

## Accepted Manuscript / Manuscrito Aceptado

Title Paper/Título del artículo:

**Cambios preliminares en la respuesta humoral y celular del camarón *Litopenaeus vannamei* durante la aclimatación a diferente salinidad**

**Preliminary changes in the humoral and cellular response of shrimp *Litopenaeus vannamei* during the acclimatization to different salinity**

Authors/Autores: Hernández-Mendoza E.G., López Sánchez, J. A., González Hermoso, J.P., Pacheco Vega J.M., Bautista-Covarrubias J.C.

ID: e1673

DOI: <https://doi.org/10.15741/revbio.11.e1673>

Received/Fecha de recepción: May 14<sup>th</sup> 2024

Accepted /Fecha de aceptación: October 23<sup>th</sup> 2024

Available online/Fecha de publicación: November 13<sup>th</sup> 2024

Please cite this article as/Como citar este artículo: Hernández-Mendoza E.G., López Sánchez, J. A., González Hermoso, J.P., Pacheco Vega J.M., Bautista-Covarrubias J.C. (2024). Preliminary changes in the humoral and cellular response of shrimp *Litopenaeus vannamei* during the acclimatization to different salinity. *Revista Bio Ciencias*, 11, e1673. <https://doi.org/10.15741/revbio.11.e1673>

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

Este archivo PDF es un manuscrito no editado que ha sido aceptado para publicación. Esto es parte de un servicio de Revista Bio Ciencias para proveer a los autores de una versión rápida del manuscrito. Sin embargo, el manuscrito ingresará a proceso de edición y corrección de estilo antes de publicar la versión final. Por favor note que la versión actual puede contener errores de forma.






Artículo original

## Cambios preliminares en la respuesta humoral y celular del camarón *Litopenaeus vannamei* durante la aclimatación a diferente salinidad

### Preliminary changes in the humoral and cellular response of shrimp *Litopenaeus vannamei* during the acclimatization to different salinity

Respuesta del camarón a la salinidad/

Shrimp response to salinity

Hernández-Mendoza E.G.<sup>1</sup> (<https://orcid.org/0000-0001-9368-7662> ) , López Sánchez, J. A.<sup>2</sup> (<https://orcid.org/0000-0002-1414-2427> ) , González Hermoso, J.P.<sup>2</sup> (<https://orcid.org/0000-0001-9175-178X> ) , Pacheco Vega J.M.<sup>2</sup> (<https://orcid.org/0000-0001-9443-6849> ) , Bautista-Covarrubias J.C.<sup>3\*</sup> (<http://orcid.org/0000-0003-4790-9898> )

<sup>1</sup>Posgrado en Ciencias Biológico Agropecuarias, Universidad Autónoma de Nayarit. Xalisco Nayarit, México. C.P. 63155. <sup>2</sup>Unidad Académica Escuela Nacional de Ingeniería Pesquera. Universidad Autónoma de Nayarit. Bahía de Matanchén Km. 12, Carretera a los Cocos, San Blas Nayarit, México. C.P. 63740. <sup>3</sup>Laboratorio de Indicadores Biológicos de Estrés Ambiental. Unidad Académica Escuela Nacional de Ingeniería Pesquera, Universidad Autónoma de Nayarit. Bahía de Matanchén Km. 12, Carretera a los Cocos, San Blas Nayarit, México. C.P. 63740.

**\*Corresponding Author:** Juan Carlos Bautista-Covarrubias. U.A. Escuela Nacional de Ingeniería Pesquera. Universidad Autónoma de Nayarit. Bahía de Matanchén Km. 12, Carretera a los Cocos, San Blas Nayarit, México. C.P. 63740. Teléfono: (311) 135-2092. E-mail: [juanb@uan.edu.mx](mailto:juanb@uan.edu.mx)

## RESUMEN

En Nayarit México, el camarón *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) es una de las especies ampliamente utilizadas para el cultivo, por tolerar un intervalo amplio de salinidad, probablemente debido a que el período de lluvias provoca que la salinidad disminuya de 35 a 5 g L<sup>-1</sup>. El presente trabajo evaluó la respuesta de camarones al proceso de aclimatación con la disminución de la salinidad (10, 7, 5 y 2 g L<sup>-1</sup>), así como también con el incremento gradual (2, 5, 7 y 10 g L<sup>-1</sup>). Las variables determinadas fueron; la coagulación de la hemolinfa (s), la concentración de hemocianina (mmol L<sup>-1</sup>), conteo total (10<sup>6</sup> hemocitos mL<sup>-1</sup>) y diferencial (%) de hemocitos en camarones juveniles. La coagulación en los camarones no fue alterada en ambos experimentos. La hemocianina incrementó significativamente ( $p < 0.05$ ) al disminuir la salinidad, los hemocitos tendieron a disminuir conforme disminuyó la salinidad, mientras que, al aumentar la salinidad, la tendencia fue la de aumentar. Los hemocitos hialinos presentaron un mayor porcentaje cuando se incrementó la salinidad, mostrando diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en los camarones de ambos experimentos. Finalmente, el proceso de aclimatación no afectó la supervivencia, y las diferencias entre las variables determinadas podrían estar relacionadas con la disminución de la salinidad.

**PALABRAS CLAVE:** aclimatación, camarón, coagulación, hemocianina, hemocitos.

## ABSTRACT

In Nayarit Mexico, the shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) is one of the most widely used species grown on farms, due to its tolerance to a wide salinity range, probably caused by salinity decreased in the shrimp ponds during the rainy season from 35 to 5 g L<sup>-1</sup>. The purpose of this work was to evaluate the response of shrimp to the acclimatization process during both decreasing salinity (10, 7, 5, and 2 g L<sup>-1</sup>) and its gradual increase (2, 5, 7, and 10 g L<sup>-1</sup>). The determined variables were, clotting time (s), hemocyanin concentration (mmol L<sup>-1</sup>), total count (10<sup>6</sup> hemocytes mL<sup>-1</sup>), and differential count (%) of hemocytes in juvenile shrimp. Shrimp clotting time from both experiments was not altered. Hemocyanin increased significantly ( $p < 0.05$ ) with the reduction of salinity while hemocytes tended to decrease as salinity decreased and to increase when salinity increased. Hyaline hemocytes showed a higher percentage when salinity increased, showing significant differences ( $p < 0.05$ ) in shrimp from both experiments. Finally, the acclimatization process did not affect survival, and the differences between the determined variables could be related to the decrease in salinity.

