

# Respuesta inmunoquímica y expresión génica en juveniles de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) expuestos a microorganismos aislados del sedimento marino

Ángel I. Campa-Córdova<sup>1</sup>

 0000-0003-0099-3324

Gabriel Aguirre-Guzman<sup>2\*</sup>

 0000-0002-7374-2369

Yuniel Méndez-Martínez<sup>3</sup>

 0000-0002-5365-5794

Diana Medina-Félix<sup>4</sup>

 0000-0002-0904-4099

Carlos E. Ceseña<sup>1</sup>

 0000-0002-8412-9172

Jocelyne García-Armenta<sup>1</sup>

Jesús A. Valenzuela-Chávez<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Centro de Investigaciones  
Biológicas del Noroeste.  
La Paz, BCS, Mexico.

<sup>2</sup> Universidad Autónoma de Tamaulipas.  
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.  
Cd Victoria, Tamps, México.

<sup>3</sup> Universidad Técnica Estatal de Quevedo.  
Facultad de Ciencias Pecuarias y Biológicas.  
Laboratorio de Acuicultura Experimental,  
Los Ríos, Ecuador.

<sup>4</sup> Universidad Estatal de Sonora.  
Licenciatura en Ecología.  
Hermosillo, Sonora, México.

**\*Autor para correspondencia:**

Correo electrónico:

[gabaguirre@docentes.uat.edu.mx](mailto:gabaguirre@docentes.uat.edu.mx)

Recibido: 2023-04-24

Aceptado: 2023-10-02

Publicado: 2024-03-21

Información y declaraciones adicionales  
en la página 12

© Derechos de autor 2023  
Ángel I. Campa-Córdova et al.

acceso abierto 



Distribuido bajo una Licencia Creative Commons  
Atribución 4.0 Internacional (CC-BY 4.0)

## Resumen

El uso adecuado de microorganismos aislados del ambiente natural puede mejorar las condiciones de cultivo en los sistemas acuícolas, así como la capacidad de respuesta inmune y antioxidante de los organismos cultivados. En este estudio se analizó la respuesta inmunoquímica y la expresión génica de juveniles de *Litopenaeus vannamei* al ser expuestos a microorganismos aislados de sedimento marino previa caracterización *in vitro* por sus propiedades probióticas. Se emplearon dos levaduras y una bacteria por el método de inmersión (48 a 216 h) a una concentración de  $1 \times 10^6$  CFU/mL con los tratamientos siguientes: (1) control sin probióticos; (2) control positivo, inmuoestimulante comercial (laminarina;  $\beta$ -1, 3, glucano); (3) *Candida maris*, cepa A1; (4) *Geotrichum candidum*, cepa A3; (5) *Curtobacterium sp.*, cepa S13. Los camarones tratados con microorganismos y con inmuoestimulante comercial mostraron un incremento significativo ( $P < 0.0500$ ) en el contenido de proteína soluble en hemocitos respecto al grupo control. A las 72 h post-exposición (hpe), los tratamientos con *G. candidum*, *Curtobacterium sp.* y laminarina mostraron un incremento significativo ( $P < 0.0500$ ) en la actividad de superóxido de desmutasa (SOD) respecto al grupo control. La expresión génica de la enzima SOD mostró incremento significativo ( $P < 0.0500$ ) en los camarones tratados con los tres microorganismos desde las 48 hpe. Los resultados obtenidos mostraron que el uso de tres microorganismos aislados del medio marino tiene la capacidad de estimular el contenido de proteína en hemocitos circulantes, actividad antioxidante y expresión génica en juveniles de *L. vannamei*.

**Palabras clave:** Hemocitos; Inmuoestimulantes; Levaduras; Lipopolisacáridos; Superóxido dismutasa.

## Cómo citar este artículo:

Campa-Córdova ÁI, Aguirre-Guzman G, Méndez-Martínez Y, Medina-Félix D, Ceseña CE, García-Armenta J, Valenzuela-Chávez JA. Respuesta inmunoquímica y expresión génica en juveniles de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) expuestos a microorganismos aislados de suelo marino. Veterinaria Mexico OA. 2024;11. doi: 10.22201/fmvz.24486760e.2024.1207.

## Contribución al estudio

El cultivo de camarón es importante al generar productos de alto valor nutricional y económicos en diferentes países. Esta industria está en constante crecimiento en diferentes temas como la fisiología, nutrición, adaptabilidad, sistema inmune, estrés, resistencia a patógenos, etc. Sin embargo, poco se entienden los cambios inmunológicos de este organismo cuando se expone a inmunoestimulantes. Este estudio está centrado en el uso de *C. maris*, *G. candidum* y *Curtobacterium* sp. como activadores del sistema inmune de *L. vannamei*, y evaluar su respuesta inmune (hemocitos, proteínas totales y expresión génica) ante este estímulo. Los resultados mostraron que los microorganismos marinos pueden estimular el contenido de proteína en hemocitos circulantes, actividad antioxidante y expresión génica. Esta información puede ayudar a los camaronicultores a tener un mejor control de patógenos y enfermedades que afectan la producción.

## Introducción

El camarón blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei* es una de las especies de crustáceos más cultivadas mundialmente con una producción global en 2022 de 11 237 016 t<sup>(1)</sup> y 270 807 t en 2021 en México, además de ser una fuente importante de dólares americanos para México.<sup>(2)</sup> Por la continua demanda de este producto, la camaronicultura se ha convertido en una actividad económicamente importante, la cual no está ajena a problemas nutrimentales, estrés, medio ambiente, salud, etc., fuertemente asociados a diferentes factores que afectan el crecimiento de los camarones.<sup>(3, 4)</sup> Estos problemas en la acuicultura del camarón, propicia que los principales objetivos de esta industria sean la generación de estrategias que favorezcan el crecimiento de los organismos, la salud y la detección temprana de enfermedades para disminuir las pérdidas en la producción, y la reducción del impacto ambiental.<sup>(1, 5)</sup>

Los problemas generados por los agentes patógenos en el camarón (bacterias y virus) han incrementado las investigaciones sobre el sistema inmunológico en estos organismos, empleando estudios a nivel celular, proteico, proteómico, expresión de genes, entre otras.<sup>(6-8)</sup> Una alternativa para el control de enfermedades es la de activar o fortalecer el sistema inmune del camarón con el uso de microorganismos, subproductos o fracciones celulares de los mismos que mejoren la resistencia hacia los patógenos.<sup>(5)</sup> Algunos microorganismos marinos contribuyen en la prevención de problemas de salud que afecta a los camarones al tener un excelente nivel nutricional, además de propiedades funcionales como las probióticas y/o inmunoestimulantes, adhesión a la mucosa intestinal, antagonismo frente a patógenos, eliminación de materia orgánica, etc.<sup>(9-11)</sup>

