

## Efecto de prebióticos y probióticos en la expresión y actividad de fenoloxidasa en camarones *Penaeus*: Meta-análisis

Yailén de la Caridad Valdes Vaillant<sup>1</sup>, Juliet Mejías Palmero<sup>2</sup>, Yulaine Corrales Barrios<sup>3</sup>, Marileyxis Regla López Rodríguez<sup>4</sup>, Taimy Hernández Sariago<sup>5</sup>, Amilcar Arenal Cruz<sup>6</sup> & Peter Bossier<sup>7</sup>

<sup>1</sup>ORCID <https://orcid.org/0000-0001-7709-6192>, Universidad de Camagüey, “Ignacio Agramonte Loynaz”, Departamento de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Camagüey, Cuba, <sup>2</sup>ORCID <https://orcid.org/0000-0002-4388-5254>, Universidad de Camagüey, “Ignacio Agramonte Loynaz”, Departamento de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Camagüey, Cuba, <sup>3</sup>ORCID <https://orcid.org/0000-0003-4757-1911>, Universidad de Camagüey, “Ignacio Agramonte Loynaz”, Departamento de Morfofisiología, Camagüey, Cuba, <sup>4</sup>ORCID <https://orcid.org/0000-0001-6967-0596>, Universidad de Camagüey, “Ignacio Agramonte Loynaz”, Departamento de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Camagüey, Cuba, <sup>5</sup>ORCID <https://orcid.org/0000-0002-9638-2765>, Universidad de Camagüey “Ignacio Agramonte Loynaz”, Departamento de Morfofisiología, Camagüey, Cuba, <sup>6</sup>ORCID <https://orcid.org/0000-0003-2912-9871>, Universidad de Camagüey “Ignacio Agramonte Loynaz”, Departamento de Morfofisiología, Camagüey, Cuba, <sup>7</sup>ORCID <https://orcid.org/0000-0002-6165-9111>, Universidad de Gante, Facultad de Bioingeniería, Laboratorio de Acuicultura y Centro de referencia de la Artemia, Bélgica.

Citación: Valdes Vaillant, Y. de la C., Mejías Palmero, J., Corrales Barrios, Y., López Rodríguez, M., Hernández Sariago, T., Arenal Cruz, A., & Bossier, P. (2020). Efecto de prebióticos y probióticos en la expresión y actividad de fenoloxidasa en camarones *Penaeus*: Meta-análisis. *Agrisost*, 26(3), 1-16. <https://doi.org/10.5281/zenodo.6580997>

Recibido: 17 enero 2020

Aceptado: 5 octubre 2020

Publicado: 12 octubre 2020

Financiamiento: VLIR-USO, Bélgica.

Conflictos de interés: No existen.

Correo electrónico: [yailen.valdes@reduc.edu.cu](mailto:yailen.valdes@reduc.edu.cu)

### Resumen

**Contexto:** Los inmunoestimulantes estimulan la respuesta inmune y el crecimiento, incrementan la resistencia al estrés y a las enfermedades en acuicultura. A veces se encuentran resultados contradictorios que brindan confusión acerca del empleo de ellos, por lo que se planteó como problema: ¿Podría la literatura científica relacionada con prebióticos y probióticos, donde se evalúen los indicadores del sistema inmune del camarón, servir como base para la toma de decisiones en empleo de inmunoestimulantes en la camaronicultura?

**Objetivo:** Evaluar la influencia de prebióticos y probióticos en la expresión y actividad fenoloxidasa de camarones *Penaeus*, mediante un meta-análisis que permita la toma de decisiones para su empleo en la camaronicultura.

**Métodos:** Se realizaron búsquedas en Pubmed, Science Direct, Scopus desde el 2008 hasta el 2019 sobre la influencia de inmunoestimulantes en la actividad fenoloxidasa y expresión de genes. El análisis estadístico se realizó con el programa Jasp Metaanalysis Versión 0.9.2. a un 95% de confianza.

**Resultados:** Se obtuvieron 262 artículos científicos sobre evaluación de prebióticos y probióticos en camarones *Penaeus*. De estos, 61 cumplieron los criterios de inclusión para la respuesta inmunológica: 51 evaluaron la actividad de fenoloxidasa y 11 la profenoloxidasa. Tanto los prebióticos como los probióticos estimulan la enzima y la proenzima; los extractos de plantas fueron los que más modificaron esta actividad y los *Bacillus* fue el género que más estimuló.

**Conclusiones:** La literatura científica relacionada con fenoloxidasa en camarones *Penaeus* indica que se deben evaluar con cuidado, debido al diseño experimental y la forma que expresan los resultados.

**Palabras clave:** inmunoestimulantes, camarones, sistema inmune.

## Effect of Prebiotics and Probiotics on Phenoloxidase Expression and Activity in *Penaeus* Shrimps: A Meta-Analysis

### Abstract

**Context:** Immunostimulants stimulate the immune response and growth, increase resistance to stress and disease in aquaculture. Sometimes contradictory results are found that provide confusion about the use of them, so it was posed as a problem: Could the scientific literature related to prebiotics and probiotics, where the indicators of the shrimp immune system are evaluated, serve as the basis for the decision-making in the use of immunostimulants in shrimp farming?

**Objective:** To evaluate the influence of prebiotics and probiotics on the expression and activity of phenoloxidase in *Penaeus* shrimp, through a meta-analysis that allows decision-making for their use in shrimp farming.

**Methods:** Pubmed, ScienceDirect, Scopus were searched from 2008 to 2019 on the influence of immunostimulants on phenoloxidase activity and gene expression. Statistical analysis was performed with the Jasp Metaanalysis Version 0.9.2 program. at 95% confidence.

**Results:** 262 scientific articles were obtained on the evaluation of prebiotics and probiotics in *Penaeus* shrimp. Of these, 61 met the inclusion criteria for the immune response: 51 evaluated the activity of phenoloxidase and 11 the profenoloxidase. Both prebiotics and probiotics stimulate the enzyme and proenzyme; plant extracts were the ones that most modified this activity and *Bacillus* was the genus that most stimulated.

**Conclusions:** The scientific literature related to phenoloxidase in *Penaeus* shrimp indicates that they should be carefully evaluated, due to the experimental design and the way the results express.

**Key words:** immunostimulants, shrimp, immune system.

## Introducción

La acuicultura es uno de los sectores de mayor crecimiento en la producción de alimentos. Los camarones del género *Penaeus* son los que más se cultivan en condiciones de granjas camaroneras, debido a su rápido crecimiento y adaptación (FAO, 2018). El cultivo del camarón, tanto en Cuba como en el mundo, enfrenta riesgos de grandes pérdidas financieras por enfermedades que causan una alta mortalidad, así como una disminución en la calidad de las producciones. Como los crustáceos no poseen respuestas inmunes específicas contra agentes infecciosos, su función defensiva consiste en un desarrollado sistema de defensa inespecífico, que se basa en hemocitos circulantes y varias proteínas de defensa (Chang, et al., 2018), como es la formación del sistema proPO. Este produce reacciones proteolíticas que, entre otros productos, culminan con el procesamiento y la activación de la enzima activa fenoloxidasas (PO) (Tassanakajon et al., 2018).

La PO constituye la enzima principal en camarones que posibilita la reparación de heridas y esclerotización de la cutícula por sus efectos microbicidas (Vaseeharan et al., 2016). Para aumentar la estimulación de la respuesta inmune y la resistencia al estrés y a enfermedades, mediante la interacción directa con las células del sistema inmune y la activación de ellas, se emplean los inmunoestimulantes (Vaseeharan & Thaya, 2014) como moléculas y/o células completas de bacterias y levaduras (Mastan, 2015). En la literatura científica existe variada información referente al empleo de prebióticos y probióticos. Una herramienta que permite el análisis de resultados proveniente de diferentes autores es el meta-análisis (MA). El MA es una revisión sistemática (RS) en el cual se combinan resultados de varios estudios referentes a la misma pregunta (¿Se estimulará la fenoloxidasas y la

profenoloxidasas en camarones *Penaeus* con el empleo de inmunoestimulantes?), mediante una revisión exhaustiva de la literatura, para luego resumirlos en un valor numérico (Tikito & Souissi, 2019) que permitirá tomar decisiones en la camaronicultura.

La diversidad de experimentos en las especies de camarón dificulta la toma de disposiciones para el empleo de prebióticos y probióticos en la camaronicultura. Es por eso que se plantea como **objetivo general:** Evaluar la influencia de prebióticos y probióticos en la expresión y actividad fenoloxidasas de camarones del género *Penaeus*, mediante la utilización de herramientas de meta-análisis que permita la toma de decisiones para su empleo en la camaronicultura

## Materiales y Métodos

### Métodos

#### Criterios de elegibilidad

Los estudios tomados tratan sobre la medición de la actividad enzimática fenoloxidasas y la expresión de genes en proPO a través del uso de prebióticos y probióticos en camarones del género *Penaeus*. Para ello, se incluyeron los artículos publicados entre el 2008 y el 2019 en idioma inglés y español.

#### Fuente de información

Se examinaron las bases de datos *Scopus*, *Science Direct*, *Pub Med* para recopilar los artículos científicos relevantes. La búsqueda de los mismos comenzó desde septiembre del 2018 hasta febrero del 2019. Los autores de los artículos que satisficieron los criterios de inclusión, pero carecían de medidas de dispersión se contactaron para así obtener

información extra. Los que no respondieron se descartaron.

#### Búsqueda

Se buscó en las bases de datos con las palabras claves *phenoloxidase penaeus prebiotic and probiotic*. La inclusión preliminar se basó en el análisis de títulos y resúmenes.