**KEYWORDS:** acclimatization, shrimp, coagulation, hemocyanin, hemocytes.

## Introducción

El cultivo tradicional de camarón se realiza desde hace décadas con fluctuaciones de salinidad y con continuos cambios de agua, lo que provoca estrés en los organismos; además el gran volumen de agua necesario para el cultivo, representa un gasto económico excesivo debido al alto costo del diésel necesario para bombearlo. En San Blas, Nayarit, México, las granjas camaronerías se ubican a una altitud máxima de cinco metros sobre el nivel del mar; el clima es tropical, con más lluvias en verano que durante el invierno con una precipitación anual aproximada de 1316 mm (Cossio-Vargas *et al.*, 2008) lo que baja la salinidad en los estanques.

El cultivo de camarón en aguas de baja salinidad es una actividad común y creciente en muchos países del mundo, incluidos Tailandia, China, Vietnam, Ecuador, Brasil, Estados Unidos y México (Roy *et al.*, 2010). El camarón blanco del Pacífico (*Litopenaeus vannamei*) es una de las especies con mayor potencial para ser criada en granjas (Mansaray *et al.*, 2018; Landsman *et al.*, 2019) debido a su tolerancia a un amplio rango de salinidades, que van desde 1 o 2 g L<sup>-1</sup>, hasta 40 g L<sup>-1</sup>, a diferencia de otros crustáceos. Además, *L. vannamei* es considerada la que mejor se adapta a aguas de baja salinidad, mostrando una tasa de supervivencia favorable en condiciones de aclimatación que oscilan entre 1 y 4 g L<sup>-1</sup> (McGraw *et al.*, 2002). Adicionalmente, Brito *et al.* (2000), señala que la especie *Farfantepenaeus brasiliensis* no tolera bajos niveles de salinidad durante su crecimiento. En *Farfantepenaeus paulensis* fue determinado que la respuesta humoral y celular fue afectada cuando la salinidad disminuyó de 22 a 13 g L<sup>-1</sup> (Perazzolo *et al.*, 2002).

El cultivo de camarón continental con el uso de agua de baja salinidad se originó a principios de la década de 1990 en Tailandia con el camarón tigre (*Penaeus monodon*); esta actividad se introdujo como una estrategia para contrarrestar el efecto de enfermedades virales como la mancha blanca (WSSV) y el virus de la cabeza amarilla (YHV), así como una respuesta a la saturación de tierras para el establecimiento de granjas en zonas costeras (Flaherty *et al.*, 2000). El cultivo de camarón utilizando agua de pozo de baja salinidad representa una opción importante para evitar enfermedades del camarón causadas por microorganismos patógenos, constituye una alternativa productiva en zonas de alta marginación (Valenzuela Quiñonez *et al.*, 2010) y se está volviendo más popular en muchas regiones del mundo (Boyd & Thunjai, 2003; Mariscal-Lagarda *et al.*, 2012).

Los estados mexicanos de Baja California, Jalisco y Colima obtienen rendimientos cercanos a las 10 toneladas de camarón por hectárea en sistemas intensivos en agua con 0.5 g L<sup>-1</sup> (Godínez-Siordia *et al.*, 2011), debido principalmente a la experiencia en el cultivo y la tecnología utilizada. La experiencia y el conocimiento han demostrado que el cultivo de camarones de baja salinidad es técnicamente factible, considerando que el proceso de aclimatación es de gran importancia para la supervivencia de los organismos en el cultivo (Davis *et al.*, 2002).

La aclimatación de los camarones a aguas de baja salinidad es fundamental para la adecuada adaptación de los organismos a las nuevas condiciones de cultivo, ya que puede estresarlos durante gran parte del tiempo de cultivo, aunado a que la cantidad de iones de agua puede ser menor que la cantidad requerida por su organismo, provocando una alteración del proceso natural de muda, lento crecimiento y alteración de los componentes celulares y humorales. El presente trabajo evaluó la respuesta humoral y celular de *L. vannamei* a períodos cortos (dos horas) de aclimatación disminuyendo la salinidad de 10 g L<sup>-1</sup> a 7, 5 y a 2 g L<sup>-1</sup> e incrementándola de 2 g L<sup>-1</sup> a 5, 7, y 10 g L<sup>-1</sup> en condiciones controladas en el laboratorio.

## Material y Métodos

Juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) fueron donados por la granja camaronera "Los Sauces" ubicada a 21° 35'N, y 105° 18'W, en el municipio de San Blas, Nayarit, y utilizados en los dos experimentos. Fueron transportados a corta distancia con aireación constante hasta el Laboratorio de Indicadores Biológicos de Estrés Ambiental, de la Unidad Académica Escuela Nacional de Ingeniería Pesquera de la Universidad Autónoma de Nayarit, a 28 g L<sup>-1</sup> y 30 °C con agua de estanque. Los estadios de muda (postmuda, intermuda y premuda) se identificaron observando el grado de retracción epidérmica de los conos de las setas y la cutícula en los urópodos internos con un microscopio según lo propuesto por Robertson *et al.* (1987).

### Aclimatación

Una vez en el laboratorio, 50 organismos (longitud promedio total 12.70 ± 1.17 cm y peso promedio 12.63 ± 3.94 g) fueron colocados en un tanque circular con capacidad de 267.32 litros. Posteriormente, la salinidad inicial (28 g L<sup>-1</sup>) se disminuyó gradualmente 2 g L<sup>-1</sup> cada dos horas hasta llegar a 10 g L<sup>-1</sup> (con la fórmula de dilución de soluciones), que fue la salinidad experimental utilizada. 16 organismos tomados al azar fueron colocados en un acuario de vidrio con capacidad de 60 litros, y fueron aclimatados al espacio y a 10 g L<sup>-1</sup> durante tres días, siendo alimentados tres veces al día al 8 % de la biomasa con alimento comercial (Api-Camarón, 30 % proteína). Las variables ambientales del agua fueron las siguientes: oxígeno (5.81 ± 0.5 mg L<sup>-1</sup>), temperatura (24 ± 1.0 °C) y pH (7.63 ± 0.20).

### Primer experimento

Del acuario con 10 g L<sup>-1</sup> se capturaron camarones (n = 4) uno a uno con ayuda de una red tipo pala, y se extrajo y analizó la hemolinfa (se contabilizó el tiempo de coagulación, la hemocianina y el número total y diferencial de hemocitos). Posteriormente se disminuyó la salinidad con agua dulce de 10 g L<sup>-1</sup> a 7; dos horas después, se extrajeron de la misma forma cuatro camarones. Posteriormente se redujo la salinidad a 5 g L<sup>-1</sup> y después de dos horas más se capturaron cuatro camarones. Finalmente se añadió más agua dulce hasta llegar a 2 g L<sup>-1</sup>, y al cabo de dos horas se analizaron cuatro camarones.

