglycan derived from *Bifidobacterium thermophilum*. Aquaculture 164, 277-288.
- Johansson, M.W., Keyser, P., Sritunyalucksana, K., Söderhall, K., 2000. Crustacean hemocytes and haematopoiesis. Aquaculture 191, 45-52.
- Kontara, E. K. M., Merchie, G., Lavens, P., Nelis, H., Leenheer, A., and Sorgeloos, P. 1995. Improved larviculture outputs of postlarval shrimp *Penaeus vannamei* through supplementation of L-ascorbyl-2-polyphosphate in the diet. European Aquaculture Society Special Publication. 24, 230-233.
- Lavens, P., Merchie, G., Ramos, X., Leon-Hing, A., Van Hauwaert, A., Pedrazzoli, A., Nelis, H., and Leenheer, A. 1999. Supplementation of ascorbic acid 2-

- monophosphate during the early postlarval stage of the shrimp *Penaeus vannamei*. *Aquaculture Nutrition* 5, 205-209.
- Le Moullac, G., de Labori, L.P., Saulnier, D., Goarant, C., Dehasque, M., 1998. Principles and problems involved in the evaluation of immunostimulants on juvenile shrimp. In: Vol. IV Simposio Internacional de Nutrición Acuicola, November 15-18, La Paz BCS, Mexico, 1-10 pp.
- Lightner, D. V., Hunter, B., and Magarelli, P. C., 1979. Ascorbic acid: nutritional requirement and role in wound repair in penaeid shrimp. *Proc. World. Maricul. Soc.* 10, 513-528.
- Lignot, J.H., Cochard, J.C., Soyeux, C., Lemaire, P., Charmantier, G., 1999. Osmoregulatory capacity according to nutritional status, molt stage and body weight in *Penaeus stylirostris*. *Aquaculture* 170, 79-92.
- Magarelli, P. C., Hunter, B., and Lightner, D. V. 1979. Black death: an ascorbic acid deficiency disease in penaeid shrimp. *Com. Biochem. Physiol.* 63A, 103-108.
- Masumoto, T., Hosokawa, H., and Shimeno, S. 1991. Ascorbic acid's role in aquaculture nutrition. *Proceedings of the aquaculture feed processing* 1, 42-48.
- Merchie, G., Kontara, E. K. M., Lavens, P., Robles, R., Kurmaly, K., and Sogeloos, P. 1998. Effect of vitamin C and astaxanthin on stress and disease resistance of postlarval tiger shrimp *Penaeus monodon* (Fabricius). *Aquaculture Research* 29, 579-585.
- Montaño-Pérez, K., Yepiz-Plascencia, G., Higuera-Ciapara, I., Vargas-Albores, F., 1999. Purification and characterization of the clotting protein from the white shrimp *Penaeus vannamei*. *Comp. Biochem. Physiol.* 122, 381-387.
- Montoya, N. and Molina, C. 1995. Optimum supplemental level of L-ascorbyl-2-phosphate-Mg to diet for white shrimp *Penaeus vannamei*. *Fisheries Science* 61, 1045-1046.
- Pascual, C., Gaxiola, G., and Rosas, C. 2002. Blood metabolites and hemocyanin of the white shrimp *Litopenaeus vannamei*: the effect of culture conditions and a comparison with other crustacean species. *Marine Biology* (in press).
- Perazzolo, L.M., Barracco, M.A., 1997. The prophenoloxidase activating system of the shrimp *Penaeus paulensis* and associated factors. *Developmental & Comparative Immunology*, 21, 385-395.
- Racotta, I.S., Palacios, E., 1998. Hemolymph metabolic variables in response to experimental manipulation stress and serotonin injection in *Penaeus vannamei*. *Journal of the World Aquaculture Society* 29, 351-356.