#### Selección de estudios

Se consideraron como estudios válidos a los artículos científicos experimentales que fueron publicados en revistas arbitradas, las cuales estudiaron el efecto de los prebióticos y probióticos en la respuesta inmunológica, en específico la actividad de fenoloxidasas en el cultivo de camarones peneidos. Se seleccionaron los estudios que median las variables respuestas.

#### Proceso de recopilación de datos

La identificación de los estudios, la recopilación de la información de interés a las variables respuesta (media y medidas de dispersión) se condujo por duplicado en hojas de *Microsoft Excel*. Los datos que se obtuvieron por cada publicación corresponden al ensayo completo, donde sólo se tuvieron en cuenta las mediciones a punto final y no las reportadas a intervalos. En los artículos donde se evaluó más de un tratamiento, combinación o diferentes dosis de administración se analizaron por separado.

#### Lista de datos

Las variables para las que se buscaron datos para su posterior análisis fueron: a) tipo de prebióticos y probióticos, b) especies de camarón peneido, c) estadio larval, d) tipo de estanque (tanque plástico, de tierra, de vidrio o de fibra de vidrio).

#### Riesgo de sesgos entre estudios individuales

Dos revisores de forma independiente realizaron la búsqueda, se confrontaron los resultados y resolvieron las diferencias mediante discusión y consenso. Luego de forma similar, se evaluó el riesgo de sesgo en los estudios individuales.

#### Riesgo de sesgo entre los estudios

Entre los riesgos examinados están: 1) sesgo por publicación múltiple que corresponde al número de experimentos por artículo y artículos por autor incluidos, 2) sesgo por informe selectivo que corresponde a los artículos en los que se reporta información incompleta sobre el diseño experimental realizado o de las variables respuesta, 3) sesgo de publicación que corresponde a los artículos que

reportan resultados favorables al empleo de los prebióticos y probióticos.

#### Síntesis de resultados

El grado de heterogeneidad se cuantificó con el índice de inconsistencia (estadístico I<sup>2</sup>) (Higgins & Thompson, 2002).

#### Análisis estadístico

Se calculó un índice estadístico que reflejó la magnitud del efecto que se obtenía en cada estudio, mediante *Microsoft Excel* 4. El análisis estadístico se realizó con el programa *Jasp Metaanalysis* Versión 0.9.2. Los efectos en la administración de prebióticos y probióticos se cuantificaron como diferencia en medias estandarizadas (DME). Se calcularon los intervalos de confianza del 95% mediante un modelo de efectos aleatorios. Se diseñaron análisis de subgrupos con ayuda del *GraphPad Prism* 7.00, donde se tuvieron en cuenta los factores que podrían influenciar la magnitud del efecto de los tratamientos.

## Resultados y discusión

### Resultados

#### Selección de estudios

La búsqueda bibliográfica arrojó 262 artículos científicos sobre evaluación de prebióticos y probióticos en camarón del género *Penaeus*. De estos, 61 cumplieron los criterios de inclusión que se establecieron con anterioridad para la respuesta inmunológica. Entre estos se encuentran 51 artículos que evaluaron la actividad de fenoloxidasas y 11 la expresión de genes en proPO (Figura 1).

#### Características de los estudios

Los artículos científicos que evaluaron el efecto de los prebióticos y probióticos en la actividad de fenoloxidasas incluyeron las especies: *L. vannamei* (34), *P. monodon* (10), *M. japonicus* (3), *F. indicus* (2), *F. chinensis* (1) y *L. schmitti* (1).

En 43 estudios se utilizaron camarones en estadio juvenil, 45 artículos utilizaron como prebióticos: extractos de plantas (15), polisacáridos (14), ácidos orgánicos (3), lipolisacáridos (2), disacáridos (2), inulina (1), tripsina (1), ferritina (1), polifenol (1), metal (1), carragenano (1), nucleótido (1) y sólo 15 emplearon probióticos, entre los que se encuentran las especies: *Bacillus* (7), *Lactobacillus* (4), *Arthrobacter* XE-7 (1), *E. coli* (1), *R. palustris* (1), *Psychrobacter* (1), Proteobacteria – Firmicutes (1), *V. anguillarum* (1), *S. cerevisiae* (1), *Pediococcus* (1). Los análisis de actividad enzimática se realizaron en hemolinfa (40) y en el hepatopáncrea (5).

Para determinar la influencia de prebióticos y probióticos en la expresión de genes se utilizaron las especies *L. vannamei* (10), *P. monodon* (1), *M. japonicus* (1) y *F. indicus* (1). En 10 artículos se emplearon prebióticos: polisacáridos (4), sólo 2 con extractos de plantas y 2 con ácidos orgánicos. Los tejidos que se utilizaron para analizar la proenzima fueron hemolinfa (8) y hepatopáncreas (4).

**Análisis de los estudios excluidos**

De los 262 artículos que se encuentran en las bases de datos en los correspondientes años, se excluyeron 201 en función del tipo de publicación (estudios que involucraban otras especies de animales, en su mayoría *Macrobachium* sp., *Artemia* sp., *Erimacrus* sp., *Scylla* sp.; inclusión de otros aditivos en la dieta; o revisiones; o falta de información estadística para realizar un meta-análisis) (Fig. 1).

Un sesgo que disminuye la credibilidad de los estudios publicados, es que el 25% de los informes excluidos por diseño no muestran la desviación. Se conoce que si los estudios individuales brindan datos sesgados, un meta-análisis con estos datos rendirá estimados con errores (Van Assen et al., 2015).

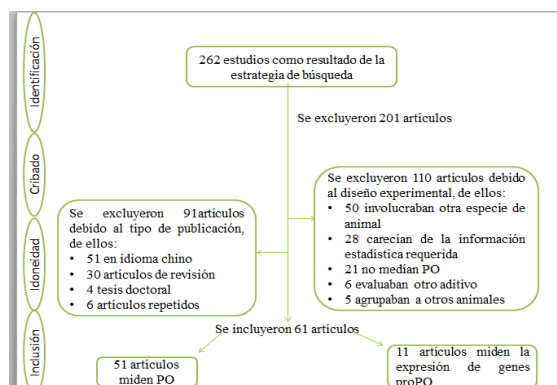


Fig. 1. Diagrama de flujo del proceso de selección de artículos sobre la evaluación de prebióticos y probióticos en camarones peneidos para su inclusión en el meta-análisis.

**Análisis de la actividad de fenoloxidasas y de expresión de genes**

De los 51 artículos incluidos para la actividad de fenoloxidasas, se identificaron 32 experimentos que emplearon prebióticos y 19 probióticos. La diferencia de medias estandarizadas combinadas mostró que los inmunoestimulantes aumentan la actividad de PO en comparación con los controles (Fig. 2 al final del texto).

**Resultados de los estudios individuales**

De los 11 artículos incluidos para la expresión de genes en proPO, se identificaron 10 experimentos que emplearon prebióticos y 5 probióticos. La diferencia de medias estandarizadas combinada mostró que los

inmunoestimulantes aumentan la proPO en comparación con los controles (Fig. 3).

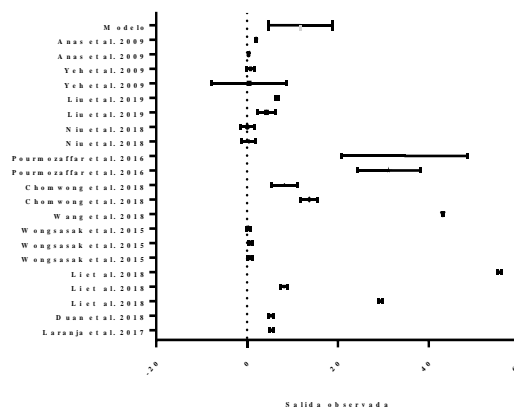
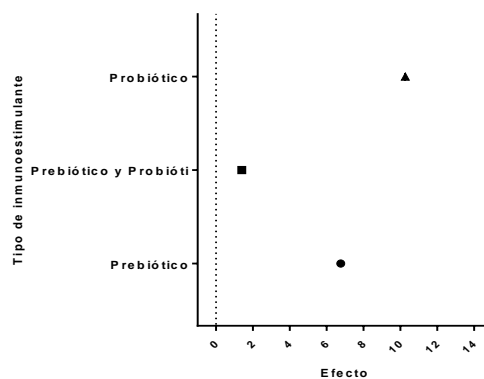


Fig. 3. Forest plot de los 22 experimentos incluidos para estudiar el efecto de la suplementación con prebióticos y probióticos en la expresión de genes, en camarones peneidos. Los puntos representan el efecto estimado (diferencia en medias estandarizada) y las líneas horizontales el índice de confianza del 95 %.

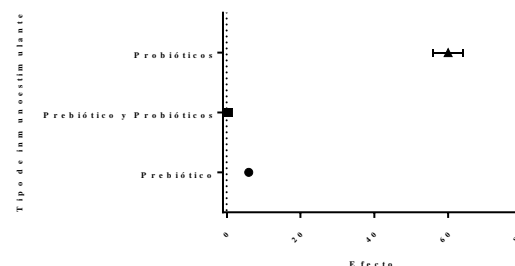
En los probióticos hay una mayor estimulación, tanto de la enzima como de la proenzima, en comparación con los prebióticos y la combinación de ambos tiene una estimulación mínima (Fig. 4 A y B). Derivados de bacterias ácido-lácticas, que inhiben el *Vibrio parahaemolyticus*, estimulan la expresión de ProPO (Chomwong et al., 2018)

**Síntesis de los resultados**

**A B**



**A**



**B**

Fig. 4. Efecto de los tipos de inmunostimulantes en camarones peneidos. A: actividad de fenoloxidasa y B: expresión de genes (profenoloxidasa). Los puntos representan el efecto estimado (diferencia en medias estandarizada) y un índice de confianza del 95 %.