### Segundo experimento

Se utilizó otro lote de organismos (n = 50) provenientes de una granja camaronera con agua de baja salinidad (2 g L<sup>-1</sup>) (longitud promedio 13.70 ± 1.13 cm y peso promedio 16.50 ± 3.30 g). La salinidad inicial de 2 g L<sup>-1</sup>, se incrementó agregando agua de mar (35 g L<sup>-1</sup>), hasta alcanzar las salinidades experimentales (5 g L<sup>-1</sup>, 7 y 10 g L<sup>-1</sup>), y se analizaron cuatro organismos en cada incremento de salinidad de la misma manera descrita anteriormente.

### Tiempo de coagulación

Se registró el tiempo de coagulación de la hemolinfa en cada camarón y según el método establecido por Jussila *et al.* (2001), se colocaron 20 µL de la muestra inicial de hemolinfa (sin anticoagulante) en un microtubo capilar para hematocrito de 1.55 mm de diámetro (Corning Inc. SD USA). Posteriormente, el microtubo se invirtió de un extremo al otro repetidamente hasta inmovilizar la hemolinfa en la pared del tubo capilar. El tiempo de coagulación (s) se contó desde el momento

en que se insertó la aguja en la base del primer segmento abdominal del camarón hasta que la hemolinfa dejó de fluir en el microtubo.

#### **Determinación de la concentración de Hemocianina**

Para cuantificar la concentración de hemocianina presente en la hemolinfa, se utilizó el método descrito por Pascual *et al.* (2006); Se tomaron por duplicado 10  $\mu\text{L}$  de la muestra sin anticoagulante, se colocaron rápidamente en cubetas de 1.5 mL de capacidad y se diluyeron con 990  $\mu\text{L}$  de agua bidestilada. Las lecturas de absorbancia se realizaron en un espectrofotómetro VIS UV-10 s (Thermo Fisher Scientific, USA), a una longitud de onda de 335 nm y la concentración de hemocianina ( $\text{mmol L}^{-1}$ ) se calculó con el coeficiente de extinción molar  $\epsilon = 17.26$  (Nickerson & Van Holde, 1971) utilizando la siguiente ecuación:

$$Hc = FD (\text{absorbancia} * \epsilon^{-1})$$

FD = factor de dilución

#### **Conteo total de hemocitos**

El conteo se realizó con un microscopio óptico; se mezclaron 50  $\mu\text{L}$  de hemolinfa con anticoagulante (citrato trisódico 27 mmol, cloruro de sodio 385 mmol, glucosa 115 mmol, pH 6.6) siguiendo a Huang *et al.* (2010); de esta muestra se extrajo una segunda muestra de 50  $\mu\text{L}$  y se fijó con el mismo volumen de formalina (37 % formalina, 0.45 mol NaCl) según el procedimiento de Costa *et al.* (2009). Los conteos se realizaron en una cámara de Neubauer a 400X, localizando el número total de hemocitos en los cuatro cuadrantes de las esquinas y un cuadrante adicional seleccionado al azar (Arredondo-Vega & Voltolina, 2007). Los conteos se reportan en  $1 \times 10^6$  hemocitos  $\text{mL}^{-1}$ .

#### **Conteo diferencial de hemocitos**

Se utilizaron 20  $\mu\text{L}$  de hemolinfa fijada y la muestra se observó en una cámara de Neubauer a 400X (10  $\mu\text{L}$  en cada cuadrante de 3 x 3 mm). Se diferenciaron los tres tipos de hemocitos; hialinos, semigranulares y granulares, según su morfología y sólo se contaron los primeros 200 hemocitos observados en cada cuadrante; los resultados se presentan en porcentajes según los tres tipos de hemocitos observados.

#### **Análisis estadístico**

Los datos obtenidos fueron analizados con pruebas de normalidad y homocedasticidad (pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Bartlett); posteriormente se aplicó ANOVA (de una vía y dos vías) cuando se cumplieron los supuestos estadísticos; en caso contrario se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis. Para aislar las diferencias, fueron aplicadas las pruebas de comparación de promedios de Holm-Sidak y Tukey. El nivel de significancia fue  $P < 0.05$  para todas las pruebas. El software SigmaStat (versión 3.0), fue utilizado para todas las pruebas estadísticas.

### **Resultados y Discusión**

#### **Tiempo de coagulación**

El tiempo mayor de coagulación de hemolinfa fue de 141 s, en camarones a 5 g  $\text{L}^{-1}$  durante el proceso de disminución de salinidad, mientras que el valor mayor de coagulación de hemolinfa fue de 126 s, cuando fue incrementada la salinidad. Los valores mínimos fueron 33 s y 61 s, durante la disminución e incremento de las salinidades, respectivamente. Sin embargo, el análisis estadístico realizado mostró que no existen diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre los valores máximos y mínimos de coagulación de la hemolinfa del camarón con la disminución y con el incremento de la salinidad de los diferentes tratamientos (Tabla 1). Es importante señalar que la temperatura ambiente fue  $24 \pm 1$  °C, lo que significa que el tiempo de coagulación puede variar si se realiza a una temperatura inferior o superior a la que aquí se realizó. El proceso de coagulación en los crustáceos es una respuesta humoral que cierra las heridas para impedir la entrada de bacterias y partículas tóxicas al organismo (Iwanaga & Lee, 2005; Maningas *et al.*, 2013). Los tiempos de coagulación de la hemolinfa en organismos sanos se mantienen entre 30 y 40 s (Lightner & Redman, 1998), pero si



las bacterias en la hemolinfa son abundantes, el tiempo de coagulación aumenta. Se ha considerado que el aumento del tiempo de coagulación puede utilizarse como indicador de estrés. (Fotedar *et al.*, 2001); también se ha documentado que el tiempo de coagulación de la hemolinfa de *L. vannamei* se incrementa por el estrés causado por el sulfato de cobre (Bautista-Covarrubias *et al.*, 2015), y por el desafío a infecciones virales (Yoganandhan *et al.*, 2003; Song *et al.*, 2003). Por tanto, un aumento del tiempo de coagulación puede utilizarse como indicador de estrés. Sin embargo, el presente trabajo no demostró que el tiempo de coagulación fuera alterado por la disminución o el incremento de la salinidad durante el corto período de aclimatación.