- Reddy,S.J., Ganapathi,N., Annappaswamy,T.S., 1999. Evaluation of the dietary essentiality of vitamins for *Penaeus monodon*. *Aquaculture Research* 5, 267-275.
- Rengpipat, S., Phianphak, W., Piyatiratitivorakul, S., and Manasveta, P. 1998. Effects of a probiotic bacterium on black tiger shrimp *Penaeus monodon* survival and growth. *Aquaculture* 167, 301-313.
- Rengpipat,S., Rukpratanporn,S., Piyatiratitivorakul,S., Menasaveta,P., 2000. Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiont bacterium (*Bacillus* S11). *Aquaculture* 191, 271-288.
- Rodriguez,J., Cedeño,R., Molina,C., Otero,V., Valenzuela,V., Sotomayor,M.A., 2000. Efecto de la calidad de la dieta sobre la respuesta inmune del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. In: Cruz-Suárez,E., Ricque-Marie,D., Tapia-Salazar,M., Civera-Cerecedo,R. (Eds.), Vol. V, Avances de Nutrición Acuícola, Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola, CINVESTAV -Mérida, Mérida , Yucatán, México, 25-49 pp.
- Rosas,C., Cuzon,G., Gaxiola,G., LePriol,Y., Pascual,C., Rossignol,J., Contreras,F., Sánchez,A., Van Wormhoudt,A., 2001a. Metabolism and growth of juveniles of *Litopenaeus vannamei*: effect of salinity and dietary carbohydrate levels. *Journal Experimental Marine Biology and Ecology* 259, 1-22.
- Rosas,C., Cuzon,G., Arena,L., Arena,L., Lemaire,P., Soyez,C., Van Wormhoudt,A., 2000. Influence of dietary carbohydrate on the metabolism of juvenile *Litopenaeus stylirostris*. *Journal Experimental Marine Biology and Ecology* 249, 181-198.
- Rosas,C., Cuzon,G., Gaxiola,G., Pascual,C., Taboada,G., Arena,L., VanWormhoudt,A., 2002. An energetic and conceptual model of the physiological role of dietary carbohydrates and salinity on *Litopenaeus vannamei* juveniles. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 268, 47-67.
- Rosas,C., Cuzon,G., Taboada,G., Pascual,C., Gaxiola G., Van Wormhoudt,A., 2001b. Effect of dietary protein and energy levels (P/E) on growth, oxygen consumption, hemolymph and digestive gland carbohydrates, nitrogen excretion and osmotic pressure of *Litopenaeus vannamei* and *L. setiferus* juveniles (Crustacea, Decapoda ; Penaeidae). *Aquaculture Research* 32, 1-20.
- Shiau, S-Y. and Hsu, T. S. Vitamin C requirement of grass shrimp, *Penaeus monodon* as determined with L-ascorbyl-2-monophosphate. *Aquaculture* 122, 347-357. 1994.
- Shigueno,K., Itoh,S., 1988. Use of Mg-L-Ascorbyl-2Phosphate as a vitamin C source in shrimp diets. *Journal of the World Aquaculture Society* 19, 168-174.

- Sritunyalucksana, K. and Söderhall, K. 2000. The proPO and clotting system in crustaceans. *Aquaculture* 191, 53-69.
- Sung,H.H., Chang,H.J., Her,C.H., Chang,J.C., Song,Y.L., 1998. Phenoloxidase activity of hemocytes derived from *Penaeus monodon* and *Macrobrachium rosenbergii*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 71, 26-33.
- Teshima,S.i., 1998. Nutrition of *Penaeus japonicus*. *Reviews in Fisheries Science* 6, 97-111.
- Van Holde,K., Miller,K.I., Decker,H., 2001. Hemocyanins and invertebrate evolution. *The Journal of Biological Chemistry* 276, 15563-15566.
- Vargas-Albores, F. and Yepiz-Plascencia, G. 2000. Beta glucan binding protein and its role in shrimp immune response. *Aquaculture* 191, 13-21.
- Vinagre,A.S., Da Silva,R.S., 1992. Effects of starvation on the carbohydrate and lipid metabolism in cabs previously maintained on a high protein or carbohydrate-rich diet. *Comp. Biochem. Physiol.* 102A, 579-583.
- Wigglesworth,J.M., Griffith,D.R.W., 1994. Carbohydrate digestion in *Penaeus monodon*. *Mar. Biol.*, 120, 571-578.
- Xu,Z., Primavera,J.H., de la Peña,L.D., Pettit,P., Belak,J., Alcivar-Warren,A., 2001. Genetic diversity of wild and cultured black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) in the Phillipines using microsatellites. *Aquaculture* 199, 13-40.



**Fig. 1.** Effect of  $\beta$ -1, 3 glucans (2g/kg of food) and a mega dose of vitamin C (5 g/kg of food) on daily growth coefficient (DGC, %) (A) and survival (B) of *L. vannamei* juveniles fed during 40 days with different feeding schedules: permanent  $\beta$ -1, 3 glucans (PBG) combined  $\beta$ -1, 3 glucans (CBG), permanent vitamin C (PVC), combined vitamin C (CVC) and control diets (C). Combined diets: 7 days with  $\beta$ -1.3 glucans or vitamin C-7 days control diet. Values as mean  $\pm$  S.E. Statistical differences at  $P < 0.5$  indicated as (\*).