En general los prebióticos estimulan la actividad de fenoloxidasa (Fig. 5 A). La inulina con los oligosacáridos manano presentó una mayor estimulación de la proPO (Fig. 5 B). Esto constituye un sesgo, pues sólo un artículo, referente a la inulina, cumplió con los criterios de inclusión.

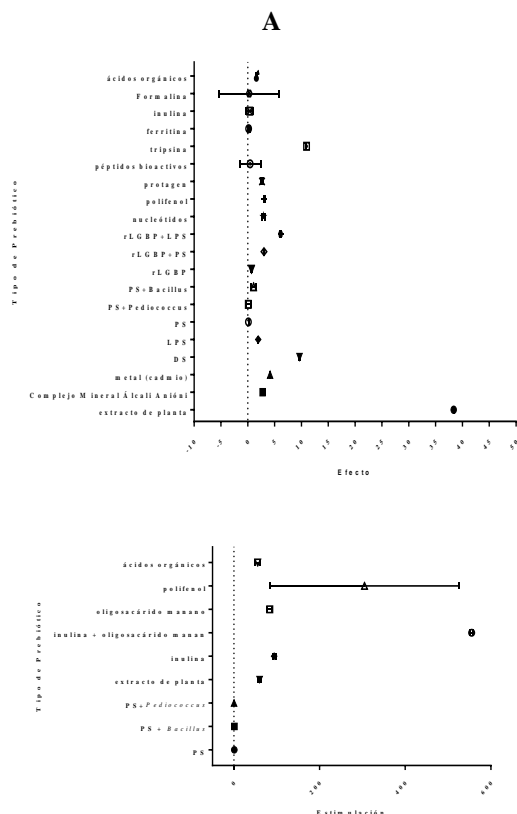
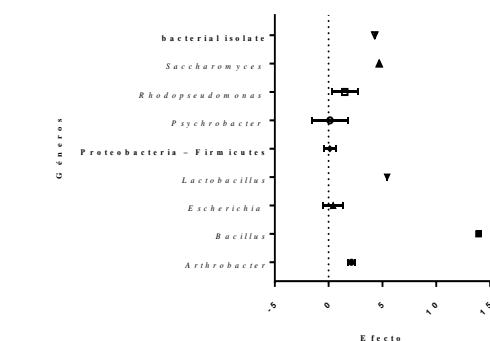
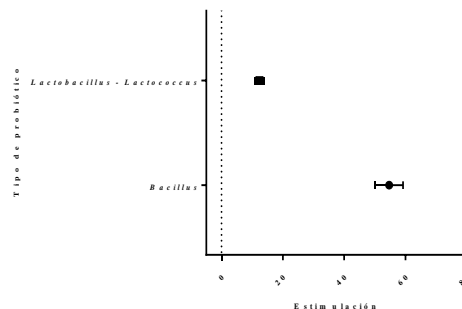


Fig. 5. Efecto del tipo de prebiótico en camarones peneidos. A: actividad de fenoloxidasa y B: expresión de genes (profenoloxidasa). Los puntos representan el efecto estimado (diferencia en medias estandarizada) y un índice de confianza del 95 %.



A



B

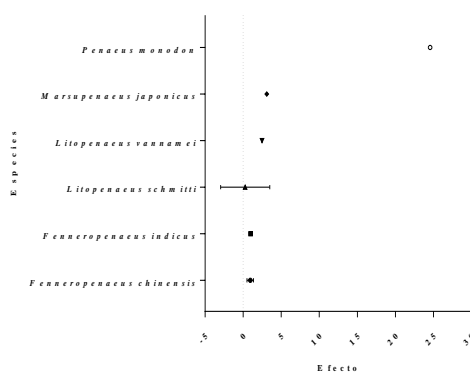
Fig. 6. Efecto del género de probiótico en camarones peneidos. A: actividad de fenoloxidasa y B: expresión de genes (profenoloxidasa). Los puntos representan el valor estimado (diferencia en medias estandarizada) y un índice de confianza del 95 %.

A

B

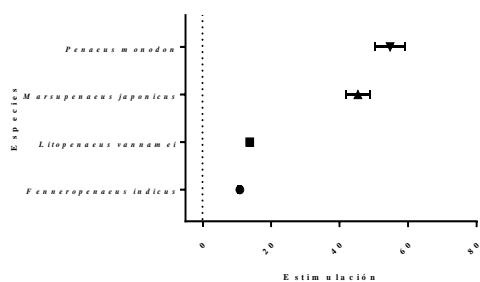
El género *Bacillus* presenta una mayor estimulación de la expresión de genes (Fig. 6 B). La presencia de *B. subtilis* en la dieta del camarón incrementa la resistencia a enfermedades del patógeno bacteriano *V. alginolyticus* y la respuesta inmune (Sandeepa & Ammani, 2017). Luego le siguen los *Lactobacillus* sp. con una estimulación enzimática favorable, pues los probióticos constituyen estimulantes efectivos del sistema proPO en acuicultura ((Laranja et al., 2017))

Se evidencia el efecto que tienen los inmunostimulantes sobre las distintas especies de camarones peneidos *Penaeus monodon* Fig. 7) presenta una mejor estimulación de la actividad enzimática y de expresión de genes, con respecto a las demás especies (Fig. 7 A y B). En *Litopenaeus schmitti* la fenoloxidasa se comportó similar al control, por lo que no tuvo una estimulación significativa.



A

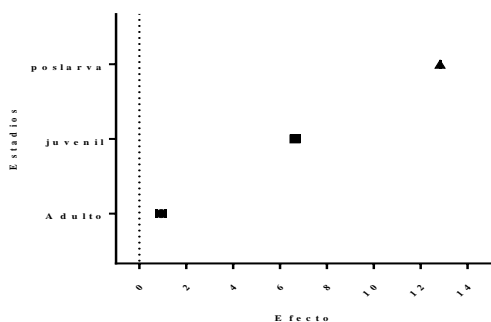




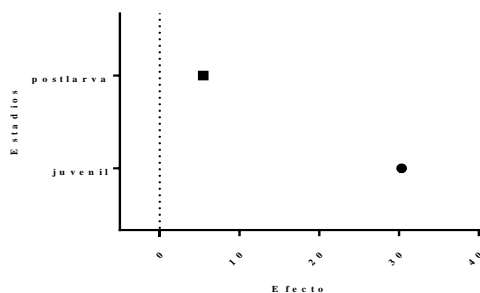
**B**

Fig. 7. Efecto de la suplementación de prebióticos y probióticos en la actividad de fenoloxidasa en el tipo de especie en camarones peneidos. A: actividad de fenoloxidasa y B: expresión de genes (profenoloxidasa). Los puntos representan el efecto estimado (diferencia en medias estandarizada) y un índice de confianza del 95 %.

En general se detecta estimulación de la actividad de fenoloxidasa con la suplementación de prebióticos y probióticos (Fig. 8A) en los estadios postlarva, juvenil y adultos, aunque esta fue mayor en poslarva. Los estadios poslarva y juvenil tuvieron estimulación en la expresión de genes, aunque esta fue mayor en juvenil (Fig. 8B).



**A**



**B**

Fig. 8. Efecto de la suplementación de prebióticos y probióticos en los tipos de estadios en camarones peneidos. A: actividad de fenoloxidasa y B: expresión de genes (profenoloxidasa). Los puntos representan el efecto estimado (diferencia en medias estandarizada) y un índice de confianza del 95 %.

El efecto que tienen los inmunoestimulantes sobre los tipos de tejidos en camarones peneidos se muestra en la fig. 9. El tejido hepatopancreático tuvo una mayor estimulación de la actividad fenoloxidasa con respecto a la hemolinfa (Fig. 9A). Sin embargo, la

hemolinfa tuvo una mayor estimulación de la profenoloxidasa con respecto al tejido hepatopancreático (Fig. 9B). Aunque la respuesta inmunológica se verifica fundamentalmente en hemolinfa, sin duda en larvas es necesario tomar el individuo completo. No obstante, se conoce que la actividad fenoloxidasa puede expresarse en varios tejidos o tener infiltraciones de hemocitos que contribuyan a la actividad enzimática (Braga et al., 2018).

**A B**

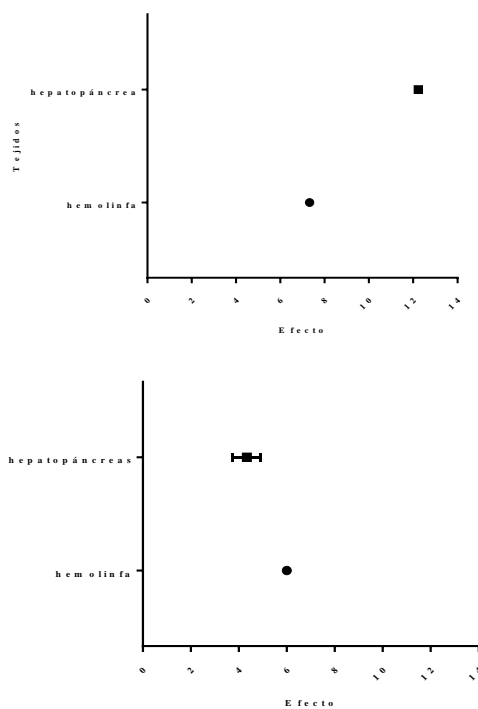


Fig. 9. Efecto de la suplementación de prebióticos y probióticos en los tipos de tejidos en camarones peneidos. A: actividad de fenoloxidasa y B: expresión de genes (profenoloxidasa). Los puntos representan el efecto estimado (diferencia en medias estandarizada) y un índice de confianza del 95 %.