Diferentes microorganismos marinos son fuente de  $\beta$ -glucanos, lipopolisacáridos y nucleótidos, que se utilizan como inmunoestimulantes en *L. vannamei* y le proporcionan resistencia contra patógenos bacterianos y virales,<sup>(9,12)</sup> también generan la activación de genes de diferentes factores inmunes como péptido antimicrobiano, factor antilipopolisacárido, penaeidina, profenoloxidasas (ProPO) y SOD.<sup>(13)</sup> Cepas de microorganismos como *Candida maris*, *Geotrichum candidum* y *Curtobacterium* sp. han sido usadas como medida profiláctica en contra de agentes patógenos del camarón.<sup>(14-16)</sup>

Ochoa<sup>(17)</sup> y Ochoa et al.<sup>(18)</sup> reportaron una respuesta significativa en los hemocitos de *L. vannamei* cultivados y expuestos a *G. candidum*. Este microorganismo ha sido usado además como agente probiótico en peces, donde se encontró un incremento en la respuesta inmunológica y productiva.<sup>(19, 20)</sup> El objetivo de la investigación fue evaluar la respuesta inmune celular, el contenido de proteína y la expresión de genes en juveniles de camarón del Pacífico (*L. vannamei*) expuestos a *C. maris*, *G. candidum* y *Curtobacterium* sp., aislados del medio marino.

## Materiales y métodos

### Declaración ética

Los protocolos de experimentación con animales fueron cuidadosamente revisados y aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. (CI-CUAL-CIBNOR, No. de aprobación institucional CIBNOR-CEI-2023-04), basados en las normas establecidas por el Consejo de la Unión Europea (2010/63/EU) y el gobierno mexicano (NOM-062-ZOO- 1999) para el cultivo, cuidado y uso de los animales experimentales.

### Cepas de microorganismos

Las cepas experimentales empleadas fueron *Candida maris* (A1), *Geotrichum candidum* (A3) y *Curtobacterium* sp. (S13), aisladas del suelo en zona de manglar en la bahía de La Paz, Baja California Sur, México (24°14'59.80" N, 110°18'47.12" O) y caracterizadas *in vitro* e *in vivo* en el Laboratorio Húmedo de Cultivo de Crustáceos y Laboratorio de Inmunogenómica Marina del CIBNOR, La Paz, Baja California Sur, México.<sup>(21)</sup> Las cepas experimentales fueron cultivadas en caldo YPD (Peptona-Dextrosa para levaduras)+ 2.5 % NaCl con 50 µg/mL de cloranfenicol a 30 °C por 24 h. Se determinó previamente la capacidad no hemolítica de las cepas (hemólisis tipo Gamma) mediante la prueba de hemólisis en placas de agar sangre + 2.5 % NaCl + 10 % de plasma de conejo, utilizando la técnica de picadura (6 mm de diámetro aprox.) e incubadas a 35 °C por 24 h.<sup>(22)</sup> La dosis control se generó al cultivar las cepas en agar YPD + 2.5 % NaCl a 30 °C por 24 h. Las colonias obtenidas fueron suspendidas en una solución estéril al 2.5 % NaCl hasta alcanzar una absorbancia de 1 a 540 nm (dosis final de  $1 \times 10^6$  CFU/mL).<sup>(23)</sup>

### Bioensayo

El bioensayo se realizó con juveniles de camarón blanco del Pacífico, *Litopenaeus vannamei* (14.25 ± 1.50 g) en el laboratorio de aclimatación y cultivo de organismos acuáticos del CIBNOR. El bioensayo se llevó a cabo en tanques de fibra de vidrio con 30 L de agua de mar filtrada (1 µm), a 28 ± 1 °C, 37 ± 2 ups, y aireación continua (oxígeno disuelto de 5.02 ± 0.5 mg/mL). Los camarones fueron distribuidos al azar por triplicado a una densidad de 15 organismos/tanque y fueron expuestos a cinco tratamientos durante 216 h: (1) camarones alimentados con dieta comercial para camarón (PIASA, 35 % de proteína) como control negativo por no tener microorganismos (TCN); (2) camarones expuestos a laminarina (β-1,3

glucano; SIGMA) como control positivo (TCP); (3) camarones expuestos a *Candida maris* (TCM); (4) camarones expuestos a *Geotrichum candidum* (TGC) y (5) camarones expuestos a *Curtobacterium* sp. (TCS). Las réplicas de cada tratamiento fueron acomodadas en tres bloques de cinco tanques, donde cada bloque tenía un tratamiento distribuido también al azar.

Los microorganismos fueron aplicados a los tratamientos correspondientes (TCM, TGC, TCS) mediante inmersión con dosis de  $1 \times 10^6$  CFU/mL a los respectivos tanques experimentales.<sup>(23)</sup> La dosis TCP se basó en el trabajo de Campa-Córdova et al.<sup>(24)</sup> con el uso de laminarina (*Laminaria digitata*, Sigma, L-9634) a una concentración final de 0.5 mg/mL. Al tratamiento TCN únicamente se le agregó alimento comercial. La dosis de cada tratamiento fue aplicada a las 0, 48, 96, 144, 192 h. Durante el bioensayo, el mantenimiento diario se realizó en las mañanas. Consistió en la eliminación de mudas, camarones muertos, sifoneo de alimentos residuales y heces fecales de cada tanque. Además, diariamente se recambió el 15 % del volumen total del agua marina. La alimentación de los camarones fue *ad libitum* con la dieta comercial (PIASA, 35 % de proteína) dos veces al día (09:00 y 15:00 h) a 1.9 % de la biomasa total.

### Toma de muestras

La hemolinfa de tres camarones seleccionados al azar, uno de cada replica, fue colectada a las 24, 48, 72 y 216 h para evaluar el conteo de hemocitos totales (CHT), proteínas totales (PT) y análisis de la expresión génica. Los camarones seleccionados se sacrificaron colocándolos en agua de mar filtrada a 8 °C por 30 min, se diseccionaron 2 g de músculo de cada camarón y fueron almacenados a -80 °C para determinar la actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD).

Para la toma de muestra de hemolinfa, se preparó una solución isotónica para camarón con EDTA como anticoagulante, SIC-EDTA (450 mM NaCl, 10 mM KCl, 10 mM EDTA-Na<sub>2</sub>, 10 mM HEPES, pH 7.3, 850 mOsm/kg se usó para obtener la muestra de hemolinfa.<sup>(24)</sup> La hemolinfa fue obtenida del saco hemolinfático ventral ubicado en la base del pleópodo del primer segmento abdominal cerca del poro genital, con una jeringa de 5 mL (22 × 32, 23 G) + 500 µL de SIC-EDTA a 4 °C (dependiendo del volumen de la hemolinfa colectada se calculó el factor de dilución).