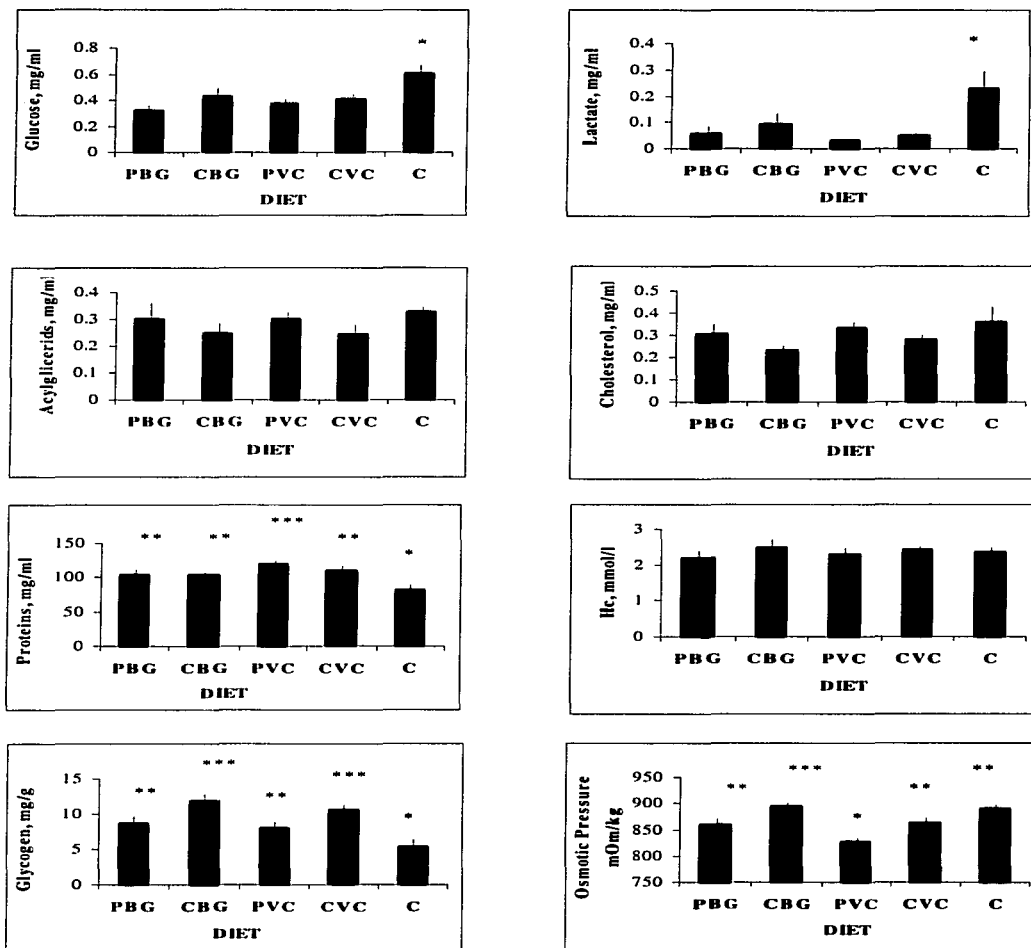


Fig. 2. Effect of  $\beta$ -1, 3 glucans (2g/kg of food) and a mega dose of vitamin C (5 g/kg of food) on hemolymph metabolites, oxy hemocyanin, osmotic pressure and digestive gland glycogen of *L. vannamei* juveniles fed during 40 days with different feeding schedules: permanent  $\beta$ -1, 3 glucans (PBG) combined  $\beta$ -1, 3 glucans (CBG), permanent vitamin C (PVC), combined vitamin C (CVC) and control diets (C). Combined diets: 7 days with  $\beta$ -1,3 glucans or vitamin C-7 days control diet. Values as mean  $\pm$  S.E. Statistical differences at  $P < 0.5$  indicated as (\*).

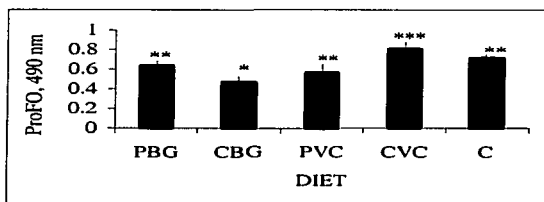
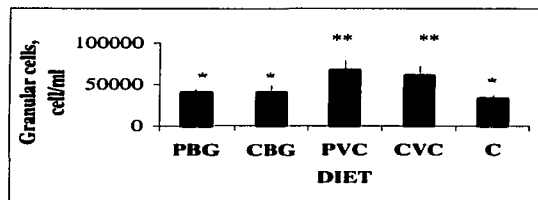
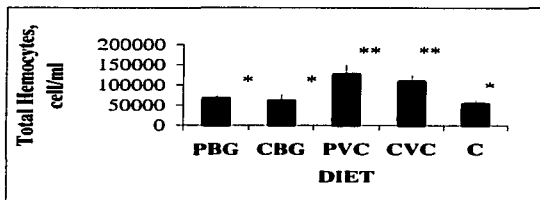


Fig. 3. Total hemocytes, granular cells and ProPo activity of *L. vannamei* juveniles fed during 40 days with different feeding schedules: permanent  $\beta$ -1, 3 glucans (PBG) combined  $\beta$ -1, 3 glucans (CBG), permanent vitamin C (PVC), combined vitamin C (CVC) and control diets (C). Combined diets: 7 days with  $\beta$ -1, 3 glucans or vitamin C-7 days control diet. Values as mean  $\pm$  S.E. Statistical differences at  $P < 0.5$  indicated as (\*).