**Tabla 1. Valores medios ( $\pm$  S.D.) de tiempo de coagulación de la hemolinfa (s) en juveniles de *L. vannamei* en diferentes tratamientos con disminución e incremento de salinidades (n = 4).**

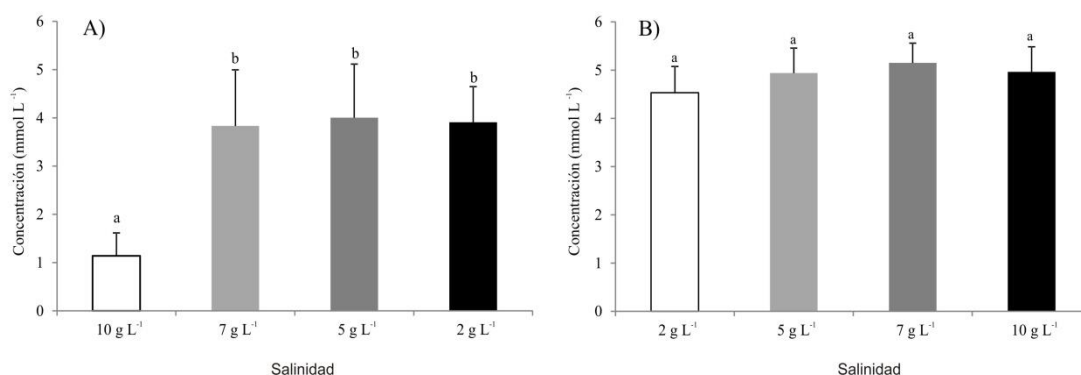
	10 g L <sup>-1</sup>	7 g L <sup>-1</sup>	5 g L <sup>-1</sup>	2 g L <sup>-1</sup>	Valor de P
<b>Primer experimento</b>	42.66 $\pm$ 8.73	72.20 $\pm$ 11.76	94.13 $\pm$ 42.52	76.00 $\pm$ 11.23	0.130
	2 g L <sup>-1</sup>	5 g L <sup>-1</sup>	7 g L <sup>-1</sup>	10 g L <sup>-1</sup>	Valor de P
<b>Segundo experimento</b>	73.5 $\pm$ 4.31	93.20 $\pm$ 22.88	73.35 $\pm$ 10.16	78.60 $\pm$ 6.21	0.102

### Concentración de hemocianina

Durante el primer experimento de disminución de salinidad, el 75 % de los camarones se encontraban en estadio de postmuda "B" y el 25 % en estadio de intermuda "C". Cuando la salinidad disminuyó, el valor de hemocianina más alto fue de 4.92 mmol L<sup>-1</sup> en camarones del tratamiento de 7 g L<sup>-1</sup>, mientras que el valor más bajo fue de 0.60 mmol L<sup>-1</sup> registrado en camarones a 10 g L<sup>-1</sup>. El análisis de varianza aplicado mostró diferencias significativas ( $p < 0.001$ ) entre los valores de concentración de hemocianina en camarones de los diferentes tratamientos de g L<sup>-1</sup>. El análisis de comparación de promedios (Holm-Sidak) de la concentración de hemocianina en camarones de los tratamientos de 7 g L<sup>-1</sup>, 5 g L<sup>-1</sup> y 2 g L<sup>-1</sup> no fue diferente, mientras que el valor más bajo de hemocianina fue en camarones del tratamiento de 10 g L<sup>-1</sup> y fue estadísticamente diferente ( $p < 0.05$ ) comparado con lo determinado en camarones de los tres tratamientos indicados. Es posible que con base en el análisis estadístico realizado, la concentración de hemocianina en los camarones aumente en función de la disminución de la salinidad.

En el segundo experimento con el incremento de la salinidad, el 81 % de los camarones se encontraban en estadio "C", el 13 % en estadio "D" y el 6 % en el estadio "B". No fue posible detectar una amplia variabilidad en los valores de hemocianina en camarones de los diferentes tratamientos (Figura 1). Aunque el valor más alto estuvo presente en camarones del tratamiento de 5 g L<sup>-1</sup> (5.71 mmol L<sup>-1</sup>) y el valor más bajo de 3.88 mmol L<sup>-1</sup> estuvo en camarones del tratamiento inicial (2 g L<sup>-1</sup>), los valores no mostraron variabilidad significativa ( $p = 0.114$ ), como si sucedió en el experimento (1) de disminución de la salinidad. La hemocianina es una proteína plasmática que se disuelve en la hemolinfa y se encarga de distribuir y transportar el 90 % del oxígeno a todos los tejidos; se ha documentado que esta proteína corresponde a una alta proporción del total de proteínas en la sangre (58 % a 98 %). Además, se sabe que la hemocianina tiene una función anti fúngica y es considerada una de las proteínas inmunológicas de gran importancia, la cual actúa como barrera de defensa y permite conocer el estado de salud del camarón, por lo que juega un papel importante en resistir a infecciones por virus, bacterias y hongos (Destoumieux-Garzón *et al.*, 2001; Lei *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2019). En los

camarones del primer experimento observamos un aumento en la concentración de hemocianina, quizás porque la fecha del experimento fue en la fase lunar de luna nueva, lo que significa que el 75 % de los camarones se encontraban en estadio de postmuda “B”, y el 25 % de los camarones se encontraban en estadio de intermuda “C”, lo cual coincide con lo reportado por Orellana *et al.* (2000), pues indican que el 80 % de los organismos analizados han liberado el exoesqueleto con la fase de luna nueva. El aumento en la concentración de hemocianina cuando disminuye la concentración de la salinidad, coincide con lo mencionado por Li *et al.* (2019) cuando el camarón *L. vannamei* estuvo expuesto a 3.3 y 6.6 mmol de nitrito, la hemocianina aumentó a las 12 horas de exposición. Sin embargo, cuando *L. vannamei* fue expuesto a 5.3 mmol de nitrato en agua de baja salinidad (3 g L<sup>-1</sup>), la concentración de hemocianina disminuyó después de 12 horas de exposición (Valencia-Castañeda *et al.*, 2020). El aumento de la concentración de hemocianina también se ha observado en el cangrejo *Carcinus maenas* en condiciones de estrés hipoosmótico (Boone & Schoffeniels, 1979). También se ha observado una variación en la concentración de hemocianina en camarones cultivados en estanques al aire libre en comparación con camarones cultivados en interiores (Pascual *et al.*, 2003). El aumento en la concentración de hemocianina en el primer experimento puede deberse a que los organismos experimentales llevaron a cabo síntesis de proteínas para aumentar la presencia de oxígeno en la hemolinfa (El-Gendy *et al.*, 2019). En el segundo experimento, la concentración de hemocianina no mostró diferencias significativas.



**Figura 1. Valores medios ( $\pm$  D.E.) de concentración de hemocianina en *L. vannamei* en diferente tratamiento A) con disminución y B) con incremento de salinidades. Diferentes letras indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) prueba Holm-Sidak.**

### Conteo total de hemocitos

En el primer experimento, el número de hemocitos fue menor a medida que disminuyó la salinidad; el análisis de varianza realizado mostró diferencias significativas ( $p \leq 0.001$ ). El valor promedio más bajo fue de  $4.20 \times 10^6$  hemocitos mL<sup>-1</sup>, registrado en camarones del tratamiento de 2 g L<sup>-1</sup>, fue estadísticamente diferente ( $p < 0.05$ ) de los valores promedio de camarones del tratamiento de 10 g L<sup>-1</sup>, donde el valor promedio más alto de hemocitos totales fue  $9.32 \times 10^6$  hemocitos mL<sup>-1</sup>. La tendencia de hemocitos mostrada fue disminuir a medida que disminuía la salinidad, contrario a la tendencia mencionada anteriormente para la concentración de hemocianina en *L. vannamei* en los diferentes tratamientos de g L<sup>-1</sup>.