Los tanques de plásticos tuvieron una mayor estimulación de la fenoloxidasa (Fig. 10 A), mientras que los de tierra carecieron de estimulación. En expresión de genes los tanques de cemento tuvieron una mayor estimulación, mientras que los de plástico fue mínima (Fig. 10 B).

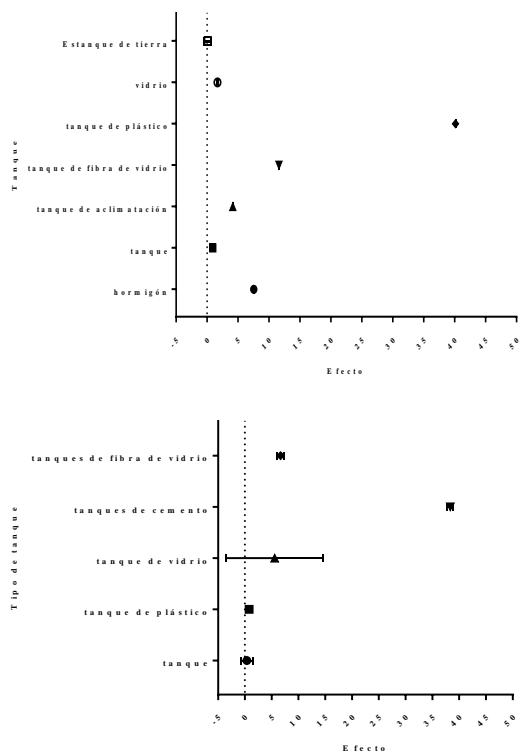


Fig. 10. Efecto de la suplementación de prebióticos y probióticos en los tipos de tanques en camarones peneidos. A: actividad de fenoloxidasa y B: expresión de genes (profenoloxidasas). Los puntos representan el efecto estimado (diferencia en medias estandarizada) y un índice de confianza del 95 %.

**Análisis adicionales**

La mayoría de los estudios fueron bajos en todos los aspectos de la herramienta Cochrane examinados para la evaluación de riesgo de sesgo excepto por el sesgo de publicación y el sesgo por reporte múltiple. El sesgo de publicación se consideró de alto riesgo de sesgo aquellos estudios que reportaban efectos positivos en favor de la administración de ellos.

**Discusión**

Varios autores confirman los efectos beneficiosos de los probióticos (Zorriehzahra et al., 2016) y prebióticos (Dawood et al., 2018) en la acuicultura. El empleo de la inmunoprofilaxis es también propuesta como la mejor alternativa para la protección frente a las enfermedades bacterianas en camarones (Ajadi et al., 2016), de la misma forma fue también propuesto como profiláctico para los virus y los hongos (Sivasankar et al., 2017).

Se pudo comprobar mediante el meta-análisis que tanto la actividad de fenoloxidasa como la expresión de genes se estimulan con la suplementación de los inmunoestimulantes en camarones peneidos. La proenzima presentó un mayor efecto con respecto a la enzima, esto se debe a que el ADN se replica, se transcribe a ARN, que es la expresión, para después

traducirse, o sea convertirse de ARN a proteína. Puede ocurrir que exista una estimulación alta de expresión de genes, pero no se traduzca, y por lo tanto no se llega a convertir en proteína. Además, el método de detección de ARN es por rt-PCR en tiempo real, (reverse transcriptase Polymerase Chain Reaction in Real Time), con mayor sensibilidad porque es fluorométrico y el de proteína es un método colorimétrico.

Inulina es el nombre con el que se designa a una familia de glúcidos complejos (polisacáridos), compuestos de cadenas moleculares de fructosa (Lara-Fiallos et al., 2017). La administración de dietas con prebióticos (inulinas) tiene un efecto estimulante en la respuesta inmune y la resistencia a patógenos de animales acuáticos (Li et al., 2018; Luna-González et al., 2012). Otros polisacáridos y moléculas como el ácido succínico, la formalina, minerales, nucleótidos, β-glucanos también estimularon la expresión de fenoloxidasa (Bai et al., 2010; Bui et al., 2017; Duan et al., 2018; Immanuel et al., 2012; Kitikiew et al., 2013; Lamela et al., 2008; Manoppo et al., 2010). Además, los polisacáridos pueden estimular la expresión de fenoloxidasa, incluso cuando los animales están en estrés (Wongsasak et al., 2015). Aunque hay informes de más estimulación con la célula completa comparado con el polisacárido puro (Sajeevan et al., 2009).

La ferritina también tuvo la capacidad de estimular la actividad de fenoloxidasa (Ruan et al., 2010). Un glucano de *Acremonium diospyri* tuvo alta capacidad inmunoestimulante en *Feneropenaeus indicus* (Anas et al., 2009). La catequina del té verde redujo la infección de *Vibrio alginolyticus*, fundamentalmente a través de la expresión de proPO (Wang et al., 2018).

La administración de *Gracilaria tenuistipitata* o *Platymonas helgolandica* a *L. vannamei* estimuló la expresión de ProPO y aumentó la resistencia a *Vibrio harveyi* o *algynoliticus* (Ge et al., 2017; Liu et al., 2019). Otras dos especies de este género (*Gracilaria verrucosa* y *Gracilaria tenuistipitata*) estimularon la actividad de fenoloxidasa y permitió que los camarones resistieran más el desafío con el virus de la mancha blanca y el *Vibrio alginoliticus* (Yeh et al., 2010; Yeh & Chen, 2009; Zahra et al., 2017). El extracto de otras algas marinas (*Sargassum siliquosum*, *Undaria pinnatifida* y *Sargassum filipendula*, *Ulva*) administrado en la dieta incrementaron la actividad de fenoloxidasa (Declarador et al., 2014; Schleder et al., 2017; Yudiati et al., 2016).

Existe una mayor estimulación en los probióticos, tanto de la expresión de la proenzima como de la enzima, esto puede ser consecuencia de que las bacterias tienen diferentes moléculas que estimulan la

fenoloxidasas como péptidoglicano, membrana lipídica entre otras (Vaseeharan et al., 2016). Sin embargo, los polisacáridos presentan una sola vía de estimulación de la cascada (Chen et al., 2016), aunque puede ser muy eficaz según la fuente que provengan los polisacáridos (Phupet et al., 2018; Solidum et al., 2016; Yeh & Chen, 2008). Recientemente, se incrementó el empleo de los fructooligosacáridos de cadena corta (FOS) por sus propiedades prebióticas en camarones, pero sin embargo aún no existen análisis referentes a estimular la actividad enzimática durante la dieta (Hu et al., 2019). Otro carbohidrato, trealosa, incrementó el peso corporal y estimuló la actividad de fenoloxidasas (Zhu et al., 2018).

Por otra parte, es interesante que la combinación de probióticos y prebióticos sea menor que los grupos por separados. Puede ser que la combinación provoque un mal funcionamiento de la activación del sistema de profenoloxidasas. Sin embargo, varios autores indican que el empleo de la combinación como simbióticos (probióticos y prebióticos) puede ayudar a disminuir el impacto del consumo de nutrientes por los probióticos en el intestino de los camarones (Huynh et al., 2018), y favorecer la colonización del intestino por *Lactobacillus* y disminución del contenido de especies de *Vibrio* (Huynh et al., 2019). No obstante, el mayor impacto de los simbióticos se refiere a la protección del hospedero frente a agentes infecciosos; a través de estimulación de la melanización en hemocitos (Huynh et al., 2019).

Los extractos de plantas, fundamentalmente las algas marinas tienen una mayor estimulación. La administración de algas basadas en la dieta produce un aumento de los mecanismos de defensa no específico y una reducción de la infección de WSSV en camarón (Niu et al., 2018). A continuación, le sigue la tripsina con un efecto positivo en la actividad enzimática. Esto puede deberse a que la tripsina es una enzima peptidasa, que rompe los enlaces peptídicos de las proteínas mediante hidrólisis para formar péptidos de menor tamaño y aminoácidos. La misma tiene un papel esencial en la digestión, pues es necesaria para el proceso de absorción de las proteínas presentes en la dieta del camarón (Omont et al., 2018).

La inclusión en la dieta de *Yucca schidigera* estimula el crecimiento y la actividad fenoloxidasas (Yang et al., 2015). Alto por ciento de inclusión de *Echinacea purpurea* y *Uncaria tomentosa*, estimuló la actividad fenoloxidasas (Medina-Beltrán et al., 2012). La planta medicinal *Solanum nigrum* estimuló el sistema inmune en *Penaes monodon*, permitiéndole resistir el desafío de *Vibrio harveyi* (Harikrishnan et al., 2011).

Una tendencia en la suplementación de dietas de camarón es la adición de ácidos orgánicos (Romano et al., 2015); sin embargo, los resultados no reflejaron la mayor actividad de fenoloxidasas para este grupo. Se conoce que los ácidos orgánicos no solo mejoran la velocidad de crecimiento, el establecimiento de la microbiota; sino también la respuesta inmune y como consecuencia la resistencia a la infestación de patógenos (He et al., 2017; Pourmozaffar et al., 2017). Por otra parte, se conoce que la combinación con probióticos puede tener un efecto sinérgico en la inhibición de cepas patógenas (Bolívar et al., 2018).