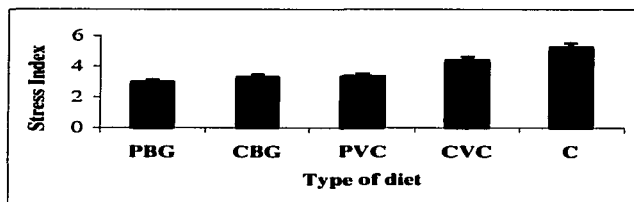


Fig. 4. Stress index (cumulative stress index: CSI) of *L. vannamei* juveniles fed during 40 days with different feeding schedules and exposed to a salinity stress (35 to 0‰) for 48 h: permanent  $\beta$ -1, 3 glucans (PBG) combined  $\beta$ -1, 3 glucans (CBG), permanent vitamin C (PVC), combined vitamin C (CVC) and control diets (C). Combined diets: 7 days with  $\beta$ -1, 3 glucans or vitamin C-7 days control diet. Values as mean  $\pm$  S.E. Statistical differences at  $P < 0.5$  indicated as (\*).

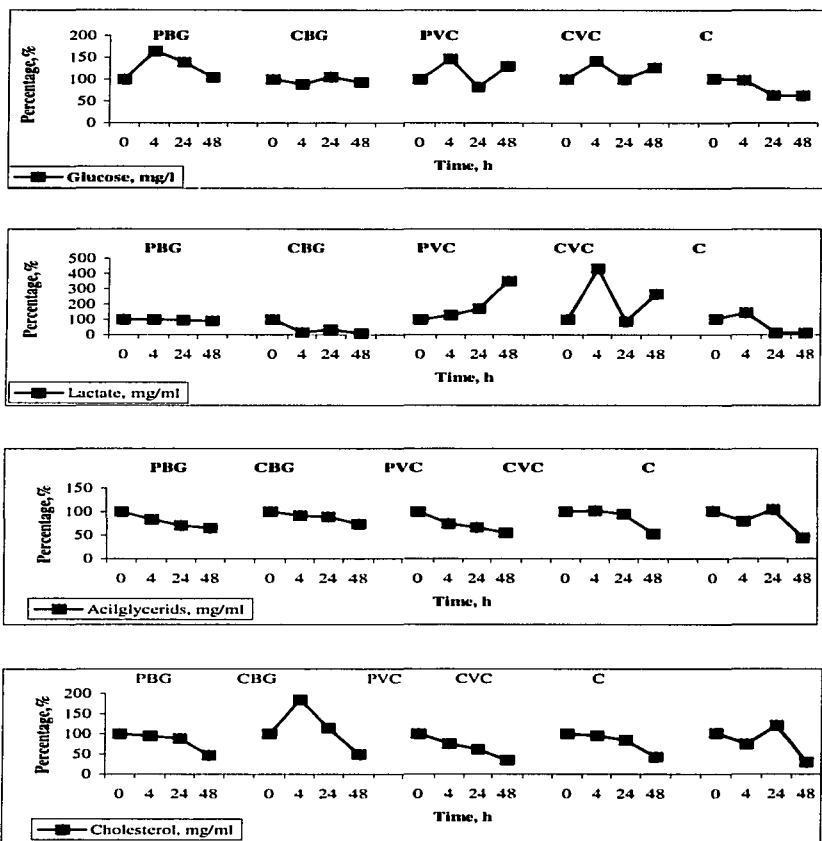
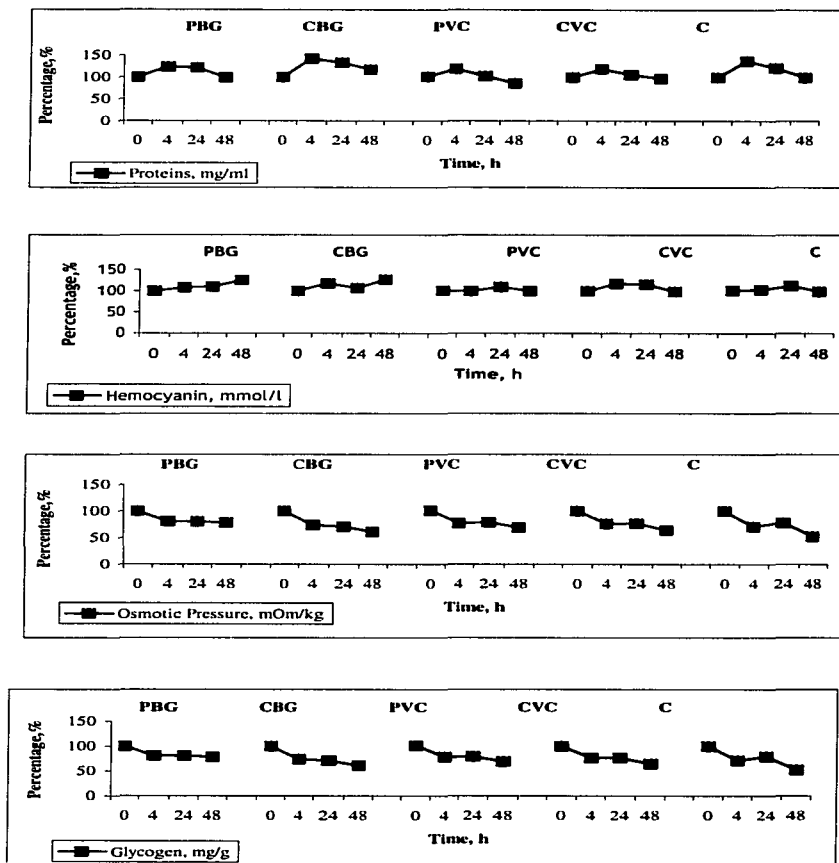