La hemolinfa extraída (1 mL aproximadamente) fue depositada en tubos de microcentrifuga de 1.5 mL (retirando la aguja para no romper las células) enfriados en una cama de hielo.<sup>(24, 25)</sup> Se usaron 50 µL de hemolinfa colectada para el conteo total de hemocitos y el análisis de proteínas. El resto de la muestra colectada se usó para la expresión génica, esta se centrifugó a 3000 g por 3 min a 4 °C. El sobrenadante fue removido, aplicando 500 µL de una solución de ARNlater (Invitrogen™, número de catálogo, AM7021) al paquete celular<sup>(6)</sup> para su conservación a 4 °C por 24 h y posterior almacenamiento a -80 °C, de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

### Conteo de hemocitos totales

El conteo de los hemocitos totales (CHT) se realizó conforme lo describen Campa-Córdova et al.<sup>(24)</sup> y Pacheco et al.<sup>(25)</sup> en donde a 50 µL de hemolinfa se le añe-

dieron 200 mL de formaldehído al 10 %. La muestra de hemolinfa fue evaluada en una cámara de Neubauer para determinar la cantidad de hemocitos mediante un microscopio óptico binocular (CX-21) a 10×. El número de hemocitos fue evaluado en células por mililitro de acuerdo con la fórmula:

$$\text{No. de hemocitos} = \left( \frac{\text{N}^\circ \text{ de células}}{\text{N}^\circ \text{ de cuadrantes}} \right) (10000) \left( \text{Factor de dilución con solución fijadora} \right) \left( \text{Factor de dilución con solución anticuagulante} \right)$$

### **Cuantificación de proteínas**

La evaluación de la PT (mg/mL) en hemocitos y músculo fue mediante una modificación de Bradford,<sup>(26)</sup> leyendo la muestra en microplaca a 595 nm. Se calculó una concentración homogénea de hemocitos para la determinación de proteínas ( $1 \times 10^5$  células/mL) y se utilizó albúmina sérica bovina (BSA) como estándar mediante diluciones seriadas para establecer una curva estándar.<sup>(13, 25)</sup>

### **Evaluación de la actividad de la enzima superóxido dismutasa en músculo**

Las muestras de músculo fueron descongeladas y analizadas individualmente para SOD, donde 100 mg de tejido de cada muestra fueron macerados y homogenizados manualmente con un pistilo de plástico estéril en 0.5 mL de buffer de fosfatos (50 mM, pH 7.8) y centrifugados a 14 000 rpm por 10 min a 4 °C.<sup>(24, 27)</sup> El sobrenadante fue colocado en tubos de microcentrífuga de 1.5 mL enfriados en una cama de hielo para su análisis. La actividad de la SOD fue evaluada de acuerdo con Suzuki<sup>(28)</sup> usando el sistema xantina/xantina oxidasa como generador constante del radical superóxido, el cual reduce el nitroazul de tetrazolio a formazán. Este se evalúa cada 30 s por 5 min a una absorbancia de 560 nm. La actividad de SOD se definió como la cantidad de enzima necesaria para inhibir el 50 % de dismutación del radical superóxido. Los resultados de actividad SOD se expresaron en U/mg de proteína en músculo.

### **Evaluación de la expresión de genes de respuesta inmune en hemocitos (extracción de ARN y síntesis de ADN complementario)**

Para determinar la expresión génica, a cada muestra de hemocitos se adicionaron 500 µL de RNAlater Stabilization Solution (Ambion). El ARN total se obtuvo utilizando el reactivo Trizol (Sigma-Aldrich®) conforme las instrucciones del fabricante. El ARN fue cuantificado por espectrofotometría entre 260/280 nm.<sup>(8, 29)</sup> La síntesis de la cadena complementaria (ADNc) fue obtenida utilizando el protocolo Improm II (Promega®) ajustando las muestras a una concentración de 10 µg de ARN y almacenando las muestras obtenidas (30 µL) a -20 °C.

La expresión del gen superóxido dismutasa (MnSOD) fue analizada por Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (qPCR), utilizando el Sistema qPCR CFX96 (Bio-Rad), así como el reactivo EvaGreen Sso-fast super mix (Bio-Rad) y cebadores para genes específicos.<sup>(30, 31)</sup> El programa de PCR se realizó de la siguiente forma: desnaturalización a 95 °C por 5 min, seguido de 40 ciclos a 95 °C

**Cuadro 1.** Cebadores usados para la expresión del gen MnSOD por qPCR después de los retos<sup>(31, 32)</sup>

Gen	Nombre de la secuencia	Secuencia 5' – 3'	Eficiencia %	Tamaño fragmento (pb)
Proteína ribosomal S12	S12-F S12-R	GTGGAAGGAGACGTTGGTGT AGAGCCTTGACCGCTTCAT	2.00	150 pb
Ubiquitina	UBI-F UBI-R	GGGAAGACCATCACCCCTTG TCAGACAGAGTGCGACCATC	1.98	146 pb
Proteína ribosomal L8	L8-F L8-F	GCCTAAGGTGCGTGGTGT ATTCTGCCTTGGGTCTCT	2.00	181 pb
Manganeso superóxido dismutasa (MnSOD)	MnSOD-F MnSOD-R	ATTGGGTGAGGAACGAGGTG GGTGATGCTTTGTGTGGTGG	2.10	113 pb

por 20 s, 60 °C por 20 s y 72 °C por 20 s, donde se evaluó la fluorescencia. Una curva de desnaturalización se realizó al final de la reacción de PCR para observar la especificidad de los fragmentos y la ausencia de formación de artefactos.

Los cebadores utilizados para la amplificación de los genes se muestran en el Cuadro 1. Después del análisis de estabilidad, se seleccionaron los genes ubiquitina y Rpl8 para normalizar los datos obtenidos con cMnSOD. La expresión relativa (ER) de los transcritos del gen cMnSOD en hemocitos de *L. vannamei* se calculó partiendo de la relación entre las cantidades relativas (CR) de cada muestra con la ecuación  $ER = CR_t / CR_{nf}$ , donde  $t$  es el gen de referencia y  $nf$  es el factor de normalización obtenido de la media geométrica calculada a partir de las CRs de los genes de referencia más estables (S12 y RPL8).<sup>(32, 33)</sup>

$$\text{Cantidades relativas (CR)} = \left( \frac{\text{gen de referencia}}{\text{factor de normalización}} \right)$$

### Análisis de los datos

Se determinó la homocedasticidad y homogeneidad de los datos con las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Bartlett. Se aplicó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) usando la prueba F para analizar las diferencias entre tratamientos y grupos control. Los valores de  $P < 0.05$  se consideraron diferentes significativamente y se les aplicó la prueba de Tukey (HSD) para identificar la naturaleza de estas diferencias ( $P < 0.05$ ). Todos los datos fueron evaluados usando el software STATISTICA (version 2.0).

### Resultados

No se registró un incremento significativo en el contenido de CHT en ninguno de los tratamientos utilizados. Sin embargo, el mayor valor promedio de CHT se detectó a las 72 h posexposición con los tratamientos con *C. maris* y laminarina respecto al grupo control y otros tratamientos (Figura 1a). El tratamiento con laminarina mostró valores promedio de CHT más altos que cualquier otro tratamiento en casi todos los muestreos a excepción de las 48 h posexposición (Figura 1a). *Candida maris* y *G. candidum* mostraron actividad de CHT bajo solo a las 24 h

posexposición, a partir de ahí sus valores promedio se incrementaron de un 100 a 300 %, destacó *C. maris* por estos valores (Figura 1a).