En el caso de los extractos de plantas el objetivo fundamental es que los extractos pudieran reducir la carga de posibles patógenos (Dineshkumar et al., 2017). No obstante, se describen otras funciones entre ellas la inmunoestimulación e incluso la reducción de la carga viral (Palanikumar et al., 2018; Wu et al., 2015). La estimulación de la fenoloxidasas la detectaron en *Penaes monodon* (Yogeeswaran et al., 2012), en *Litopenaes vannamei* (Hsieh et al., 2008; Yeh et al., 2009) y *Fenneropenaes chinensis* (Huang et al., 2006).

En la búsqueda de probióticos para camarones, la primera tendencia fue usar aquellos géneros que ya habían funcionado para organismos terrestres (De et al., 2018; Li et al., 2008; Liu et al., 2014; Mingmongkolchai & Panbangred, 2018). El género *Bacillus* presenta una mayor estimulación de la actividad de fenoloxidasas (Fig. 6 A). Está descrito que la combinación de cepas permite una mayor estimulación del sistema inmune (Sapcharoen & Rengpipat, 2013; Wang & Gu, 2010; Zhang et al., 2011). Aunque varios aislados se refieren a *Bacillus cereus*, el cual se conoce de su posible toxicidad en humanos, ninguno informa sobre toxicidad en camarones peneidos (Bernal et al., 2017; Chandran et al., 2014; Chandran et al., 2017).

Se conoce que el uso de *Bacillus* sp. previene enfermedades y la protección por la activación, tanto celular como humoral de la defensa inmune del camarón (Fu et al., 2010; Pham et al., 2017; Tseng et al., 2009). Luego le siguen los *Lactobacillus* sp. con una estimulación enzimática favorable, pues los probióticos constituyen estimulantes efectivos en acuicultura (Laranja et al., 2017). No obstante, los resultados en supervivencia, crecimiento y factor de conversión indican que la combinación de diferentes cepas es mejor que probióticos monoespecies (Toledo et al., 2019).

*Penaes monodon* fue la especie de mayor estimulación enzimática, quizás como esta especie tiene una velocidad de crecimiento alta (Li et al., 2016) necesita desarrollar una respuesta inmunológica rápida, que les permita defenderse ante el ataque de los patógenos. *L. schmitti* es una de las especies menos domesticada, en este caso solo se



incluyó un experimento que cumplía los requisitos de selección; lo cual puede ser un sesgo en la interpretación de la estimulación en diferentes especies (Rodríguez-Ramos et al., 2008).

En la ontogenia de los camarones está descrita que el comportamiento de fenoloxidasa varía según los estadios (Martín et al., 2012). Sin embargo, pocos estudios se realizan en estadios larvales del camarón (Franco et al., 2016; Franco et al., 2017), donde se detectó estimulación con el empleo de los inmunoestimulantes.

En el caso de los adultos la actividad fenoloxidasa puede detectarse tanto en el plasma como en los hemocitos. El sistema de pro-fenoloxidasa generalmente se activa con señales que emiten patógenos o agentes extraños y que permiten que los hemocitos puedan desarrollar el proceso de melanización (Tassanakajon et al., 2018). Pudiera ocurrir que el proceso de activación del sistema esté dado en varios tejidos al mismo tiempo, por lo que puede detectarse mayor actividad en poslarvas (Noothuan et al., 2017). Está descrito que la mayor fuente de reservas de profenoloxidasa son los hemocitos, y que se encuentra envuelta en la repuesta inflamatoria (Manilal et al., 2009). Tanto los probióticos como los prebióticos pueden estimular la activación y liberación de la profenoloxidasa de los hemocitos (Huynh et al., 2018).

Los resultados positivos con la actividad enzimática en los tanques plásticos coinciden con observaciones en la supervivencia de camarones *Penaeus*, donde en estanques de tierra el impacto de los probióticos es menor (Toledo et al., 2019). La consecuencia de estos resultados puede estar dada en que el microbiota de los estanques es más difícil de controlar. En los estanques de tierra pueden formarse películas de microorganismos o agregados de microorganismos que también estimulen el sistema inmune; estrategia que se emplea en los cultivos intensivos actuales para estimular el sistema inmune y mejorar la supervivencia de los camarones (Panigrahi et al., 2019).

La transferencia de genes es una herramienta poderosa para estimular caracteres deseados en camarones penaeidos (Arenal et al., 2008). En *Penaeus monodon*, la transferencia de genes antivirales estimuló la actividad fenoloxidasa (Parenregi et al., 2014).

## Conclusiones

La literatura científica relacionada con fenoloxidasa en camarones *Penaeus* indica, que se debe evaluar con cuidado debido al diseño experimental y la forma en la que se expresan los resultados. La suplementación de prebióticos y probióticos en

camarones penaeidos estimula tanto la actividad enzimática fenoloxidasa como la expresión de genes, con mayor sensibilidad a nivel de la transcripción, lo que sugiere procesos postranscripcionales que determinan la diferencia. Los ensayos necesitan de una validación en estanques de tierra, ya que las conclusiones se basan en experimentos que no tiene en cuenta el microbiota del ecosistema de los estanques de tierra.

## Contribución de los autores

Yailén de la Caridad Valdes Vaillant: planeación de la investigación, extracción de los datos, cálculo del efecto del tamaño, análisis de resultados, redacción del artículo, revisión y aprobación final del manuscrito.

Juliet Mejías Palmero: planeación de la investigación extracción de los datos, cálculo del efecto del tamaño, análisis de resultados, redacción del artículo, revisión y aprobación final del manuscrito.

Yulaine Corrales Barrios: planeación de la investigación, análisis de resultados, redacción del artículo, revisión y aprobación final del manuscrito.

Marileyxis Regla López Rodríguez: planeación de la investigación, extracción de los resultados, análisis de resultados, revisión y aprobación final del manuscrito.

Taimy Hernández Sariago: planeación de la investigación, extracción de los resultados, análisis de resultados, revisión y aprobación final del manuscrito.

Amilcar Arenal Cruz: planeación de la investigación, análisis de resultados, procesamiento estadístico redacción del artículo, revisión planeación de la investigación, extracción de los resultados, análisis de resultados, revisión y aprobación final del manuscrito.

Peter Bossier: planeación de la investigación, análisis de resultados, redacción del artículo, revisión planeación de la investigación, extracción de los resultados, análisis de resultados, revisión y aprobación final del manuscrito.

## Conflictos de interés

No se declaran.

## Agradecimientos

A todas las personas que apoyaron la realización del presente artículo, con entrega y dedicación y al proyecto VLIR-USO (CU2018TEA456A103) “Estimulación transgeneracional en camarones”

## Referencias

- Ajadi, A., Sabri, M., Dauda, A. B., Ina-Salwany, M., & Hasliza, A. (2016). Immunoprophylaxis: A better alternative protective measure against shrimp vibriosis—a review. *PJSSR*, 2(2), 58-69. Recuperado el 10 de diciembre se 2019, de: [https://www.researchgate.net/profile/Akeem-Dauda/publication/304134799\\_PJSRR\\_2016\\_22\\_58-69\\_Immunoprophylaxis\\_A\\_Better\\_Alternative\\_Protective\\_Measure\\_against\\_Shrimp\\_Vibriosis\\_-\\_A\\_Review/links/57679af508aeb4b998098ae8.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Akeem-Dauda/publication/304134799_PJSRR_2016_22_58-69_Immunoprophylaxis_A_Better_Alternative_Protective_Measure_against_Shrimp_Vibriosis_-_A_Review/links/57679af508aeb4b998098ae8.pdf)
- Anas, A., Lowman, D. W., Williams, D. L., Millen, S., Pai, S. S., Sajeevan, T. P., . . . Singh, I.S.B. (2009). Alkali insoluble glucan extracted from *Acremonium diospyri* is a more potent immunostimulant in the Indian White Shrimp, *Fenneropenaeus indicus* than alkali soluble glucan. *Aquaculture Research*, 40(11), 1320-1327, doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02231.x>
- Arenal, A., Pimentel, R., Pimentel, E., Martín, L., Santiesteban, D., Franco, R., & Aleström, P. (2008). Growth enhancement of shrimp (*Litopenaeus schmitti*) after transfer of tilapia growth hormone gene. *Biotechnology letters*, 30(5), 845-851, doi: <https://doi.org/10.1007/s10529-008-9636-2>
- Bai, N., Zhang, W., Mai, K., Wang, X., Xu, W., & Ma, H. (2010). Effects of discontinuous administration of  $\beta$ -glucan and glycyrrhizin on the growth and immunity of white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 306(1-4), 218-224, doi: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.06.017>
- Bernal, M. G., Marrero, R. M., Campa-Córdova, Á. I., & Mazón-Suástegui, J. M. (2017). Probiotic effect of *Streptomyces* strains alone or in combination with *Bacillus* and *Lactobacillus* in juveniles of the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture international*, 25(2), 927-939. doi: <https://doi.org/10.1007/s10499-016-0085-y>
- Bolivar, N. C., Legarda, E. C., Seiffert, W. Q., Andreatta, E. R., & Vieira, F. d. N. (2018). Combining a probiotic with organic salts presents synergistic *in vitro* inhibition against aquaculture bacterial pathogens. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 61, doi: <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2018160694>
- Braga, A., Lopes, D., Magalhães, V., Klosterhoff, M. C., Romano, L. A., Poersch, L. H., & Wasielesky, W. (2018). Hemocytic melanization in shrimp spermatophores. *Aquaculture*, 486, 64-67, doi: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.12.018>
- Bui, H.T.D., Khosravi, S., Lee, C., Kim, M.-G., Lim, S.-J., Shin, C.-H., . . . Lee, K.-J. (2017). Supplemental Effects of AAMC, an Anionic Alkali Mineral Complex, in Diets for Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *The Israeli Journal of Aquaculture -Bamidgeh*, 69. Recuperado el 10 de diciembre se 2019, de: <http://hdl.handle.net/10524/57039>
- Chandran, M. N., Iyapparaj, P., Moovendhan, S., Ramasubburayan, R., Prakash, S., Immanuel, G., & Palavesam, A. (2014). Influence of probiotic bacterium *Bacillus cereus* isolated from the gut of wild shrimp *Penaeus monodon* in turn as a potent growth promoter and immune enhancer in *P. monodon*. *Fish & shellfish immunology*, 36(1), 38-45, doi: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.10.004>
- Chandran, M. N., Suganya, A. M., Immanuel, G., & Palavesam, A. (2017). Immunomodulatory and Growth-Promoting Potential of Lowcost Probiotic Product in *Penaeus monodon* Culture System. *Croatian journal of fisheries*, 75(2), 58-66, doi: <https://doi.org/10.1515/cjf-2017-0009>
- Chang, Y.-H., Kumar, R., Ng, T. H., & Wang, H.-C. (2018). What vaccination studies tell us about immunological memory within the innate immune system of cultured shrimp and crayfish. *Developmental & Comparative Immunology*, 80, 53-66, doi: <https://doi.org/10.1016/j.dci.2017.03.003>
- Chen, Y.-Y., Chen, J.-C., Kuo, Y.-H., Lin, Y.-C., Chang, Y.-H., Gong, H.-Y., & Huang, C.-L. (2016). Lipopolysaccharide and  $\beta$ -1, 3-glucan-binding protein (LGBP) bind to seaweed polysaccharides and activate the prophenoloxidase system in white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Developmental & Comparative Immunology*, 55, 144-151, doi: <https://doi.org/10.1016/j.dci.2015.10.023>
- Chomwong, S., Charoensapsri, W., Amparyup, P., & Tassanakajon, A. (2018). Two host gut-derived lactic acid bacteria activate the proPO system and increase resistance to an AHPND-causing strain of *Vibrio parahaemolyticus* in the shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Developmental & Comparative Immunology*, 89, 54-65, doi: <https://doi.org/10.1016/j.dci.2018.08.002>
- Dawood, M. A., Koshio, S., & Esteban, M. Á. (2018). Beneficial roles of feed additives as immunostimulants in aquaculture: a review. *Reviews in Aquaculture*, 10(4), 950-974, doi: <https://doi.org/10.1111/raq.12209>
- De, D., Ananda Raja, R., Ghoshal, T. K., Mukherjee, S., & Vijayan, K. K. (2018). Evaluation of