Fig. 5. Blood glucose, lactate, acylglycerides, and cholesterol (mg/ml) of *L. vannamei* juveniles fed during 40 days with different feeding schedules and exposed to a salinity challenge (35 to 0‰) for 48 h: permanent  $\beta$ -1, 3 glucans (PBG) combined  $\beta$ -1, 3 glucans (CBG), permanent vitamin C (PVC), combined vitamin C (CVC) and control diets (C). Combined diets: 7 days with  $\beta$ -1, 3 glucans or vitamin C-7 days control diet. Values as a percentage of each metabolite before the salinity challenge. Statistical differences at  $P < 0.5$  indicated as (\*).



**Fig. 6.** Blood protein, oxyhemocyanin, osmotic pressure and digestive gland glycogen of *L. vannamei* juveniles fed during 40 days with different feeding schedules and exposed to a salinity challenge (35 to 0‰) for 48 h: permanent  $\beta$ -1, 3 glucans (PBG) combined  $\beta$ -1, 3 glucans (CBG), permanent vitamin C (PVC), combined vitamin C (CVC) and control diets (C). Combined diets: 7 days with  $\beta$ -1, 3 glucans or vitamin C-7 days control diet. Values as a percentage of each metabolite before the salinity challenge. Statistical differences at  $P < 0.5$  indicated as (\*).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

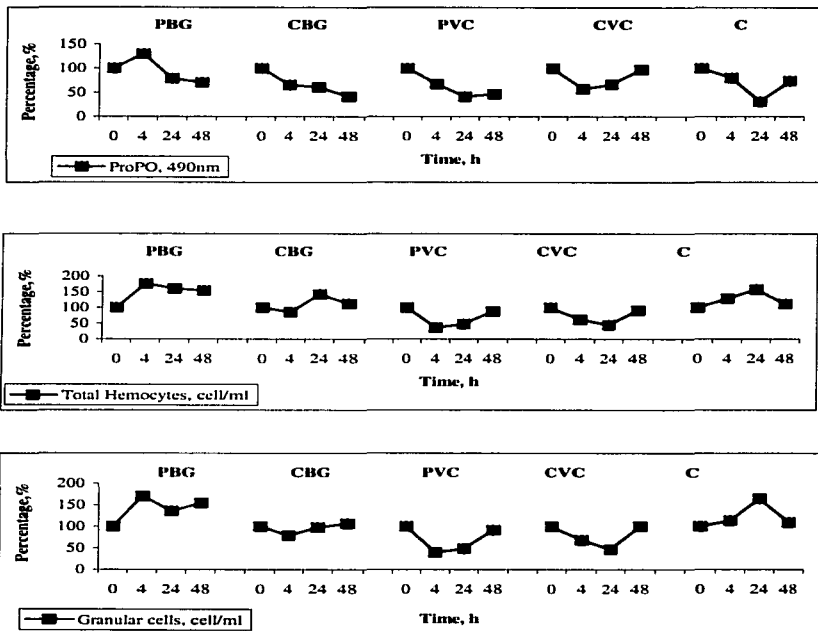
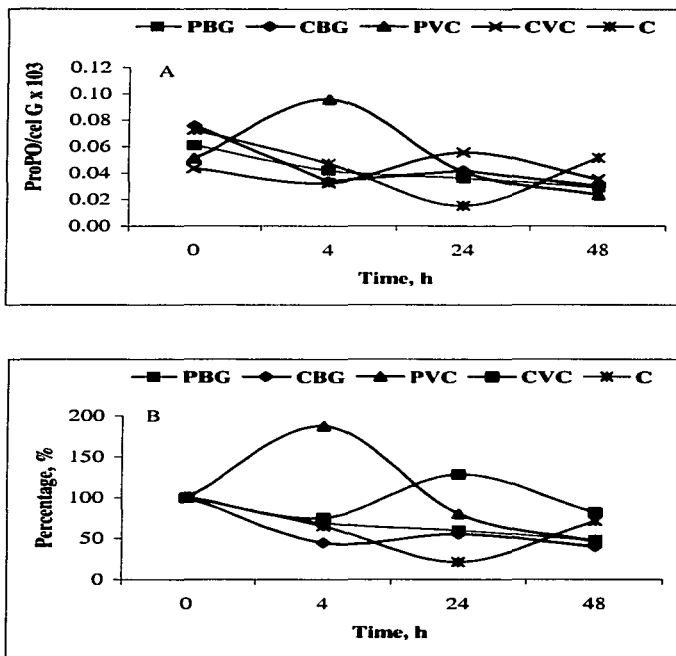