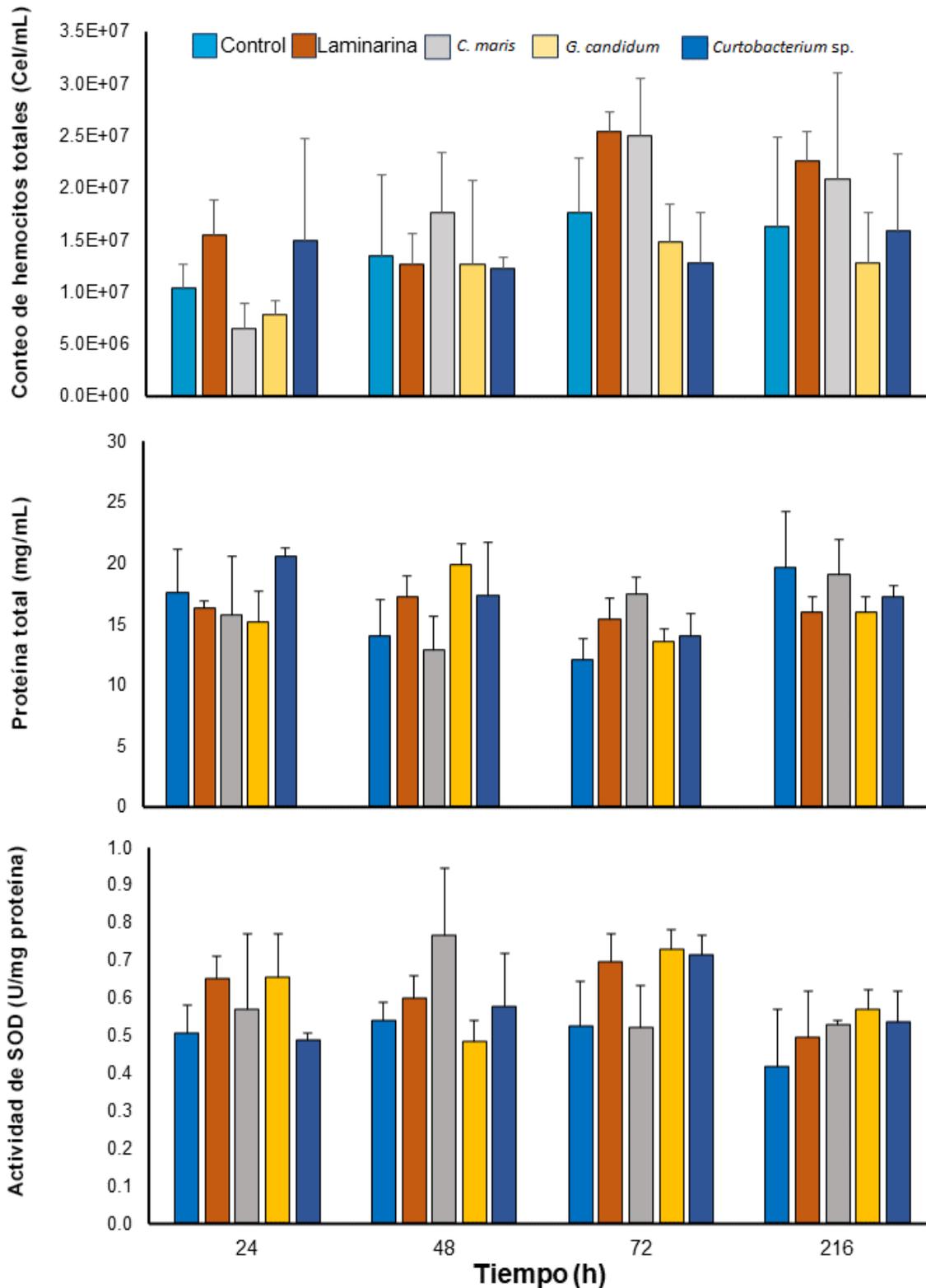
El contenido de PT en hemocitos se muestra en la Figura 1b. A las 24 h posexposición, se observó un incremento significativo ( $P=0.0136$ ) en los camarones tratados con *Curtobacterium* sp. y a las 48 h posexposición en los juveniles tratados con laminarina ( $P=0.0418$  y *G. candidum* ( $P=0.0375$ ) respecto al grupo control. A las 72 h posexposición, todos los tratamientos poseen valores promedio superiores de PT comparados con el grupo control. Sin embargo, a las 126 h posexposición todos los tratamientos registraron valores similares al control (camarones no tratados, Figura 1b).

Los camarones tratados con laminarina mostraron incremento significativo en la actividad promedio de SOD en músculo a las 24 ( $P=0.0435$ ) y 72 h posexposición ( $P=0.0463$ ) respecto al grupo control (Figura 1c). *Candida maris* registró valores promedio de actividad SOD superiores a las 24, 48, 216 h posexposición comparada con el grupo control, revelando el mayor incremento a las 48 h respecto al control y otros tratamientos. A las 72 h, *G. candidum* y *Curtobacterium* sp. también registraron un incremento significativo ( $P < 0.0500$ ) en los valores promedio de actividad de SOD respecto al grupo control (Figura 1c). A las 216 h posexposición, todos los tratamientos registraron valores similares al grupo control (Figura 1b).

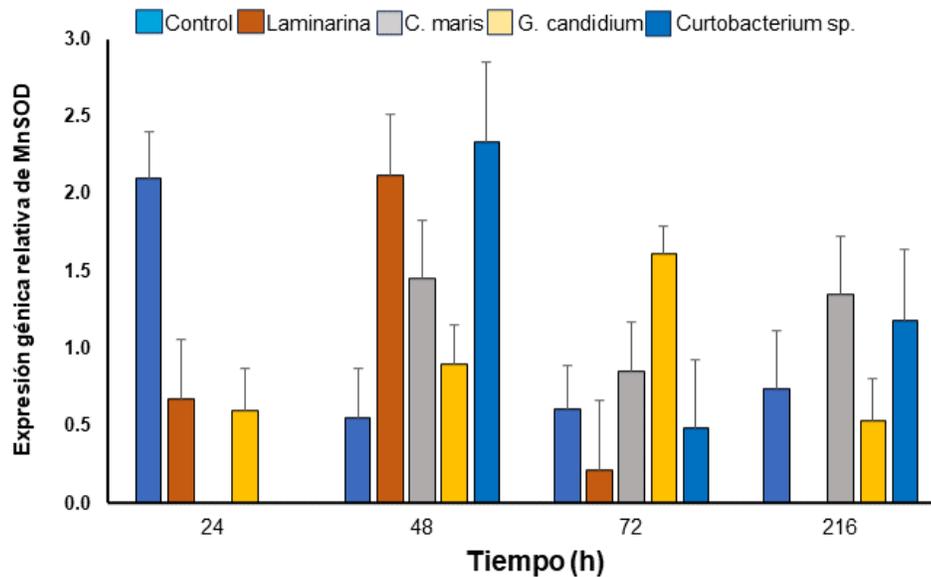
La Figura 2 presenta la expresión génica de MnSOD en los hemocitos del camarón (*L. vannamei*) donde se observa una disminución significativa en la expresión a las 24 h posexposición en todos los tratamientos respecto al grupo control. A las 48 h posexposición, se observó un incremento significativo en la expresión génica de los camarones tratados con laminarina ( $P=0.0273$ ), *C. maris* ( $P=0.0187$ ), y *Curtobacterium* sp. ( $P=0.0331$ ), es al menos el doble de expresión con respecto al grupo control. A las 72 h posexposición se ve este incremento significativo ( $P=0.0357$ ) solo en los camarones expuestos a *G. candidum* y a las 216 h posexposición con camarones expuestos a *C. maris* ( $P=0.0431$ ). En ambos casos (72 y 216 h postexposición), la expresión génica de los hemocitos de los camarones expuestos a estos dos tratamientos mostró valores al menos dos veces superiores comparados con el grupo control. La expresión génica de MnSOD en los hemocitos de los camarones expuestos a *G. candidum* mostraron una tendencia a incrementarse hasta las 72 h posexposición, disminuyendo posteriormente.

## Discusión

Diferentes moléculas actúan de forma natural para estimular los mecanismos de defensa de los organismos (inmunoestimulantes), evitando así la entrada, invasión y colonización de los agentes patógenos.<sup>(8, 11, 34)</sup> Estas moléculas inmunoestimulantes provienen de diferentes fuentes (virus, bacterias, hongos, etc.) y pueden ser administradas regularmente a los camarones por diferentes vías dependiendo del volumen de agua, la densidad o el estadio de los organismos en cultivo: por inmersión directa al agua de cultivo (poslarvas), por inclusión en la dieta (juveniles) o por inyección intramuscular (adultos), favoreciendo la resistencia a enfermedades potenciales (sin provocar la resistencia microbiana que generan los antibióticos) y mejorando la sobrevivencia de los organismos ante estrés ambiental o nutricional.<sup>(35, 36)</sup>



**Figura 1.** Conteo de hemocitos y proteína total en hemocitos, además de la actividad de SOD en músculo en juveniles de camarón blanco *L. vannamei* expuestos a los tratamientos de grupo control (sin tratamiento), laminarina (0.5 mg/L), *Candida maris*, *Geotrichum candidum* y *Curtobacterium sp.* a  $1 \times 10^6$  CFU/mL cada una. \*Significancia ( $P < 0.0500$ ) comparado con el grupo control en cada periodo.



**Figura 2.** Expresión génica relativa de MnSOD en hemocitos de camarón blanco juvenil (*L. vannamei*) expuestos a los tratamientos del grupo control (sin tratamiento), laminarina (0.5 mg/L), *Candida maris*, *Geotrichum candidum* y *Curtobacterium* sp. a  $1 \times 10^6$  CFU/mL cada una. \*Significancia ( $P < 0.0500$ ) comparada con el grupo control en cada periodo.

En el presente estudio, juveniles de camarón del Pacífico se expusieron vía inmersión a concentraciones de  $1 \times 10^6$  CFU/mL con inmunoestimulantes microbianos aislados de suelo marino, y a un inmunoestimulante comercial (0.5 mg/L). Se encontró que los tratamientos microbianos incrementaron el sistema antioxidante y el contenido de proteína en hemocitos. Ceseña et al.<sup>(31)</sup> reportaron incremento en la respuesta inmune, antioxidante y resistencia a infecciones experimentales con *Vibrio parahaemolyticus* en juveniles de *L. vannamei* al exponer a los camarones a microorganismos inmunoestimulantes incluidos en la dieta y por inmersión.

La utilización adecuada de inmunoestimulantes como la concentración (dosis), frecuencia y vía de administración son relevantes para obtener resultados favorables en la activación del sistema inmune del camarón, esto con el propósito de evitar inmunodepresión causada por un gasto energético excesivo en el organismo (estrés oxidativo) o efectos nulos por no hacer llegar un tratamiento específico en la concentración, vía de administración o frecuencia de administración adecuadas.<sup>(24, 36, 37)</sup>

Los resultados de este estudio muestran que la aplicación de *C. maris*, *G. candidum* y *Curtobacterium* sp. generaron resultados significativos en diferentes periodos, tanto en el contenido de proteínas totales en hemocitos, como en la actividad de SOD en el músculo. También se observó un contenido promedio alto de hemocitos a las 72 y 216 h en comparación con otros utilizados (24 y 48 h) de esta investigación. Los inmunoestimulantes activan las respuestas inmunitarias de los camarones desde la etapa poslarvaria y desarrollan la inmunidad innata de estos crustáceos, creando un ambiente hostil para los patógenos potenciales, y promoviendo su eliminación oportuna.<sup>(11, 34, 38, 39)</sup>

Apines-Amar & Amar<sup>(40)</sup> muestran que al ser detectados los inmunoestimulantes por los hemocitos, inician una cadena de eventos fisiológicos que preparan y refuerzan el sistema inmunitario del organismo contra los agentes patógenos. Esta cadena de eventos fisiológicos del camarón genera la unión con péptidos an-

tibacterianos, fagocitosis por hemocitos, encapsulación de la molécula detectada, melanización, y activación del sistema ProPO.<sup>(16, 34, 37)</sup> Esto produce y libera por exocitosis diferentes proteínas de los hemocitos hacia la hemolinfa, como la profenoloxidasa, proteinasa serina, peroxinectina, el inhibidor de proteinasas y lisozima en respuesta a estímulos por la invasión de patógenos,<sup>(41)</sup> donde los materiales y la molécula son destruidos y expulsados a través del sistema excretor a través del tejido branquial, la glándula antenal, etcétera.

Los hemocitos son un indicador confiable para determinar y prevenir enfermedades, así como un marcador del estado fisiológico del animal. Son responsables de la coagulación, la liberación de transglutaminasas y de las trombospondinas; además de la fagocitosis y eliminación de materiales extraños que penetran a la hemolinfa y los tejidos del camarón. La detección de una molécula extraña activa estas células, y libera diferentes productos extra- e intracelulares asociados a la respuesta inmune, lo que genera la proliferación hemocítica y la fagocitosis. Durante este proceso se induce la producción de proteínas como aglutininas, ProPO, péptidos antimicrobianos, lisozima, que aumentan el contenido total de proteínas en los hemocitos y la hemolinfa.<sup>(42)</sup> Algunos estudios sugieren que, el incremento de diferentes inmunoproteínas en los hemocitos es inducido por la exposición a inmunoestimulantes.<sup>(42-44)</sup>

Las tres cepas experimentales aquí empleadas (*C. maris*, *G. candidum* o *Curtobacterium* sp.) mostraron actividad inmunoestimulante en el camarón (*L. vannamei*) al modificar la concentración de PT en hemocitos a diferente tiempo posexposición (Figura 1). Esto induce incrementos significativos en la proteína a las 48 y 72 h posexposición comparado con los grupos control. Varios autores<sup>(13, 38, 45)</sup> observaron cambios similares e incrementos en el nivel de hemocitos y proteínas al exponer a *L. vannamei* a inmunoestimulantes. Los resultados de este estudio sugieren que las cepas experimentales utilizadas aquí podrían mejorar la respuesta inmune y la resistencia a enfermedades del camarón blanco.