- growth, feed utilization efficiency and immune parameters in tiger shrimp (*Penaeus monodon*) fed diets supplemented with or diet fermented with gut bacterium *Bacillus* sp. DDKRC1. isolated from gut of Asian seabass (*Lates calcarifer*). *Aquaculture Research*, 49(6), 2147-2155, doi: <https://doi.org/10.1111/are.13669>
- Declarador, R. S., Serrano Jr, A. E., & Corre Jr, V. L. (2014). Ulvan extract acts as immunostimulant against white spot syndrome virus (WSSV) in juvenile black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Aquaculture, Aquarium, Conservation & Legislation*, 7(3), 153-161. Recuperado el 9 de diciembre se 2019, de: <http://www.bioflux.com.ro/docs/2014.153-161.pdf>
- Dineshkumar, M., Kannappan, S., & Sivakumar, K. (2017). Effect of mangrove plant (*Sesuvium portulacastrum*) extract against *Vibrio harveyi* during shrimp larviculture. *Journal of Environmental Biology*, 38(1), 47-53, doi: <https://doi.org/10.5958/2349-2104.2015.00011.X>
- Duan, Y., Wang, Y., Zhang, J., Sun, Y., & Wang, J. (2018). Dietary effects of succinic acid on the growth, digestive enzymes, immune response and resistance to ammonia stress of *Litopenaeus vannamei*. *Fish & shellfish immunology*, 78, 10-17, doi: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.04.008>
- FAO. (2018). *The State of World Fisheries and Aquaculture 2018 - Meeting the sustainable development goals*. Recuperado el 6 de septiembre de 2019, de: [https://ec.europa.eu/knowledge4policy/publication/state-world-fisheries-aquaculture-2018\\_en](https://ec.europa.eu/knowledge4policy/publication/state-world-fisheries-aquaculture-2018_en)
- Franco, R., Arenal, A., Martín, L., Martínez, Y., Santiesteban, D., Sotolongo, J., . . . Bossier, P. (2016). *Psychrobacter* sp. 17-1 enhances growth and survival in early postlarvae of white shrimp, *Penaeus vannamei* Boone, 1931 (Decapoda, Penaeidae). *Crustaceana*, 89(13), 1467-1484, doi: <https://dx.doi.org/10.1163/15685403-00003595>
- Franco, R., Martín, L., Arenal, A., Santiesteban, D., Sotolongo, J., Cabrera, H., . . . Castillo, N. M. (2017). Evaluation of two probiotics used during farm production of white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda). *Aquaculture Research*, 48(4), 1936-1950. doi: <https://doi.org/10.1111/are.13031>
- Fu, L.-L., Shuai, J.-B., Xu, Z.-R., Li, J.-R., & Li, W.-F. (2010). Immune responses of *Fenneropenaeus chinensis* against white spot syndrome virus after oral delivery of VP28 using *Bacillus subtilis* as vehicles. *Fish & shellfish immunology*, 28(1), 49-55, doi: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2009.09.016>
- Ge, H., Li, J., Chen, P., Chang, Z., Shen, M., & Zhao, F. (2017). Cultivation of green algae *Platymonas helgolandica* in rearing water enhances the growth performance and resistance of *Litopenaeus vannamei* against *Vibrio parahaemolyticus* infection. *Aquaculture international*, 25(3), 1279-1290, doi: <https://doi.org/10.1007/s10499-017-0113-6>
- Harikrishnan, R., Balasundaram, C., Jawahar, S., & Heo, M.-S. (2011). *Solanum nigrum* enhancement of the immune response and disease resistance of tiger shrimp, *Penaeus monodon* against *Vibrio harveyi*. *Aquaculture*, 318(1-2), 67-73, doi: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.05.024>
- He, W., Rahimnejad, S., Wang, L., Song, K., Lu, K., & Zhang, C. (2017). Effects of organic acids and essential oils blend on growth, gut microbiota, immune response and disease resistance of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) against *Vibrio parahaemolyticus*. *Fish & shellfish immunology*, 70, 164-173, doi: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.09.007>
- Higgins, J. P. T., & Thompson, S. G. (2002). Quantifying heterogeneity in a meta-analysis. *Statistics in medicine*, 21(11), 1539-1558, doi: <https://doi.org/10.1002/sim.1186>
- Hsieh, T.-J., Wang, J.-C., Hu, C.-Y., Li, C.-T., Kuo, C.-M., & Hsieh, S.-L. (2008). Effects of rutin from *Toona sinensis* on the immune and physiological responses of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) under *Vibrio alginolyticus* challenge. *Fish & shellfish immunology*, 25(5), 581-588, doi: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2008.07.014>
- Hu, X., Yang, H. L., Yan, Y.Y., Zhang, C. X., Ye, J.d., Lu, K. L., . . . Sun, Y. Z. (2019). Effects of fructooligosaccharide on growth, immunity and intestinal microbiota of shrimp (*Litopenaeus vannamei*) fed diets with fish meal partially replaced by soybean meal. *Aquaculture Nutrition*, 25(1), 194-204, doi: <https://doi.org/10.1111/anu.12843>
- Huang, X., Zhou, H., & Zhang, H. (2006). The effect of *Sargassum fusiforme* polysaccharide extracts on vibriosis resistance and immune activity of the shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. *Fish & shellfish immunology*, 20(5), 750-757, doi: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2005.09.008>
- Huynh, T. G., Cheng, A.-C., Chi, C.-C., Chiu, K.-H., & Liu, C.-H. (2018). A synbiotic improves