Fig. 7. Immune response (ProPO activity, total hemocytes and granular cells) of *L. vannamei* juveniles fed during 40 days with different feeding schedules and exposed to a salinity challenge (35 to 0‰) for 48 h: permanent  $\beta$ -1, 3 glucans (PBG) combined  $\beta$ -1, 3 glucans (CBG), permanent vitamin C (PVC), combined vitamin C (CVC) and control diets (C). Combined diets: 7 days with  $\beta$ -1, 3 glucans or vitamin C-7 days control diet. Values as a percentage of each metabolite before the salinity challenge. Statistical differences at  $P < 0.5$  indicated as (\*).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN





**Fig. 8.** ProPO/granular cells ratio (A) and percentage of variation respect to initial values (B) of *L. vannamei* juveniles fed during 40 days with different feeding schedules and exposed to a salinity challenge (35 to 0‰) for 48 h: permanent  $\beta$ -1, 3 glucans (PBG) combined  $\beta$ -1, 3 glucans (CBG), permanent vitamin C (PVC), combined vitamin C (CVC) and control diets (C). Combined diets: 7 days with  $\beta$ -1, 3 glucans or vitamin C-7 days control diet. Values as a percentage of each metabolite before the salinity challenge. Statistical differences at  $P < 0.5$  indicated as (\*).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Table 1. Ingredient composition of experimental diets (g kg<sup>-1</sup>).**

Ingredients	Control diet g kg <sup>-1</sup>	β-Glucan diet g kg <sup>-1</sup> (.2 %)	Vitamin C diet g kg <sup>-1</sup> (1500 ppm)
Fish meal	450	450	450
Soybean meal	180	180	180
Wheat flour	233	233	233
Lecithin	20	20	20
Fish oil	80	80	80
Minerals <sup>a</sup>	80	80	80
Vitamins without vitamin C <sup>b</sup>	17	17	17
Cholesterol	2	2	2
Celulose	9.7	9.7	5.71
Robimix stay C <sup>c</sup>	0.286	0.286	4.29
β-Glucan <sup>d</sup>	0	0.2	0

a. Mineral premix provided by Ralston Purina de México

b. Vitamin premix without vitamin C, provided by Ralston Purina de México.

c. Ascorbyl Phosphate (Stay C- 35%; Roche).

d. Stanguard (100%)

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Table 2.** Effect of type of diet on hemolymph variables measured in *L. vannamei* juveniles exposed at a salinity shock. Values as mean  $\pm$  SE. PBG = Permanent  $\beta$ -glucan diet, CBG = Combined  $\beta$ -glucan diet (7 days - 7 days control diet), PVC = Permanent vitamin C, CVC = Combined vitamin C (7 days - 7 days control), C = control diet.