En el segundo experimento, la tendencia de los hemocitos totales fue aumentar con el incremento de la salinidad. El valor promedio más alto fue de  $4.55 \times 10^6$  hemocitos mL<sup>-1</sup> en camarones a 10 g L<sup>-1</sup>, el cual fue  $4.77 \times 10^6$  hemocitos mL<sup>-1</sup> menor que el encontrado en camarones del primer

experimento en el mismo tratamiento (Figura 2). Se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre el valor promedio de hemocitos de camarón del tratamiento de  $10 \text{ g L}^{-1}$ , respecto a los valores promedio de hemocitos de camarón de los demás tratamientos ( $2 \text{ g L}^{-1}$ ,  $5 \text{ g L}^{-1}$  y  $7 \text{ g L}^{-1}$ ). El valor promedio de hemocitos más bajo fue de  $0.78 \times 10^6$  hemocitos  $\text{mL}^{-1}$  en camarones del tratamiento inicial ( $2 \text{ g L}^{-1}$ ). En el presente trabajo fue observado un menor número de hemocitos con la disminución de la salinidad del agua. Los cambios en el número total y/o diferencial de hemocitos circulantes en la hemolinfa pueden deberse a diversos factores, como la exposición a contaminantes y el estrés fisiológico (Giulianini *et al.*, 2007; Kaoud & Rezk, 2011). Perazzolo *et al.* (2002) informaron una disminución en el número de hemocitos totales (40 %) en el grupo control de camarón *Farfantepenaeus paulensis* cuando la salinidad se disminuyó de  $22 \text{ g L}^{-1}$  a  $13 \text{ g L}^{-1}$ . Por otro lado, Lu-Qing *et al.* (2005) señalaron que en *L. vannamei* el número de hemocitos disminuyó cuando el estrés estuvo condicionado por la reducción de la salinidad ( $30 \text{ g L}^{-1}$  a  $5 \text{ g L}^{-1}$ ). Esto coincide con el presente trabajo donde la salinidad disminuyó de  $10 \text{ g L}^{-1}$  a  $2 \text{ g L}^{-1}$  en un corto período de tiempo, y los hemocitos en camarones fueron menores. Sin embargo, en el segundo experimento fue observada una tendencia de aumento de hemocitos en *L. vannamei*, la cual coincide con lo reportado para *Macrobrachium rosenbergii* cuando la salinidad aumentó de 0 a  $5 \text{ g L}^{-1}$ , 5 a  $10 \text{ g L}^{-1}$  y de 10 a  $15 \text{ g L}^{-1}$  (Cheng & Chen, 2000). Por otro lado, en *Penaeus monodon* se observó una disminución de hemocitos cuando aumentó la salinidad ( $5$  a  $15$  y  $35 \text{ g L}^{-1}$ ) y cuando fueron desafiados con la bacteria *Vibrio harveyi* (Joseph & Philip, 2020). Los hemocitos son responsables de eliminar materiales exógenos mediante fagocitosis, encapsulación y formación de nódulos (Qiu *et al.*, 2011). Por lo tanto, los hemocitos juegan un papel importante en el mecanismo de defensa, una disminución en su número puede hacer que los camarones sean susceptibles a los microorganismos patógenos. Liu *et al.* (2004) registraron el mayor número de hemocitos en *L. vannamei* en estadio "C" desafiado con la bacteria *Vibrio alginolyticus* y en menor número en camarones en estadios "A" y "B", contrario a lo reportado en este estudio.

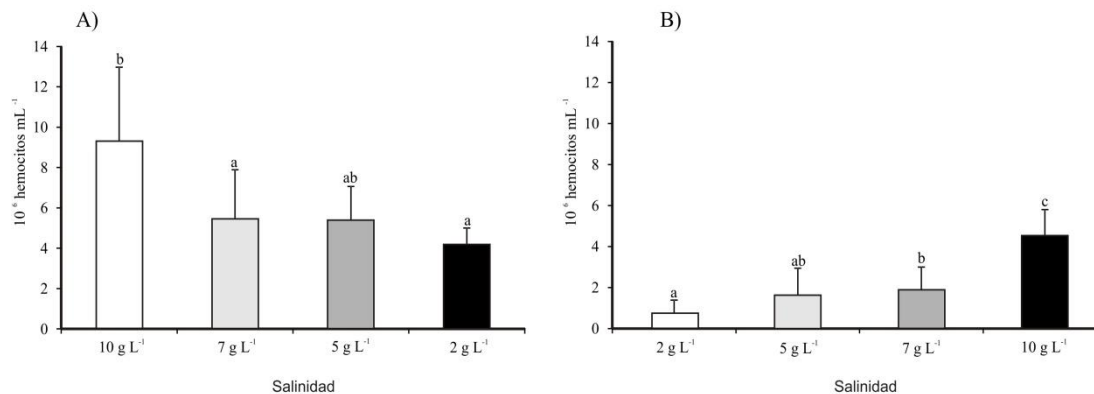


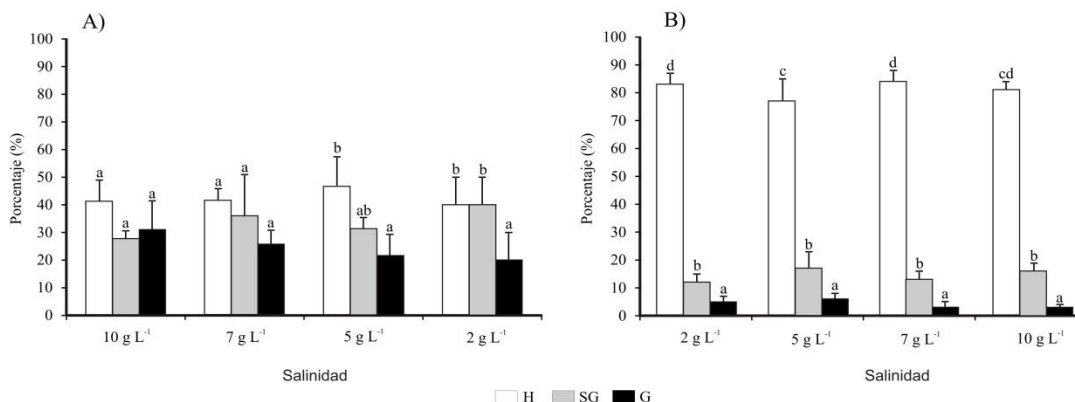
Figura 2. Valores medios ( $\pm$  D.E.) de concentración total de hemocitos ( $10^6$  hemocitos  $\text{mL}^{-1}$ ) de *L. vannamei* en diferentes tratamientos: A) con disminución y B) con incremento de salinidades. Diferentes letras indican diferencias estadísticas ( $p < 0.05$ ) prueba Tukey.

### Conteo diferencial de hemocitos



Se contaron los diferentes tipos de hemocitos; hialinos (H), semigranulares (SG) y granulares (G). El análisis estadístico realizado (ANOVA una vía) no mostró diferencias significativas para cada tipo de hemocito, H ( $p = 0.754$ ), SG ( $p = 0.441$ ) y G ( $p = 0.449$ ) y para cada tratamiento de salinidad. Sin embargo, al aplicar el análisis de varianza (ANOVA de dos vías), no se determinaron diferencias significativas ( $p = 0.991$ ) entre los tratamientos ( $\text{g L}^{-1}$ ), ni en la interacción ( $p = 0.341$ ), solo diferencias estadísticas ( $p = 0.001$ ) se obtuvieron entre los diferentes tipos de hemocitos para cada tratamiento. Posteriormente, la comparación de medias mostró diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los porcentajes promedio de los tres hemocitos diferentes en cada tratamiento.

En el segundo experimento, se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en el promedio de hemocitos H de camarones del tratamiento  $5 \text{ g L}^{-1}$ , con respecto al número de hemocitos encontrados en camarones del tratamiento  $2 \text{ g L}^{-1}$  y  $7 \text{ g L}^{-1}$  (Figura 3). Sin embargo, cuando la salinidad incrementó, el número de hemocitos hialinos se mantuvo constante y no mostró diferencias significativas en los camarones de los tratamientos de  $7 \text{ g L}^{-1}$  y  $10 \text{ g L}^{-1}$ . Finalmente, no hubo mortalidad de ningún camarón juvenil durante los dos experimentos realizados, quizás porque los cambios de salinidad no fueron drásticos y porque los tiempos de aclimatación fueron lo suficientemente largos como para no afectar la supervivencia. La defensa celular de los invertebrados implica una respuesta mediada por diferentes tipos de hemocitos (presencia o ausencia de gránulos dispersos en el citoplasma, así como por el tamaño del hemocito) que circulan libremente en la hemolinfa (Correia, 2008; Xian *et al.*, 2017). Nuestros resultados demuestran la identificación de hemocitos H, SG y G en crustáceos, al igual que Johansson *et al.* (2000). El conteo realizado muestra que el mayor porcentaje de hemocitos H (84 %) estuvo presente en camarones del segundo experimento y a  $7 \text{ g L}^{-1}$ , 40 % de SG en camarones del primer experimento ( $2 \text{ g L}^{-1}$ ), y 6 % de G, en camarones de  $5 \text{ g L}^{-1}$ . Estrada *et al.* (2016) identificaron 45 % hemocitos H, 27 % SG y 28 % G en *L. vannamei* al utilizar hematoxilina eosina para teñir los hemocitos, porcentajes similares a los reportados en este trabajo, con la diferencia de que los autores no ejercieron estrés sobre los organismos. También en el crustáceo *Sicyonia ingentis* se identificaron los siguientes porcentajes; 50-60 % hemocitos H, 30 % SG y 10 % G (Hose *et al.*, 1992), valores diferentes a los registrados en los dos experimentos aquí realizados. En la hemolinfa circulan los diferentes tipos de hemocitos y mantienen la homeostasis como el principal mecanismo fisiológico y de defensa (Lorenzon *et al.*, 2001; Thabet *et al.*, 2017) frente al estrés provocado por los cambios de salinidad en cortos periodos de tiempo como ocurrió con *L. vannamei* aquí reportado. No hubo eventos de mortalidad en ninguno de los dos experimentos de aclimatación. Sin embargo, Jayasankar *et al.* (2009) encontraron eventos de mortalidad (25 %) de postlarvas (PL15) cuando fueron aclimatadas por un día y siete días a  $1 \text{ g L}^{-1}$  y  $5 \text{ g L}^{-1}$ , el mayor porcentaje de supervivencia fue a  $5 \text{ g L}^{-1}$  en el periodo de tres a siete días de aclimatación.



**Figura 3. Porcentajes medios ( $\pm$  D.E.) de hemocitos presentes en la hemolinfa de *L. vannamei* en diferentes tratamientos. A) con disminución y B) con incremento de salinidades. ANOVA de dos vías detectó diferencias estadísticas ( $P < 0.05$ ) en cada tratamiento. Para aislar las diferencias la prueba Holm-Sidak fue aplicada.**

## Conclusión

El proceso de aclimatación representa un factor de gran importancia y debe realizarse de forma gradual para que los camarones puedan adaptarse a las nuevas condiciones del agua sin estresarse cuando son introducidos a los estanques de crecimiento. El cambio en la salinidad representa un factor de estrés que se refleja en algunas variables de respuesta, volviéndose los camarones más susceptibles a las bacterias oportunistas. La concentración de hemocianina y el número total de hemocitos en los camarones variaron debido a la disminución y aumento de la salinidad, y finalmente, la supervivencia no se vio afectada por esos cambios.

## Contribución de los autores

Autor 1, Análisis en laboratorio; Autor 2, Diseño experimental y análisis estadístico; Autor 3, Análisis de laboratorio; Autor 4, Diseño experimental y análisis estadístico; Autor 5, Actividades de gestión, elaboración de manuscrito. Responsabilidad de supervisión y liderazgo para la planificación y ejecución de la actividad de investigación. Adquisición de financiación del apoyo financiero para el proyecto que conduce a esta publicación.

## Financiamiento

Este trabajo se realizó con recursos del impuesto especial destinado a la UAN-2018 y del Proyecto PRODEP: F-PRODEP-38/Rev-04 SEP-23-005.

## Agradecimientos

Los autores agradecen a Carlos J. Navarro por su ayuda en la traducción del artículo.

## Conflicto de interés

Los autores declaran que no hay conflicto de interés.

## Referencias

Arredondo-Vega, B. O., & Voltolina, D. (2007). Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal. Ed. Centro de Investigaciones Biológicas de Noroeste, S.C.

Bautista-Covarrubias, J. C., Frías-Espéricueta, M. G., Velarde-Montes, G. J., Voltolina, D., García-de la Parra, L. M., & Soto-Jiménez, M. F. (2015). Relationships between copper and stress indicators in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 48, 193-203. <https://doi.org/10.1080/10236244.2015.1024079>

Boone, W. R. & Schoffeniels, E. (1979). Hemocyanin synthesis during hypo-osmotic stress in the shore crab *Carcinus maenas* (L.). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 63(2),207-214. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(79\)90031-2](https://doi.org/10.1016/0305-0491(79)90031-2)

Boyd, C. E. & Thunjai, T. (2003). Concentrations of major ions in waters of inland shrimp farms in China, Ecuador, Thailand, and the United States. *Journal of the World Aquaculture Society*, 34(4), 524-532. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2003.tb00092.x>

Brito, R., Chimal, M. E. & Rosas, C. (2000). Effect of salinity in survival, growth, and osmotic capacity of early juveniles of *Farfantepenaeus brasiliensis* (decapoda: Penaeidae). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 244(2), 253-263. [https://doi.org/10.1016/S0022-0981\(99\)00142-2](https://doi.org/10.1016/S0022-0981(99)00142-2)

Cheng, W. & Chen, J. C. (2000). Effects of pH, temperature and salinity on immune parameters of the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Fish & Shellfish Immunology*, 10, 387-391. <https://doi.org/10.1006/fsim.2000.0264>

Correia, A. A. (2008). Histofisiología do canal alimentar e hemócitos de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) tratadas com Nim (*Azadirachta indica* A.Juss). [Tesis de Maestría, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brasil]. <http://www.tede2.ufrpe.br:8080/tede2/handle/tede2/5948>

Cossio-Vargas, L. E., Salazar-García, S. & Medina-Torres, R. (2008). Desarrollo floral de los aguacates “choquette” y “booth-8” en clima cálido: Parte I. *Agricultura técnica en México*, 34(1), 43-49.

Costa, A. M., Buglione, C. C., Bezerra, F. L., Martins, P. C. C. & Barracco, M. A. (2009). Immune assessment of farm-reared *Penaeus vannamei* shrimp naturally infected by IMNV in NE Brazil. *Aquaculture*, 291(3-4), 141-146. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.03.013>

Davis, D., McGraw, W. J., & Rouse, B. (2002). Considerations for *Litopenaeus vannamei* reared in inland low salinity waters. <https://www.semanticscholar.org/paper/Considerations-for-Litopenaeus-vannamei-Reared-in-Davis-McGraw/eaf41ca35226a8569143b9f90ec664c23fcc9b0>

Destoumieux-Garzón, Saulnier, D., Garnier, J., Jouffrey, C., Bulet, P. & Bachère, E. (2001). Crustacean Immunity: Antifungal peptides are generated from the C terminus of shrimp hemocyanin in response to microbial challenge. *Journal of Biological Chemistry*, 276(50), 47070-47077. <https://doi.org/10.1074/jbc.M103817200>

El-Gendy, K. S., Radwana, M. A., Gad, A. F., Khamis, A. E., & Eshra, E. H. (2019). Use of multiple endpoints to investigate the ecotoxicological effects of abamectin and thiamethoxam on *Theba pisana* snails. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 167, 242-249. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.10.027>

Estrada, N., Velázquez, E., Rodríguez-Jaramillo, C. & Ascencio, F. (2016). Carbohydrate moieties and cytoenzymatic characterization of hemocytes in whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei*. *International Journal of Cell Biology*, Article 9032181. <https://doi.org/10.1155/2016/9032181>

Flaherty, M., Szuster, B. & Miller, P. (2000). Low salinity inland shrimp farming in Thailand. *AMBIO: A Journal of the Human Environment*, 29(3), 174-179. <https://doi.org/10.1579/0044-7447-29.3.174>

Fotedar, S., Tsvetnenko, E., & Evans, L. (2001). Effect of air exposure on the immune system of the rock lobster *Panulirus cygnus*. *Marine and Freshwater Research*, 52(8), 1351-1355. <https://doi.org/10.1071/mf01098>

Giulianini, P. G., Bierti, M., Lorenzon, S., Battistella, S., & Ferrero, E. A. (2007). Ultrastructural and functional characterization of circulating hemocytes from the freshwater crayfish *Astacus leptodactylus*: Cell types and their role after in vivo artificial non-self challenge. *Micron*, 38(1), 49-57. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2006.03.019>.

Godínez-Siardia, D. E., Chávez-Sánchez, M. C., & Gómez-Jiménez, S. (2011). Acuicultura epicontinental del camarón blanco del Pacífico, *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 14,(1) 55-62.

Hose, J. E., Martín, G. G., Tiu, S. & McKrell, N. (1992). Patterns of hemocyte production and release throughout the molt cycle in the Penaeid Shrimp *Sicyonia ingentis*. *The Biological Bulletin*, 183(), 185-199. <https://doi.org/10.2307/1542206>

Huang, J., Yang, Y., & Wang, A. (2010). Reconsideration of phenoloxidase activity determination in white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology*, 28(1), 240-244. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2009.10.010>

Iwanaga, S., & Lee, B. L. (2005). Recent advances in the innate immunity of invertebrate animals. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 38(2), 128-150. <https://doi.org/10.5483/bmbrep.2005.38.2.128>

Jayasankar, V., Jasmani, S., Nomura, T., Nohara, S., Huong, D. T. T., & Wilder, M. N. (2009). Low salinity rearing of the Pacific white Shrimp *Litopenaeus vannamei*: Acclimation, survival and growth of postlarvae and juveniles. *Japan Agricultural Research Quarterly: JARQ*, 43(4), 345-350. <https://doi.org/10.6090/jarq.43.345>

Johansson, M. W., Keyser, P., Sritunyalucksana, K. & Söderhäll, K. (2000). Crustacean haemocytes and haematopoiesis. *Aquaculture*, 191(1-3), 45-52. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(00\)00418-X](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(00)00418-X)

Joseph, A. & Philip, R. (2020). Immunocompetence of *Penaeus monodon* under acute salinity stress and pathogenicity of *Vibrio harveyi* with respect to ambient salinity. *Fish & Shellfish Immunology*, 106, 555-562. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.07.067>

Jussila, J., McBride, S., Jago, J. & Evans, L. H. (2001). Hemolymph clotting time as an indicator of stress in western rock lobster (*Panulirus cygnus* George). *Aquaculture*, 199(1-2), 185-193. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(00\)00599-8](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(00)00599-8)

Kaoud, H. A., & Rezk, A. (2011). Effect of exposure to cadmium on the tropical freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *African Journal of Aquatic Science*, 36(3), 253-260. <https://doi.org/10.2989/16085914.2011.636899>

Landsman, A., St-Pierre, B., Rosales-Leija, M., Brown, M. & Gibbons, W. (2019). Impact of aquaculture practices on intestinal bacterial profiles of Pacific whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Microorganisms*, 7(4), E93. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7040093>

Lei, K., Li, F., Zhang, M., Yang, H., Luo, T., & Xu, X. (2008). Difference between hemocyanin subunits from shrimp *Penaeus japonicus* in anti-WSSV defense. *Developmental & Comparative Immunology*, 32(7), 808-813. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2007.11.010>

Li, Z. S., Ma, S., Shan, H. W., Wang, T., & Xiao, W. (2019). Responses of hemocyanin and energy metabolism to acute nitrite stress in juveniles of the shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 186, 109753. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109753>

Lightner, D. V., & Redman, R. M. (1998). Shrimp diseases and current diagnostic methods. *Aquaculture*, 164(1-4), 201-220. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(98\)00187-2](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00187-2)

Liu, C. H., Yeh, S. T., Cheng, S. Y. & Chen, J. C. (2004). The immune response of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio* infection in relation with the moult cycle. *Fish & Shellfish Immunology*, 16(2), 151-161. [https://doi.org/10.1016/S1050-4648\(03\)00058-5](https://doi.org/10.1016/S1050-4648(03)00058-5)

Lorenzon, S., Francese, M., Smith, V. J. & Ferrero, E. A. (2001). Heavy metals affect the circulating haemocyte number in the shrimp *Palaemon elegans*. *Fish & Shellfish Immunology*, 11(6), 459-472. <https://doi.org/10.1006/fsim.2000.0321>

Lu-Qing, P., Ling-Xu, J., & Jing-Jing, M. (2005). Effects of salinity and ph on immune parameters of the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Shellfish Research*, 24(4), 1223-1227. [https://doi.org/10.2983/0730-8000\(2005\)24\[1223:EOSAPO\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.2983/0730-8000(2005)24[1223:EOSAPO]2.0.CO;2)

Maningas, M. B. B., Kondo, H., & Hirono, I. (2013). Molecular mechanisms of the shrimp clotting system. *Fish & Shellfish Immunology*, 34(4), 968-972. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.09.018>

Mansaray, M., Hayford, A., Xiaojun, J., Lin, Z. & Xinhua, Y. (2018). Economic analysis of white-leg shrimp (*Penaeus vannamei*) production case study: Rudong County of Nantong City, Jiangsu Province, China. *Asian Journal of Agricultural Extension, Economics & Sociology*, 26(4),1-13. <https://doi.org/10.9734/AJAEES/2018/42919>

Mariscal-Lagarda, M. M., Páez-Osuna, F., Esquer-Méndez, J. L., Guerrero-Monroy, I., del Vivar, A. R., & Félix-Gastelum, R. (2012). Integrated culture of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) and tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) with low salinity groundwater: Management and production. *Aquaculture*, 366-367, 76-84. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.09.003>

McGraw, W. J., Davis, D. A., Teichert-Coddington, D. & Rouse, D. B. (2002). Acclimation of *Litopenaeus vannamei* postlarvae to low salinity: Influence of age, salinity endpoint, and rate of salinity reduction. *Journal of the World Aquaculture Society*, 33(1), 78-84. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2002.tb00481.x>

Nickerson, K. W., & Van Holde, K. E. (1971). A comparison of molluscan and arthropod hemocyanin-I. Circular dichroism and absorption spectra. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 39(4), 855-872. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(71\)90109-X](https://doi.org/10.1016/0305-0491(71)90109-X)

Orellana, F., Cadena, E. & Molina, C. (2000). Alimentación de camarones en relación a la actividad enzimática como una respuesta natural al ritmo circadiano y ciclo de muda. <http://www.dspace.espol.edu.ec/handle/123456789/8784>

Pascual, C., Gaxiola, G., & Rosas, C. (2003). Blood metabolites and hemocyanin of the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*: The effect of culture conditions and a comparison with other crustacean species. *Marine Biology*, 142, 735-745. <https://doi.org/10.1007/s00227-002-0995-2>

Pascual, C., Sánchez, A., Zenteno, E., Cuzon, G., Gabriela, G., Brito, R., Gelabert, R., Hidalgo, E., & Rosas, C. (2006). Biochemical, physiological, and immunological changes during starvation in



juveniles of *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 251(2-4), 416-429.  
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.06.001>

Perazzolo, L., Gargioni, R., Ogliari, P., & Barracco, M. (2002). Evaluation of some hemato-immunological parameters in shrimp *Farfantepenaeus paulensis* submitted to environmental and physiological stress. *Aquaculture*, 214(1-4), 19-33. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(02\)00137-0](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00137-0)

Qiu, J., Wang, W. N., Wang, L., Liu, Y. F. & Wang, A. L. (2011). Oxidative stress, DNA damage and osmolality in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* exposed to acute low temperature stress. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 154(1), 36-41. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2011.02.007>

Robertson, L., Bray, W., Leung-Trujillo, J., & Lawrence, A. (1987). Practical Molt Staging of *Penaeus setiferus* and *Penaeus stylirostris*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 18(3), 180-185. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.1987.tb00437.x>

Roy, L. A., Davis, D. A., Saoud, I. P., Boyd, C. A., Pine, H. J. & Boyd, C. E. (2010). Shrimp culture in inland low salinity waters. *Reviews in Aquaculture*, 2(4), 191-208. <https://doi.org/10.1111/j.1753-5131.2010.01036.x>

Song, Y. L., Yu, C. I., Lien, T. W., Huang, C. C. & Lin, M. N. (2003). Haemolymph parameters of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* infected with Taura syndrome virus. *Fish & Shellfish Immunology*, 14(4), 317-331. <https://doi.org/10.1006/fsim.2002.0440>

Thabet, R., Ayadi, H., Koken, M., & Leignel, V. (2017). Homeostatic responses of crustaceans to salinity changes. *Hydrobiologia*, 799,1-20. <https://doi.org/10.1007/s10750-017-3232-1>

Valencia-Castañeda, G., Frías-Espericueta, M. G., Vanegas-Pérez, R. C., Chávez-Sánchez, M. C., & Páez-Osuna, F. (2020). Physiological changes in the hemolymph of juvenile shrimp *Litopenaeus vannamei* to sublethal nitrite and nitrate stress in low-salinity waters. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 80, Article 103472. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2020.103472>

Valenzuela Quiñonez, W., Rodríguez Quiroz, G., & Esparza Leal, H. M. (2010). Cultivo intensivo de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (Boone) en agua de pozo de baja salinidad como alternativa acuícola para zonas de alta marginación. *Ra Ximhai*, 6(001), Article 001.

Xian, J.-A., Zhang, X.-X., Wang, D.-M., Li, J.-T., Zheng, P.-H. & Lu, Y.-P. (2017). Various cellular responses of different shrimp haemocyte subpopulations to lipopolysaccharide stimulation. *Fish & Shellfish Immunology*, 69, 195-199. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.08.025>

Yoganandhan, K., Thirupathi, S. & Sahul Hameed, A. S. (2003). Biochemical, physiological and hematological changes in white spot syndrome virus-infected shrimp, *Penaeus indicus*. *Aquaculture*, 221(1-4), 1-11. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(02\)00220-X](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00220-X)