- the immunity of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*: Metabolomic analysis reveal compelling evidence. *Fish & shellfish immunology*, 79, 284-293, doi: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.05.031>
- Huynh, T. G., Hu, S. Y., Chiu, C. S., Truong, Q. P., & Liu, C. H. (2019). Bacterial population in intestines of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* fed a synbiotic containing *Lactobacillus plantarum* and galactooligosaccharide. *Aquaculture Research*, 50(3), 807-817, doi: <https://doi.org/10.1111/are.13951>
- Immanuel, G., Sivagnanavelmurugan, M., Marudhupandi, T., Radhakrishnan, S., & Palavesam, A. (2012). The effect of fucoidan from brown seaweed *Sargassum wightii* on WSSV resistance and immune activity in shrimp *Penaeus monodon* (Fab). *Fish & shellfish immunology*, 32(4), 551-564, doi: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.01.003>
- Kitikiew, S., Chen, J.-C., Putra, D. F., Lin, Y.-C., Yeh, S.-T., & Liou, C.-H. (2013). Fucoidan effectively provokes the innate immunity of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against experimental *Vibrio alginolyticus* infection. *Fish & shellfish immunology*, 34(1), 280-290, doi: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.11.016>
- Lamela, R. E., Quintana, Y. C., Silveira Coffigny, R., Martínez, M., & Herrate, N. (2008). Effects of formalin on total haemocytes count and histopathological changes in the shrimp *Litopenaeus schmitti* (Pérez - Farfante & Kensley 1997). *Aquaculture Research*, 39(12), 1316-1321, doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2008.01997.x>
- Lara-Fiallos, M., Lara-Gordillo, P., Julián-Ricardo, M. C., Pérez-Martínez, A., & Benítez-Cortés, I. (2017). Avances en la producción de inulina. *Tecnología Química*, 37(2), 352-366. Recuperado el 8 de septiembre de 2019, de: <http://scielo.sld.cu/pdf/rtq/v37n2/rtq16217.pdf>
- Laranja, J. L. Q., Amar, E. C., Ludevese-Pascual, G. L., Niu, Y., Geaga, M. J., De Schryver, P., & Bossier, P. (2017). A probiotic *Bacillus* strain containing amorphous poly-beta-hydroxybutyrate (PHB) stimulates the innate immune response of *Penaeus monodon* postlarvae. *Fish & shellfish immunology*, 68, 202-210, doi: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.07.023>
- Li, J., Tan, B., Mai, K., Ai, Q., Zhang, W., Liufu, Z., & Xu, W. (2008). Immune responses and resistance against *Vibrio parahaemolyticus* induced by probiotic bacterium *Arthrobacter* XE - 7 in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 39(4), 477-489, doi: <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2008.00188.x>
- Li, Y. D., Jiang, S. G., Huang, J. H., Ma, Z. H., & Zhou, F. L. (2016). Growth and survival variations of *Penaeus monodon* from six breeding families. *International Journal of Aquaculture*, 5, 1-9 doi: <https://doi.org/10.5376/ija.2015.05.0039>
- Li, Y., Liu, H., Dai, X., Li, J., & Ding, F. (2018). Effects of dietary inulin and mannan oligosaccharide on immune related genes expression and disease resistance of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish & shellfish immunology*, 76, 78-92, doi: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.02.034>
- Liu, H., Li, Z., Tan, B., Lao, Y., Duan, Z., Sun, W., & Dong, X. (2014). Isolation of a putative probiotic strain S12 and its effect on growth performance, non-specific immunity and disease-resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish & shellfish immunology*, 41(2), 300-307, doi: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.08.028>
- Liu, P.-C., Lin, P.-W., Huang, C.-L., Hsu, C.-H., & Chen, J.-C. (2019). Long-term administration of diets containing *Gracilaria tenuistipitata* extract induce the expression of immune-related genes and increase the immune response and resistance against *Vibrio harveyi* in white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Gene Reports*, 15, 100378, doi: <https://doi.org/10.1016/j.genrep.2019.100378>
- Luna-González, A., Almaraz-Salas, J. C., Fierro-Coronado, J. A., del Carmen Flores-Miranda, M., González-Ocampo, H. A., & Peraza-Gómez, V. (2012). The prebiotic inulin increases the phenoloxidase activity and reduces the prevalence of WSSV in whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) cultured under laboratory conditions. *Aquaculture*, 362-363, 28-32, doi: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.07.022>
- Manilal, A., Sujith, S., Selvin, J., Kiran, G. S., & Shakir, C. (2009). In vivo antiviral activity of polysaccharide from the Indian green alga, *Acrosiphonia orientalis* (J. Agardh): potential implication in shrimp disease management. *World J. Fish Mar. Sci*, 1(4), 278-282, Recuperado 15 de noviembre de 2019, de: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.528.4010&rep=rep1&type=pdf>
- Manoppo, H., Sukenda, S., Djokosetiyanto, D., Sukadi, M. F., & Harris, E. (2010).



- Nonspecific immune response and resistance of *Litopenaeus vannamei* fed with nucleotide,  $\beta$ -glucan, and protagen diets. *Indonesian Aquaculture Journal*, 5(1), 37-44, doi: <http://dx.doi.org/10.15578/iaj.5.1.2010.37-44>
- Martín, L., Castillo, N. M., Arenal, A., Rodríguez, G., Franco, R., Santiesteban, D., . . . Cabrera, H. (2012). Ontogenetic changes of innate immune parameters from eggs to early postlarvae of white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda). *Aquaculture*, 358-359, 234-239, doi: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.05.005>
- Mastan, S. A. (2015). Use of immunostimulants in aquaculture disease management. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*, 2(4), 277-280. Recuperado el 6 de octubre de 2019, de: <http://www.fisheriesjournal.com/archives/2015/vol2issue4/PartF/2-4-59.pdf>
- Medina-Beltrán, V., Luna-González, A., Fierro-Coronado, J. A., Campa-Córdova, Á. I., Peraza-Gómez, V., Flores-Miranda, M. del C., & Gutiérrez Rivera, J. N. (2012). *Echinacea purpurea* and *Uncaria tomentosa* reduce the prevalence of WSSV in white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) cultured under laboratory conditions. *Aquaculture*, 358-359, 164-169, doi: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.06.030>
- Mingmongkolchai, S., & Panbangred, W. (2018). *Bacillus* probiotics: an alternative to antibiotics for livestock production. *Journal of applied microbiology*, 124(6), 1334-1346, doi: <https://doi.org/10.1111/jam.13690>
- Niu, J., Xie, S.-W., Fang, H.-H., Xie, J.-J., Guo, T.-Y., Zhang, Y.-M., . . . Liu, Y.-J. (2018). Dietary values of macroalgae *Porphyra haitanensis* in *Litopenaeus vannamei* under normal rearing and WSSV challenge conditions: Effect on growth, immune response and intestinal microbiota. *Fish & shellfish immunology*, 81, 135-149, doi: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.06.010>
- Noothuan, N., Amparyup, P., & Tassanakajon, A. (2017). Melanization inhibition protein of *Penaeus monodon* acts as a negative regulator of the prophenoloxidase-activating system. *Developmental & Comparative Immunology*, 72, 97-102, doi: <https://doi.org/10.1016/j.dci.2017.02.014>
- Omont, A., Quiroz-Guzman, E., Tovar-Ramirez, D., & Peña-Rodríguez, A. (2018). Effect of diets supplemented with different seaweed extracts on growth performance and digestive enzyme activities of juvenile white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Applied Phycology*, 31 1433-1442, doi: <https://doi.org/10.1007/s10811-018-1628-6>
- Palanikumar, P., Benitta, D. J. D., Lelin, C., Thirumalaikumar, E., Michaelbabu, M., & Citarasu, T. (2018). Effect of *Argemone mexicana* active principles on inhibiting viral multiplication and stimulating immune system in Pacific white leg shrimp *Litopenaeus vannamei* against white spot syndrome virus. *Fish & shellfish immunology*, 75, 243-252, doi: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.02.011>
- Panigrahi, A., Sundaram, M., Chakrapani, S., Rajasekar, S., Syama Dayal, J., & Chavali, G. (2019). Effect of carbon and nitrogen ratio (C: N) manipulation on the production performance and immunity of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) in a biofloc - based rearing system. *Aquaculture Research*, 50(1), 29-41, doi: <https://doi.org/10.1111/are.13857>
- Parentrengi, A., Tampangallo, B.R., & Tenriulo, A. (2014). Analysis of immune responses on transgenic tiger shrimp (*Penaeus monodon*) against pathogenic bacterium *Vibrio harveyi*. *Indonesian Aquaculture Journal*, 9(1), 23-32, doi: <http://dx.doi.org/10.15578/iaj.9.1.2014.23-32>
- Pham, K.-C., Tran, H. T. T., Van Doan, C., Le, P. H., Van Nguyen, A. T., Nguyen, H. A., . . . Phan, T. -N. (2017). Protection of *Penaeus monodon* against white spot syndrome by continuous oral administration of a low concentration of *Bacillus subtilis* spores expressing the VP 28 antigen. *Letters in applied microbiology*, 64(3), 184-191, doi: <https://doi.org/10.1111/lam.12708>
- Phupet, B., Pitakpornpreecha, T., Baowubon, N., Runsaeng, P., & Utarabhand, P. (2018). Lipopolysaccharide and  $\beta$ -1, 3-glucan-binding protein from *Litopenaeus vannamei*: Purification, cloning and contribution in shrimp defense immunity via phenoloxidase activation. *Developmental & Comparative Immunology*, 81, 167-179, doi: <https://doi.org/10.1016/j.dci.2017.11.016>
- Pourmozaffar, S., Hajimoradloo, A., & Miandare, H.K. (2017). Dietary effect of apple cider vinegar and propionic acid on immune related transcriptional responses and growth performance in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish & shellfish immunology*, 60, 65-71, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2016.11.030>
- Rodríguez-Ramos, T., Espinosa, G., Hernández-López, J., Gollas-Galván, T., Marrero, J., Borrell, Y., . . . Alonso, M. (2008). Effects