	PBG		CBG		PVC		CVC		C	
<b>Glucose, mg/ml</b>										
0	0.32	$\pm$ 0.04	0.43	$\pm$ 0.06	0.38	$\pm$ 0.03	0.41	$\pm$ 0.04	0.60	$\pm$ 0.06
4	0.53	$\pm$ 0.03	0.38	$\pm$ 0.10	0.55	$\pm$ 0.06	0.58	$\pm$ 0.06	0.59	$\pm$ 0.08
24	0.45	$\pm$ 0.05	0.45	$\pm$ 0.06	0.31	$\pm$ 0.08	0.41	$\pm$ 0.01	0.38	$\pm$ 0.02
48	0.34	$\pm$ 0.02	0.40	$\pm$ 0.05	0.49	$\pm$ 0.07	0.52	$\pm$ 0.05	0.38	$\pm$ 0.03
<b>Lactate, mg/ml</b>										
0	0.056	$\pm$ 0.02	0.092	$\pm$ 0.04	0.02	$\pm$ 0.006	0.03	$\pm$ 0.012	0.140	$\pm$ 0.065
4	0.055	$\pm$ 0.02	0.015	$\pm$ 0.01	0.02	$\pm$ 0.012	0.13	$\pm$ 0.114	0.203	$\pm$ 0.098
24	0.054	$\pm$ 0.02	0.031	$\pm$ 0.02	0.03	$\pm$ 0.017	0.02	$\pm$ 0.009	0.017	$\pm$ 0.007
48	0.050	$\pm$ 0.02	0.008	$\pm$ 0.002	0.07	$\pm$ 0.056	0.08	$\pm$ 0.056	0.015	$\pm$ 0.008
<b>Acilglycerids, mg/ml</b>										
0	0.30	$\pm$ 0.06	0.25	$\pm$ 0.04	0.30	$\pm$ 0.03	0.24	$\pm$ 0.04	0.32	$\pm$ 0.02
4	0.25	$\pm$ 0.03	0.23	$\pm$ 0.06	0.22	$\pm$ 0.01	0.25	$\pm$ 0.03	0.26	$\pm$ 0.02
24	0.21	$\pm$ 0.02	0.22	$\pm$ 0.04	0.20	$\pm$ 0.03	0.23	$\pm$ 0.04	0.33	$\pm$ 0.04
48	0.20	$\pm$ 0.02	0.18	$\pm$ 0.01	0.16	$\pm$ 0.01	0.13	$\pm$ 0.04	0.14	$\pm$ 0.01
<b>Cholesterol, mg/ml</b>										
0	0.30	$\pm$ 0.04	0.23	$\pm$ 0.02	0.33	$\pm$ 0.02	0.28	$\pm$ 0.02	0.36	$\pm$ 0.07
4	0.29	$\pm$ 0.03	0.43	$\pm$ 0.04	0.25	$\pm$ 0.02	0.27	$\pm$ 0.04	0.27	$\pm$ 0.03
24	0.27	$\pm$ 0.03	0.27	$\pm$ 0.03	0.20	$\pm$ 0.05	0.23	$\pm$ 0.02	0.43	$\pm$ 0.06
48	0.14	$\pm$ 0.02	0.12	$\pm$ 0.03	0.12	$\pm$ 0.00	0.12	$\pm$ 0.02	0.10	$\pm$ 0.01
<b>Proteins, mg/ml</b>										
0	104.2	$\pm$ 6.54	81.99	$\pm$ 4.49	118.4	$\pm$ 5.2	109.2	$\pm$ 5.90	103.2	$\pm$ 6.83
4	128.5	$\pm$ 5.64	116.3	$\pm$ 23.5	141.0	$\pm$ 17.8	114.1	$\pm$ 5.29	142.2	$\pm$ 3.28
24	126.1	$\pm$ 7.75	109.0	$\pm$ 16.6	121.5	$\pm$ 19.0	115.8	$\pm$ 6.93	126.2	$\pm$ 4.47
48	102.9	$\pm$ 2.10	96.16	$\pm$ 4.35	101.7	$\pm$ 6.34	105.8	$\pm$ 5.41	104.2	$\pm$ 5.86
<b>Hemocyanin, mmol/l</b>										
0	1.88	$\pm$ 0.14	1.75	$\pm$ 0.06	2.16	$\pm$ 0.01	1.77	$\pm$ 0.11	1.95	$\pm$ 0.19
4	2.03	$\pm$ 0.10	2.06	$\pm$ 0.12	2.16	$\pm$ 0.09	2.08	$\pm$ 0.10	1.98	$\pm$ 0.18
24	2.07	$\pm$ 0.06	1.87	$\pm$ 0.21	2.36	$\pm$ 0.12	2.05	$\pm$ 0.12	2.19	$\pm$ 0.03
48	2.35	$\pm$ 0.11	2.22	$\pm$ 0.07	2.16	$\pm$ 0.12	1.75	$\pm$ 0.11	1.93	$\pm$ 0.10
<b>Glycogen, mg/g</b>										
0	8.74	$\pm$ 0.24	11.90	$\pm$ 0.65	7.93	$\pm$ 0.26	10.50	$\pm$ 0.91	5.39	$\pm$ 0.37
4	1.82	$\pm$ 0.33	2.13	$\pm$ 0.59	2.67	$\pm$ 0.77	2.31	$\pm$ 0.55	1.23	$\pm$ 0.49
24	5.44	$\pm$ 0.52	3.90	$\pm$ 0.19	3.92	$\pm$ 0.70	7.07	$\pm$ 1.35	3.32	$\pm$ 0.50
48	0.48	$\pm$ 0.21	0.96	$\pm$ 0.22	0.76	$\pm$ 0.37	0.76	$\pm$ 0.37	1.63	$\pm$ 0.69
<b>Osmotic Pressure, mOsm/kg</b>										
0	860.0	$\pm$ 29.80	892.0	$\pm$ 28.7	826.0	$\pm$ 9.30	861.0	$\pm$ 17.5	888.0	$\pm$ 10.0
4	694.4	$\pm$ 20.74	660.0	$\pm$ 4.93	639.3	$\pm$ 21.7	659.6	$\pm$ 11.4	631.0	$\pm$ 12.5
24	691.0	$\pm$ 11.52	633.0	$\pm$ 16.5	654.0	$\pm$ 17.3	660.2	$\pm$ 38.6	704.2	$\pm$ 8.3
48	673.4	$\pm$ 24.87	542.2	$\pm$ 33.8	571.0	$\pm$ 16.0	553.0	$\pm$ 13.4	476.0	$\pm$ 8.5

**Table 3.** Effect of type of diet on immune response measured in *L. vannamei* juveniles exposed at a salinity shock. Values as mean  $\pm$  SE. PBG = Permanent  $\beta$ -glucan diet, CBG = Combined  $\beta$ -glucan diet (7 days - 7 days control diet), PVC = Permanent vitamin C, CVC = Combined vitamin C (7 days - 7 days control), C = control diet