Una respuesta inmunitaria significativa de los hemocitos es la fagocitosis, que elimina agentes extraños, pero durante este proceso se producen moléculas reactivas de oxígeno (ROS) que deben ser neutralizadas.<sup>(46)</sup> Esta neutralización se lleva a cabo por las enzimas antioxidantes, principalmente por la enzima SOD, que convierte al ROS en moléculas de oxígeno y peróxido de hidrógeno. Esta última molécula es convertida en agua y oxígeno por la enzima catalasa, neutralizando así al ROS y regulando la homeostasis celular. Los resultados muestran un aumento significativo en la SOD al usar laminarina *G. candidum* y *Curtobacterium* sp. a las 72 h en comparación con el grupo control.

Las enzimas SOD requieren un cofactor metálico para la catálisis, donde el manganeso es uno de estos metales involucrados en esto, que genera MnSOD.<sup>(46)</sup> García-Triana et al.<sup>(47)</sup> señalan que la MnSOD es una enzima antioxidante que transforma o dismuta el superóxido tóxico en peróxido de hidrógeno y oxígeno, protegiendo a las células del daño generado por esa molécula. El nivel de transcripción de MnSOD en hemocitos disminuyó a las 24 h posexposición con los productos probados, comparado con el grupo control, seguido por un incremento a las 48, 72 y 216 h posexposición (Figura 2). Este decremento en la expresión antioxidante es similar a otros estudios relacionados con el uso de inmunoestimulantes, el cual se asocia con estrés oxidativo celular causado por la activación del sistema

inmune del hospedero durante las primeras horas de exposición al tratamiento, que se compensa con un incremento posterior en la respuesta celular.<sup>(43,48)</sup>

El decremento en la respuesta inmune o antioxidante en camarón también se ha investigado al exponer al camarón a estresores externos como contaminantes, infecciones microbianas e hipoxia.<sup>(36,48-50)</sup> Neves et al.<sup>(36)</sup> reportaron un decremento significativo en la actividad de la enzima SOD cuando el camarón (*Palaeomonetes argentinus*) fue infectado con *Probopyrus ringueleti*. Campa-Córdova et al.<sup>(24)</sup> obtuvieron un incremento significativo en la actividad SOD en hemocitos de camarón *L. vannamei* a las 6 h postexposición (inmersión) con  $\beta$ -1, 6 glucano (0.5 mg/L) y un decremento posterior significativo a las 72 hpe respecto al grupo control. En Liconá-Jain et al.<sup>(35)</sup> hubo incrementos en la actividad de SOD en hemocitos de juveniles de *L. vannamei* después de la segunda semana de la exposición con levaduras marinas (1.1 % en la dieta). Así que, se incrementó la resistencia del camarón al ser infectado posteriormente con *V. parahaemolyticus*.

## Conclusiones

Basándose en los resultados observados para los tres microorganismos obtenidos del ambiente marino, se demostró que los camarones del Pacífico juveniles (*L. vannamei*) expuestos a una concentración de  $1 \times 10^6$  CFU/mL durante 48 horas presentan un aumento en el contenido proteico en los hemocitos circulantes, además de un incremento en la actividad enzimática y la expresión génica de la superóxido dismutasa. Este estudio resalta la importancia de realizar más investigaciones para esclarecer este tema.

## Disponibilidad de los datos

Todos los datos relevantes se incluyen en el manuscrito y los archivos de información de respaldo se presentan como material complementario en el sitio web de la revista.

## Agradecimientos

Los autores agradecen al personal técnico del CIBNOR, Sandra de la Paz, Pablo Monsalvo, Martín Ramírez y Norma Ochoa por su apoyo técnico.

## Declaración de financiamiento

Esta investigación fue financiada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (<https://conahcyt.mx>), subvención SEP-CONACYT 243532, otorgada al Dr. A. Campa. El financiador no tuvo ningún papel en el diseño del estudio, la recopilación y el análisis de datos, la decisión de publicar o la preparación del manuscrito.

## Conflicto de interés

Los autores declaran no tener conflicto de interés relacionado con este manuscrito.

## Contribuciones de los autores

Conceptualización y revisión de datos: AICC, GAG.

Metodología: AICC, YGA, JAVC.

Análisis de datos y Software: AICC, YMM, DMF, JAVC.

Recurso, Administración del Proyecto, y Supervisión: AICC.

Visualización: AICC, GAG.

Escritura-borrador original: AICC, GAG, YMM, DMF, CES, YGA, JAVC.

Escritura-redacción y edición: AICC, GAG, YMM DMF, CES.

## Referencias

1. FAO. The state of world fisheries and aquaculture 2022. Towards blue transformation. Rome; 2022. doi: 10.4060/cc0461en.
2. CONAPESCA. Anuario estadístico de pesca. CDMX, México: SAGARPA; 2021. [https://nube.conapesca.gob.mx/sites/cona/dgppe/2021/ANUARIO\\_ESTADISTICO\\_D\\_E\\_ACUACULTURA\\_Y\\_PESCA\\_2021.pdf](https://nube.conapesca.gob.mx/sites/cona/dgppe/2021/ANUARIO_ESTADISTICO_D_E_ACUACULTURA_Y_PESCA_2021.pdf)
3. Arreguín-Sánchez F, Arcos-Huitrón E. Fishing in Mexico: state of exploitation and use of ecosystems. *Hidrobiológica*. 2011;21(3):431-462.
4. Pérez-Castañeda R, Sánchez-Martínez JG, Aguirre-Guzmán G, Rabago-Castro JL, Vázquez-Sauceda (ML). Interaction of fisheries and aquaculture in the production of marine resources: advances and perspectives in Mexico. In: CW Finkl, C Makowski. editors. Switzerland: Environmental Management and Governance—Advances in Coastal and Marine Resources, Coastal Research Library 8, Springer International Publishing. 2014;111-140. doi: 10.1007/978-3-319-06305-8\_5.
5. Morales-Cristóbal Y, Cortés-Jacinto E, Saucedo PE, Cadena-Roa M, Campa-Córdova AI. Dietary enrichment with crude protein content and feed additives (*Bacillus* spp. and yeast strains) improves growth performance, survival and circulating hemocytes in juvenile white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*. 2022;57(1):45–56. doi:10.22370/rbmo.2022.57.1.3361.

6. Burge E, Madigan DJ, Burnett LE, Burnett KG. Lysozyme gene expression by hemocytes of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, after injection with *Vibrio*. *Fish & Shellfish Immunology*. 2007;22(4):327-39. doi:10.1016/j.fsi.2006.06.004.
7. Robalino J, Almeida JS, McKillen D, Colglazier J, Trent HF, Chen YA, Peck MET, Browdy CL, Chapman RW, Warr GW, Gross PS. Insights into the immune transcriptome of the shrimp *Litopenaeus vannamei*: tissue-specific expression profiles and transcriptomic responses to immune challenge. *Physiology Genomics*. 2007;29:44–56. doi:10.1152/physiolgenomics.00165.2006.
8. Luna-González A, Moreno-Herrera JT, Campa-Córdova AI, González-Ocampo HA, Fierro-Coronado JA, Álvarez-Ruiz P, Bueno-Ibarra MA. Respuesta inmune y expresión de genes en el camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) inducida por inmunoestimulantes microbianos. *Latin American Journal of Aquatic Research*. 2013;41(5):898-907. doi:103856/vol41-issue5-fulltext-10.
9. Ceseña CE, Vega-Villasante F, Aguirre-Guzman G, Luna-González A, Campa-Córdova AI. Update on the use of yeast in shrimp aquaculture: a minireview. *International Aquatic research*. 2021b;13:1-16. doi:10.22034/IAR.2021.1904524.1066.
10. Méndez-Martínez Y, Torres-Navarrete YG, Cortés-Jacinto E, García-Guerrero MU, Hernández-Hernández LH, Verdecía DM. Biological, nutritional, and hematoimmune response in juvenile *Cherax quadricarinatus* (Decapoda:Parastacidae) fed with probiotic mixture. *Revista MVZ Córdoba*. 2022;27(3). doi:10.21897/rmvz.2578.
11. Kumar S, Verma AK, Singh SP, Awasthi A. Immunostimulants for shrimp aquaculture: paving pathway towards shrimp sustainability. *Environmental Science and Pollution Research*. 2022(Jan);13. doi:10.1007/s11356-021-18433-y.
12. Türker M. Yeast biotechnology: diversity and applications. *Advances in science and industrial productions of baker's yeast*. 27th VH Yeast Conference, April 14<sup>th</sup>–15<sup>th</sup>. Istanbul, Turkey: 2014; 1-26.
13. Campa-Córdova AI, Hernández-Saavedra NY, Aguirre-Guzmán G, Ascencio F. Immunomodulatory response of superoxide dismutase in juvenile American white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) exposed to immunostimulants. *Ciencias Marinas*. 2005;31(4):661-669. doi:10.7773/cm.v31i4.32.
14. Samuel P, Prince L, Prabakaran P. Antibacterial activity of marine derived fungi collected from South East Coast of Tamilnadu, India. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research*. 2011;1(4):86-94.
15. Fell JW. Yeast in marine environments. In: EB Gareth, KL Pang, editors. *Marine fungi and fungal-like organisms*. De Gruyter: University of Malaya; 2012. pp: 92-103.
16. Campa-Córdova AI, Valenzuela-Chávez JA, García-Armenta J, Medina D, Licona-Jain AB, Angulo-Valadez CE, Aguirre-Guzmán G, Mejía-Ruiz CH. Uso profiláctico de aditivos inmunoestimulantes en el cultivo del camarón blanco, *Litopenaeus vannamei*. In: LE Cruz Suárez, D Ricque D, M Tapia M, MG Nieto, DA Villarreal, J Gamboa, L Mercedes L, MA Galaviz editors. *Nuevo León, México: Universidad Autónoma de San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México: 2017. pp. 541-559.*
17. Ochoa N. Evaluación de factores de virulencia de hongos infecciosos en camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) [tesis de maestría]. La Paz, Baja California

- Sur, México: Instituto Politécnico Nacional, Centro Interdisciplinario en Ciencias Marinas; 2004.
18. Ochoa JL, Ochoa-Alvarez N, Guzmán-Murillo MA, Hernandez S, Ascencio F. Isolation and risk assessment of *Geotrichum* spp. in the white shrimp (*Litopenaeus vannamei* Boone, 1931) from culture ponds. Latin American Journal of Aquatic Research. 2015;43(4):755-765. doi: 10.3856/vol43-issue4-fulltext-14.
  19. Ibrar M, Zuberi A, Amir I, Imran M, Noor Z. Effect of probiotic *Geotrichum candidum* on early rearing of *Labeo rohita* (Hamilton, 1822). Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. 2017;17:1263-1270. doi: 10.4194/1303-2712-v17\_6\_19.
  20. Amir I, Zuberi A, Kamran M, Imran M, Ul M, Murtaz H. Evaluation of commercial application of dietary encapsulated probiotic (*Geotrichum candidum* QAUGC01): effect on growth and immunological indices of rohu (*Labeo rohita*, Hamilton 1822) in semi-intensive culture system. Fish & Shellfish Immunology. 2019;95:464-472. doi: 10.1016/j.fsi.2019.11.011.
  21. Ibarra-Serrano, AC. Evaluación de microorganismos aislados de sistema de mangle con capacidades biorremediadoras e inmunoestimulantes en el cultivo de camarón blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) [tesis de maestría]. La Paz, Baja California Sur, México: Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste; 2018. pp. 62.
  22. Cowan ST, Steel LJ. Manual for the identification of medical bacteria. Cambridge, UK: University of Cambridge; 1993.
  23. Abasolo-Pacheco F, Campa- Córdova AI, Mazón-Suástegui JM, Tovar-Ramírez D, Araya R, Saucedo PE. Enhancing growth and resistance to *Vibrio alginolyticus* disease in catarina scallop (*Argopecten ventricosus*) with *Bacillus* and *Lactobacillus* probiotic strains during early development. Aquaculture Research. 2017;48:4597-4607. doi: 10.1111/are.13283.
  24. Campa-Córdova AI, Hernández-Saavedra NY, de Philippis R, Ascencio F. Generation of superoxide anion and SOD activity in haemocytes and muscle of American white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) as a response to  $\beta$ -glucan and sulphated polysaccharide. Fish and Shellfish Immunology. 2002;12:353-366. doi: 10.1006/fsim.2001.0377.
  25. Pacheco M, Campa A, Aguirre G, Luna A, Guzmán M, Ascencio F. Effect of *Debaryomyces hansenii* on the antioxidant response of juvenile white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Revista MVZ. Córdoba. 2012;17(1):2820-2826.
  26. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry. 1976;72:248-54.
  27. Wang Z, Zhu F. MicroARN-100 is involved in shrimp immune response to white spot syndrome virus (WSSV) and *Vibrio alginolyticus* infection. Scientific Reports. 2017;7:42334. doi: 10.1038/srep42334.
  28. Suzuki K. Measurements of Mn-SOD and Cu, Zn-SOD. In: N Taniguchi and J Gutteridge, editors. Experimental protocols for reactive oxygen and nitrogen species. Oxford, UK: Oxford University Press. 2000;91-95.
  29. Gutiérrez-Dagnino A, Luna-González A, Fierro-Coronado JA, Álvarez-Ruiz P, Flores-Miranda MC, Miranda-Saucedo S, Medina-Beltrán V, Escamilla-Montes R. Efecto de la inulina y del ácido fúlvico en la supervivencia, crecimiento, sistema inmune y prevalencia de WSSV en *Litopenaeus vannamei*. Latin

- American Journal of Aquatic Research. 2015;43(5):912-921. doi: 10.3856/vol43-issue5-fulltext-11.
30. Fernandes TJR, Costa J, Oliveira MBPP, Mafra I. COI barcode-HRM as a novel approach for the discrimination of hake species. Fisheries Research. 2018;197:50-59. doi: 10.1016/j.fishres.2017.09.014.
  31. Ceseña CE, Cortés-Jacinto E, Luna-González A, Vega-Villasante F, Ochoa-Álvarez NA, Morelos-Castro RI, Escamilla-Montes R, Tovar-Ramírez D, Sánchez-Ortiz AC, Campa-Córdova AI. Dietary supplementation of *Debaryomyces hansenii* enhanced survival, antioxidant and immune response in juvenile shrimp *Penaeus vannamei* challenged with *Vibrio parahaemolyticus*. Tropical and Subtropical Agroecosystems. 2021;24(2):1-13. doi: 10.56369/tsaes.3616.
  32. Ventura-Lopez C, Gomez-Anduro G, Arcos FG, Llera-Herrera R, Racotta IS, Ibarra AM. A novel CHH gene from the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* was characterized and found highly expressed in gut and less in eyestalk and other extra- eyestalk tissue. Gene. 2016;582(2):148-60. doi: 10.1016/j.gene.2016.02.011.
  33. Hellemans J, Mortier G, De Paepe A, Speleman F, Vandesompele J. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. Genome Biology. 2007;8(2):R19.
  34. Zhang Z, Aweya JJ, Yao D, Zheng Z, Tran NT, Li S, Zhang T. Ubiquitination as an important host-immune response strategy in penaeid shrimp: inferences from other species. Frontiers in Immunology. 2021;12:697397. doi: 10.3389/fimmu.2021.697397.
  35. Licona-Jain A, Racotta I, Angulo C, Luna-González A, Escamilla-Montes R, Cortés-Jacinto E, Morelos-Castro RM, Campa-Córdova AI. Combined administration routes of marine yeasts enhanced immune-related genes and protection of white shrimp (*Penaeus vannamei*) against *Vibrio parahaemolyticus*. Fish & Shellfish Immunology. 2022;124:192-200. doi: 10.1016/j.fsi.2022.04.004.
  36. Neves CA, Santos EA, Bainy ACD. Reduced superoxide dismutase activity in *Palaeomonetes argentinus* (Decapoda, Palaemonidae), infected by *Probopyrus ringueleti* (Isopoda, Bopyridae). Diseases of Aquatic Organisms. 2000;39:155-158.
  37. Aguirre-Guzmán G, Sánchez-Martínez JG, Campa-Córdova AI, Luna-González A, Ascencio F. Penaeid shrimp immune system: a minireview. Thai Journal of Veterinary Medicine. 2009;39(3):205-215.
  38. Ji PF, Yao CL, Wang ZY. Immune response and gene expression in shrimp (*Litopenaeus vannamei*) hemocytes and hepatopancreas against some pathogen-associated molecular patterns. Fish & Shellfish Immunology. 2009;27:563-570. doi: 10.1016/j.fsi.2009.08.001.
  39. Lin YC, Chen JH, Man SNC, Morni WZW, Suhaili ASNA, Cheng SY, Hsu CH. Modulation of innate immunity and gene expressions in white shrimp *Litopenaeus vannamei* following long-term starvation and re-feeding. Results in Immunology. 2012;2:148-156. doi: 10.1016/j.rinim.2012.07.001.
  40. Apines-Amar MJS, Amar EC. Use of immunostimulants in shrimp culture: an update. In: CMA Caipang, MBI Bacano-Maningas, FF Fagutao, editors. Biotechnological Advances in Shrimp Health Management in the Philippines, Research Signepost. 2015;45-71.
  41. Lin YC, Tayag CM, Huang CL, Tsui WC, Chen JC. White shrimp *Litopenaeus vannamei* that had received the hot-water extract of *Spirulina platensis* showed

- earlier recovery in immunity and up-regulation of gene expressions after pH stress. *Fish & Shellfish Immunology*. 2010;29:1092-1098.
42. Jennissen HP. Ubiquitin and the enigma of intracellular protein degradation. *European Journal of Biochemistry*. 1995;231:1-30.
  43. Dugger D. Bio-modulation of the non-specific immune response in marine shrimp with beta-glucan. *Aquaculture Magazine*. 1999;1:81-89.
  44. Karunasagar I, Otta SK, Devaraj TN, Shubha G, Iddya K. Immunostimulation of *Penaeus monodon* through the oral route. In: Workshop: Shrimp Immunity and Disease Control. Thailand; 1999. <http://www.ifremer.fr/incode/htm>
  45. Hien TTT, Tao CT, Hoa TTT, Huynh TG, Tu TLC, Hai TN, Nguyen DH, Kim SH, Song JW, Nhan HT, Duc PM. Effects of dietary supplementation with Pro-A on growth performance, feed utilization, immune responses, and intestinal microbiota of whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture Reports*. 2022;24. Article: 101125. doi: 10.1016/j.aqrep.2022.101125.
  46. Zhang Q, Li F, Wang B, Zhang J, Liu Y, Zhou Q, Xiang J. The mitochondrial manganese superoxide dismutase gene in Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*: Cloning, distribution and expression. *Developmental and Comparative Immunology*. 2007;31:429-440. doi: 10.1016/j.dci.2006.08.005.
  47. García-Triana A, Zenteno-Savín T, Peregrino-Uriarte AB, Yepiz-Plascencia G. Hypoxia, reoxygenation and cytosolic manganese superoxide dismutase (cMnSOD) silencing in *Litopenaeus vannamei*: Effects on cMnSOD transcripts, superoxide dismutase activity and superoxide anion production capacity. *Developmental and Comparative Immunology*. 2010;34:1230–1235. doi: 10.1016/j.dci.2010.06.018.
  48. Le Moullac G, Soyez C, Saulnier D, Ansquer D, Avarre JC, Levy P. Effect of hypoxic stress on the immune response and the resistance to vibriosis of the shrimp *Penaeus stylirostris*. *Fish & Shellfish Immunology*. 1998;8:621-629.
  49. Downs C, Fauth JE, Woodley CM. Assessing the health of grass shrimp (*Palaeomonetes pugio*) exposed to natural and anthropogenic stressors: a molecular biomarker system. *Marine Biotechnology*. 2001;3:380-397.
  50. Truscott R, White KN. The influence of metal and temperature stress on the immune system of crabs. *Functional Ecology*. 1990;4:455-461.