- of *Echerichia coli* lipopolysaccharides and dissolved ammonia on immune response in southern white shrimp *Litopenaeus schmitti*. *Aquaculture*, 274(1), 118-125, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.10.049>
- Romano, N., Koh, C.-B., & Ng, W.-K. (2015). Dietary microencapsulated organic acids blend enhances growth, phosphorus utilization, immune response, hepatopancreatic integrity and resistance against *Vibrio harveyi* in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 435, 228-236, doi: <https://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.09.037>
- Ruan, Y.-H., Kuo, C.-M., Lo, C.-F., Lee, M.-H., Lian, J.-L., & Hsieh, S.-L. (2010). Ferritin administration effectively enhances immunity, physiological responses, and survival of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) challenged with white spot syndrome virus. *Fish & shellfish immunology*, 28(4), 542-548, doi: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2009.12.013>
- Sajeewan, T. P., Lowman, D. W., Williams, D. L., Selven, S., Anas, A., & Rosamma, P. (2009). Marine yeast diet confers better protection than its cell wall component (1 - 3) -  $\beta$  - d - glucan as an immunostimulant in *Fenneropenaeus indicus*. *Aquaculture Research*, 40(15), 1723-1730, doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02275.x>
- Sandeepa, G. M., & Ammani, K. (2017). Immunological and Antioxidant Response of *Litopenaeus vannamei* fed with *Lactobacillus* species under WSSV challenge. *Current Trends in Biotechnology & Pharmacy*, 11(1), 43-52. Recuperado el 6 de octubre de 2019, de: [http://abap.co.in/sites/default/files/Paper-5\\_25.pdf](http://abap.co.in/sites/default/files/Paper-5_25.pdf)
- Sapcharoen, P., & Rengpipat, S. (2013). Effects of the probiotic *Bacillus subtilis* (BP 11 and BS 11) on the growth and survival of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Nutrition*, 19(6), 946-954, doi: <https://doi.org/10.1111/anu.12040>
- Schleder, D. D., Da Rosa, J. R., Guimarães, A. M., Ramlov, F., Maraschin, M., Seiffert, W.Q., . . . Andreatta, E.R. (2017). Brown seaweeds as feed additive for white-leg shrimp: effects on thermal stress resistance, midgut microbiology, and immunology. *Journal of Applied Phycology*, 29(5), 2471-2477, doi: <https://doi.org/10.1007/s10811-017-1129-z>
- Sivasankar, P., John, K.R., George, M.R., Anushalini, S., Kaviarasu, D., & Petchimuthu, M. (2017). Prophylactics in shrimp aquaculture health management: A review. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 5(4), 1049-1055. Recuperado el 4 de noviembre de 2019, de: <http://www.entomoljournal.com/archives/2017/vol5issue4/PartN/5-4-20-100.pdf>
- Solidum, N. S., Sanares, R. C., Andriano-Felarca, K. G. S., & Corre Jr, V. L. (2016). Immune responses and resistance to vibriosis of juvenile Pacific whiteleg shrimp *Penaeus vannamei* fed with high dose mannan oligosaccharide and  $\beta$ -glucan. *AACL Bioflux*, 9(2), 239-249. Recuperado el 4 de noviembre de 2019, de: <http://www.bioflux.com.ro/docs/2016.239-249.pdf>
- Tassanakajon, A., Rimphanitchayakit, V., Visetnan, S., Amparyup, P., Somboonwivat, K., Charoensapsri, W., & Tang, S. (2018). Shrimp humoral responses against pathogens: antimicrobial peptides and melanization. *Developmental & Comparative Immunology*, 80, 81-93, doi: <https://doi.org/10.1016/j.dci.2017.05.009>
- Tikito, I., & Souissi, N. (2019). Meta-analysis of Systematic Literature Review Methods. *International Journal of Modern Education and Computer Science*, 11(2), 17-25, doi: <https://doi.org/10.5815/ijmecs.2019.02.03>
- Toledo, A., Frizzo, L., Signorini, M., Bossier, P., & Arenal, A. (2019). Impact of probiotics on growth performance and shrimp survival: A meta-analysis. *Aquaculture*, 500, 196-205, doi: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.10.018>
- Tseng, D.-Y., Ho, P.-L., Huang, S.-Y., Cheng, S.-C., Shiu, Y.-L., Chiu, C.-S., & Liu, C.-H. (2009). Enhancement of immunity and disease resistance in the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, by the probiotic, *Bacillus subtilis* E20. *Fish & shellfish immunology*, 26(2), 339-344, doi: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2008.12.003>
- Van Assen, M. A. L. M., van Aert, R. C. M., & Wicherts, J. M. (2015). Meta-analysis using effect size distributions of only statistically significant studies. *Psychological methods*, 20(3), 293-309, doi: <https://doi.org/10.1037/met0000025>
- Vaseeharan, B., Ishwarya, R., Malaikozhundan, B., Selvaraj, D., & Chen, J.-C. (2016). Phenoloxidase an Important Constituent in Crustacean Immune System—A Review. *J. Fish. Soc. Taiwan*, 43(3), 217-227, doi: [https://doi.org/10.29822/JFST.201609\\_43\(3\)\\_0008](https://doi.org/10.29822/JFST.201609_43(3)_0008)
- Vaseeharan, B., & Thaya, R. (2014). Medicinal plant derivatives as immunostimulants: an alternative to chemotherapeutics and

- antibiotics in aquaculture. *Aquaculture international*, 22(3), 1079-1091, doi: <https://doi.org/10.1007/s10499-013-9729-3>
- Wang, Y., & Gu, Q. (2010). Effect of probiotics on white shrimp (*Penaeus vannamei*) growth performance and immune response. *Marine Biology Research*, 6(3), 327-332, doi: <https://doi.org/10.1080/17451000903300893>
- Wang, Z., Sun, B., & Zhu, F. (2018). Epigallocatechin-3-gallate protects Kuruma shrimp *Marsupeneaus japonicus* from white spot syndrome virus and *Vibrio alginolyticus*. *Fish & shellfish immunology*, 78, 1-9, doi: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.04.021>
- Wongsasak, U., Chaijamrus, S., Kumkhong, S., & Boonanuntanasarn, S. (2015). Effects of dietary supplementation with  $\beta$ -glucan and synbiotics on immune gene expression and immune parameters under ammonia stress in Pacific white shrimp. *Aquaculture*, 436, 179-187, doi: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.10.028>
- Wu, C.-C., Chang, Y.-P., Wang, J.-J., Liu, C.-H., Wong, S.-L., Jiang, C.-M., & Hsieh, S.-L. (2015). Dietary administration of *Gynura bicolor* (Roxb. Willd.) DC water extract enhances immune response and survival rate against *Vibrio alginolyticus* and white spot syndrome virus in white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish & shellfish immunology*, 42(1), 25-33. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.10.016>
- Yang, Q.-h., Tan, B.-p., Dong, X.-h., Chi, S.-y., & Liu, H.-y. (2015). Effects of different levels of *Yucca schidigera* extract on the growth and nonspecific immunity of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) and on culture water quality. *Aquaculture*, 439, 39-44, doi: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.11.029>
- Yeh, M.-S., Lai, C.-Y., Liu, C.-H., Kuo, C.-M., & Cheng, W. (2009). A second proPO present in white shrimp *Litopenaeus vannamei* and expression of the proPOs during a *Vibrio alginolyticus* injection, molt stage, and oral sodium alginate ingestion. *Fish & shellfish immunology*, 26(1), 49-55, doi: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2008.10.003>
- Yeh, S.-T., & Chen, J.-C. (2008). Immunomodulation by carrageenans in the white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. *Aquaculture*, 276(1-4), 22-28, doi: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.01.034>
- Yeh, S.-T., Li, C.-C., Tsui, W.-C., Lin, Y.-C., & Chen, J.-C. (2010). The protective immunity of white shrimp *Litopenaeus vannamei* that had been immersed in the hot-water extract of *Gracilaria tenuistipitata* and subjected to combined stresses of *Vibrio alginolyticus* injection and temperature change. *Fish & shellfish immunology*, 29(2), 271-278, doi: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.04.014>
- Yeh, S.-T., & Chen, J.-C. (2009). White shrimp *Litopenaeus vannamei* that received the hot-water extract of *Gracilaria tenuistipitata* showed earlier recovery in immunity after a *Vibrio alginolyticus* injection. *Fish & shellfish immunology*, 26(5), 724-730, doi: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2009.02.025>
- Yogeswaran, A., Velmurugan, S., Punitha, S. M. J., Babu, M. M., Selvaraj, T., Kumaran, T., & Citarasu, T. (2012). Protection of *Penaeus monodon* against white spot syndrome virus by inactivated vaccine with herbal immunostimulants. *Fish & shellfish immunology*, 32(6), 1058-1067, doi: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.02.029>
- Yudiati, E., Isnansetyo, A., Murwantoko, M., Ayuningtyas, Triyanto & Handayani, C.R. (2016). Innate immune-stimulating and immune genes up-regulating activities of three types of alginate from *Sargassum siliquosum* in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish & shellfish immunology*, 54, 46-53, doi: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.03.022>
- Zahra, A., Sukenda, S., & Wahjuningrum, D. (2017). Extract of seaweed *Gracilaria verrucosa* as immunostimulant to controlling white spot disease in Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Jurnal Akuakultur Indonesia*, 16(2), 174-183, doi: <https://doi.org/10.19027/jai.16.2.174-183>
- Zhang, Q., Tan, B., Mai, K., Zhang, W., Ma, H., Ai, Q., . . . Liufu, Z. (2011). Dietary administration of *Bacillus* (*B. licheniformis* and *B. subtilis*) and isomaltooligosaccharide influences the intestinal microflora, immunological parameters and resistance against *Vibrio alginolyticus* in shrimp, *Penaeus japonicus* (Decapoda: Penaeidae). *Aquaculture Research*, 42(7), 943-952, doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2010.02677.x>
- Zhu, M., Long, X., & Wu, S. (2018). Effects of dietary trehalose on the growth performance and nonspecific immunity of white shrimps (*Litopenaeus vannamei*). *Fish & shellfish immunology*, 78, 127-130, doi: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.04.035>
- Zorriehzahra, M. J., Delshad, S. T., Adel, M., Tiwari, R., Karthik, K., Dhama, K., & Lazado, C.C. (2016). Probiotics as beneficial microbes in aquaculture: an update on their multiple modes of action: a review. *Veterinary*