	PBG	CBG	PVC	CVC	C
<b>ProPO, 490nm</b>					
0	0.89 $\pm$ 0	1.11 $\pm$ 0.20	1.21 $\pm$ 0.20	0.83 $\pm$ 0.22	0.96 $\pm$ 0.11
4	1.16 $\pm$ 0	0.73 $\pm$ 0.33	0.82 $\pm$ 0.15	0.47 $\pm$ 0.13	0.77 $\pm$ 0.24
24	0.70 $\pm$ 0	0.68 $\pm$ 0.19	0.50 $\pm$ 0.13	0.55 $\pm$ 0.11	0.29 $\pm$ 0.05
48	0.63 $\pm$ 0	0.47 $\pm$ 0.13	0.56 $\pm$ 0.18	0.80 $\pm$ 0.14	0.71 $\pm$ 0.04
<b>Total Hemocytes, cell/ml</b>					
0	66667 $\pm$ 8548.0	60800 $\pm$ 15518	126400 $\pm$ 22621	108667 $\pm$ 15333	53333 $\pm$ 8914
4	117333 $\pm$ 36950	52000 $\pm$ 28000	45333 $\pm$ 0	67833 $\pm$ 15007	68667 $\pm$ 9023
24	106667 $\pm$ 31279	86500 $\pm$ 19118	60133 $\pm$ 16723	48667 $\pm$ 5975	84267 $\pm$ 20258
48	102667 $\pm$ 19464	68533 $\pm$ 14707	110933 $\pm$ 27154	99467 $\pm$ 27808	59333 $\pm$ 4844
<b>Granular cells, cell/ml</b>					
0	40267 $\pm$ 4097.0	39733 $\pm$ 8489.0	67200 $\pm$ 11412	60667 $\pm$ 11333	33067 $\pm$ 4906
4	68667 $\pm$ 19630	31333 $\pm$ 12667	26667 $\pm$ 0	41167 $\pm$ 7141	37667 $\pm$ 3448
24	54667 $\pm$ 16221	38833 $\pm$ 8373	32667 $\pm$ 6081	28333 $\pm$ 2517	54400 $\pm$ 12840
48	62133 $\pm$ 12625	42400 $\pm$ 12317	61333 $\pm$ 13965	60800 $\pm$ 14327	36133 $\pm$ 4592

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Table 4.** ANOVA resume of the effect combined of type of diet and time of exposure at an saline shock on blood metabolites, hemocyanin, digestive gland glycogen and osmotic pressure of *L. vannamei* juveniles.

	df Effect	MS Effect	df Error	MS Error	F	p
<b>Glucose</b>						
Diet	4	0.03	73.0	0.01	1.89	0.12
Time	3	0.06	73.0	0.01	4.60	0.01
Diet vs Time	12	0.03	73.0	0.01	2.47	0.01
<b>Lactate</b>						
Diet	4	0.028	72.0	0.01	2.63	0.04
Time	3	0.022	72.0	0.01	2.06	0.11
Diet vs Time	12	0.024	72.0	0.01	2.30	0.01
<b>AG</b>						
Diet	4	0.008	72.0	0.004	1.89	0.12
Time	3	0.062	72.0	0.004	14.00	0.0001
Diet vs Time	12	0.005	72.0	0.004	1.29	0.23
<b>Cholesterol</b>						
Diet	4	0.014	73.0	0.005	2.63	0.0410
Time	3	0.187	73.0	0.005	33.58	0.0001
Diet vs Time	12	0.018	73.0	0.005	3.31	0.0007
<b>Protein</b>						
Diet	4	1041.2	71.0	311.5	3.34	0.01
Time	3	3501.0	71.0	311.5	11.24	0.00
Diet vs Time	12	272.65	71.0	311.5	0.88	0.58
<b>Hemocyanin</b>						
Diet	4	0.06	64.0	0.07	0.90	0.47
Time	3	0.32	64.0	0.07	4.64	0.01
Diet vs Time	12	0.11	64.0	0.07	1.57	0.12
<b>Glycogen</b>						
Diet	4	4.816	73.0	1.48	3.24	0.017
Time	3	60.00	73.0	1.48	40.40	0.001
Diet vs Time	12	3.234	73.0	1.48	2.17	0.022
<b>Osmotic Pressure</b>						
Diet	4	11653.7	70.0	1736.6	6.71	0.01
Time	3	363627.5	70.0	1736.6	209.3	0.02
Diet vs Time	12	7146.5	70.0	1736.6	4.12	0.02

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Table 5.** ANOVA resume of the effect combined of type of diet and time of exposure at an saline shock on immune response of *L. vannamei* juveniles.

	df Effect	MS Effect	df Error	MS Error	F	p-level
<b>ProPO</b>						
Diet	4	0.116	70.0	0.116	1.0	0.041
Time	3	0.902	70.0	0.116	7.7	0.001
Diet vs Time	12	0.193	70.0	0.116	1.6	0.095
<b>Total Hemocytes</b>						
Diet	4	2779614208.00	62.0	1598066688.0	1.7	0.500
Time	3	965876416.00	62.0	1598066688.0	0.60	0.046
Diet vs Time	12	2647256832.00	62.0	1598066688.0	1.6	0.100
<b>Granular Cells</b>						
Diet	4	788378432.00	62.0	478872416.0	1.6	0.040
Time	3	574842304.00	62.0	478872416.0	1.2	0.050
Diet vs Time	12	745770752.00	62.0	478872416.0	1.5	0.130

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN