

## Efecto de la infección de *Aeromonas salmonicida* sobre hemocitos en hembras adultas de *Cryphiops caementarius*

Carlos A. Azañero Díaz<sup>1</sup>, Cesar A. Jara Campos<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidad Nacional del Santa, Facultad de Ciencias; cazanerod67@yahoo.com

<sup>2</sup>Universidad Nacional de Trujillo, Facultad de Ciencias Biológicas; cesarj75@hotmail.com

Recibido: 22-02-2014

Aceptado: 06-05-2014

### RESUMEN

Se evaluó el efecto de la infección experimental de *Aeromonas salmonicida* sobre el número total (NTH) y diferencial (NDH) de hemocitos en hembras adultas de *Cryphiops caementarius*. Se emplearon 60 hembras adultas de *C. caementarius*, en estado de muda C y/o D, con un peso y longitud promedio de  $2,90 \pm 0,16$  a  $5,05 \pm 1,44$  g y  $4,52 \pm 0,31$  a  $5,53 \pm 0,52$  cm respectivamente. El diseño experimental fue completamente aleatorio con dos tratamientos (CONTROL y EXPERIMENTAL) y 6 ejemplares en cada tratamiento para cada tiempo a las 0 (Basal, antes de la infección), 12, 24, 48 y 72 h después de la infección. Los ejemplares del tratamiento EXPERIMENTAL fueron inoculados 0,050 ml de la suspensión de células viables de  $5 \times 10^7$  CFU.ml<sup>-1</sup> de *A. salmonicida* en el sinus ventral a través de la base del primer pleópodo del segmento abdominal. Los ejemplares del tratamiento CONTROL fueron inoculados con 0,050 ml de SSF estéril. Las muestras de hemolinfa fueron tomadas del sinus pericárdico para determinar el NTH y NDH. El NTH en hembras adultas de *C. caementarius* infectados experimentalmente con *A. salmonicida*, disminuye significativamente a las 12 h y a las 48 h, con un aumento a las 24 h, sin diferencias significativas, en relación al basal, pero siendo significativamente diferente ( $p < 0,05$ ) a las 12, 48 y 72 horas. Los semigranulocitos mostraron los mayores valores a las 24 horas en relación a los hialinos y granulocitos, sin existir diferencias significativas a las 12h, 48h y 72h. El hemocitograma (NTH y NDH), es considerado como un parámetro inmunitario indicador del estado de salud y que se presenta como una opción viable importante en el diagnóstico de enfermedades bacterianas en el camarón de río.

**Palabras clave:** *Cryphiops caementarius*, *Aeromonas salmonicida*, hemocitograma (NTH y NDH).

### ABSTRACT

It was evaluated the effect of experimental infection of *Aeromonas salmonicida* on the total number (NTH) and differential (NDH) of hemocytes in adult female *Cryphiops caementarius*. It were used 60 adult females *C. caementarius*, molt state C and / or D, weight and average length of  $2.90 \pm 0.16$  to  $5.05 \pm 1.44$  g and  $4.52 \pm 0.31$  to  $5.53 \pm 0.52$  cm respectively. The experimental design was completely randomized with two treatments (control and experimental) and 6 specimens in each treatment for each time at 0 (Basal, before infection), 12, 24, 48 and 72 h after infection. The specimens of the experimental treatment were inoculated 0,050 ml of the suspension of  $5 \times 10^7$  CFU.ml<sup>-1</sup> viable cells *A. salmonicida* in the ventral sinus through the base of the first pleopod the abdominal segment. Copies of CONTROL treatment were inoculated with 0,050 ml of sterile PSS. Hemolymph samples were taken from the pericardial sinus to determine the NTH and NDH. The NTH in adult females of *C. caementarius* experimentally infected with *A. salmonicida*, significantly decreased at 12 h and 48 h, up to 24 h, with no significant differences relative to baseline, but still significantly different ( $p < 0.05$ ) at 12, 48 and 72 hours. The semigranulocitos showed the highest values at 24 hours relative to granulocytes and hyaline, with no significant differences at 12h, 48h and 72h. The hemocitograma (NTH and NDH), is considered as an immune parameter indicator of health status and is presented as an important viable option in the diagnosis of bacterial diseases in shrimp river.

**Keywords:** *Cryphiops caementarius*, *Aeromonas salmonicida*, hemocitograma (NTH and NDH).

## I. INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas, la intensificación del cultivo de especies de crustáceos ha estado acompañada por el desarrollo de enfermedades infecciosas virales, bacterianas y, en algunos de casos, de hongos (Aguirre y Asencio, 2000) como consecuencia de factores estresantes y condiciones ambientales adversas, muchas veces iniciadas por lesiones físicas o lesiones por parásitos (Ponce *et al.*, 2005). Especies de *Pseudomonas*, *Aeromonas* y *Vibrio* conforman la microbiota heterotrófica normal de camarones en criaderos de Malasia (Kennedy, *et al.*, 2006). Sin embargo, Cañas *et al.* (2001) observaron que la presencia de bacterias epibióticas en *Macrobrachium* se asocian a “la enfermedad del caparazón” cuando ocurren daños mecánicos y mala calidad del agua de cultivo. A esta enfermedad se le conoce también como, necrosis bacilar o mancha negra, producida por diferentes especies de *Pseudomonas* y/o *Aeromonas*. Por otro lado, se ha observado que *Vibrio harvey*, causante de la denominada “enfermedad bacteriana luminiscente”, provocó graves pérdidas de camarones juveniles en los criaderos en Filipinas (Tuyet, *et al.*, 1999). Así mismo, Tonguthai (1997) observó la ocurrencia de enfermedades en larvas del camarón *M. rosenbergii* bajo condiciones ambientales adversas, conocida como “necrosis bacteriana”, causada por *Leucothrix*, provocando una decoloración inicial a nivel de su cutícula y luego dejan de alimentarse, se debilitan y caen al fondo de la cisterna, llegando a presentar manchas marrones en las antenas y apéndices cefalotorácicos.

En crustáceos, los mecanismos de defensa innata se basan en componentes celulares y humorales del sistema circulatorio, que se interrelacionan para detectar y eliminar patógenos extraños (Van de Braak, 2002; Rendón y Balcazar, 2003) regulando el mecanismo de defensa y la reparación del daño (Vázquez *et al.* 1998). Los componentes celulares, los hemocitos, tiene su rol en las reacciones de defensa (Maldonado *et al.*, 2003) siendo capaces de realizar fagocitosis y encapsulación; formar nódulos y producir citotoxicidad (Lee, 2001; Van de Braak, 2002; Rendón y Balcazar, 2003). En *C. caementarius* se han detectado tres tipos de hemocitos circulantes: los hemocitos hialinos o hialinocitos (H), los hemocitos semigranulosos (SG) que contienen gránulos pequeños, son los más abundantes y los hemocitos granuloso (G) con gránulos grandes (Azañero *et al.* 2006). Estos últimos, intervienen en la fagocitosis, encapsulación, melanización (por la liberación del sistema profenoloxidasa proPO), y sintetizan y liberan péptidos antimicrobianos tales como las peneidinas (Martin y Hose, 1992; Johansson *et al.*, 2000; Rendón y Balcazar, 2003).

En general, un indicador de la salud en diferentes especies de invertebrados se refleja por una función inmunológica adecuada, relacionado con el estado de salud, lo cual es fácil de cuantificar. Los estudios han sido realizados teniendo en cuenta los cambios en los parámetros de la hemolinfa, utilizados para detectar las variaciones fisiológicas. Muchas variables, tales como el contenido total de proteínas de plasma, la concentración de glucosa, fosfatasa alcalina, tiempo de coagulación, recuento de hemocitos, la actividad de profenoloxidasa (proPO), el índice de fagocitosis, la liberación de intermediarios reactivos del oxígeno y la actividad antibacteriana, han sido considerados como marcadores potenciales para la salud o la enfermedad en los crustáceos (Van de Braak, 2002; Rodríguez y Le Moullac, 2000).

*C. caementarius* es una especie de importancia económica en el Perú ya que se sustenta en una pesquería comercial y los estudios para establecer un cultivo están siendo conducidos por diversas instituciones. Una vez en cultivo, esta especie no sería la excepción de verse afectada por enfermedades infecciosas; sin embargo, no existen reportes de estudios realizados en relación a enfermedades infecciosas y más aún relacionados con los mecanismos de defensa, por lo que una mejor comprensión de la respuesta inmunológica en estos crustáceos permitirá establecer diseños de estrategias más eficientes para el control de las enfermedades.

Por consiguiente, en este trabajo se ha investigado el efecto de la infección experimental de *Aeromonas salmonicida* sobre el número total (NTH) y diferencial (NDH) de hemocitos en hembras adultas de *Cryphops caementarius*.

## II. MATERIAL Y MÉTODOS

### 2.1 Objeto de estudio

El objeto de estudio en esta investigación estuvo constituido por 60 hembras adultas de *C. caementarius*, procedentes del río Pativilca (10° 49' 59" S y 77° 43' 09" O) distrito de Pativilca, Provincia de Barranca, Departamento de Lima, Perú, los cuales fueron trasladados al laboratorio de Acuicultura de la Universidad Nacional del Santa, para su aclimatación por una semana.

El experimento se realizó en el Laboratorio de Investigación en Patología e Inmunología de Organismos Acuáticos de la Universidad Nacional del Santa, Perú.

### 2.2 Equipos, instrumentos y materiales consumibles

Se utilizaron los siguientes equipos, materiales e instrumentos:

- Filtros Bio-Sponge Filter y Aquarium Pump para aclimatar las hembras adultas de *C. caementarius*.
- Cámara de Neubauer y un microscopio Leica DM LS2 de luz convencional de campo luminoso provisto de contraste de fases para la identificación de los tipos de hemocitos del camarón (Azañero *et al*, 2006) y la determinación del número total (NTH) y diferencial (NDH) de hemocitos.
- Sistema microbiológico automatizado VITEX 2 BIOERIEUX para la identificación de *A. salmonicida*.
- Oxímetro digital Hach LDO10± 0,01 mg l<sup>-1</sup> para la medición del oxígeno disuelto.
- Test colorimétricos Nutrafin ± 0,05 mg l<sup>-1</sup>, para la determinación de NO<sub>3</sub> (mg L<sup>-1</sup>) y NH<sub>4</sub> (mg L<sup>-1</sup>).
- Alimento balanceado para camarón (AquaFa con 25% de proteína cruda).

### 2.3 Métodos y técnicas

Una vez aclimatados las hembras adultas de *C. caementarius*, fueron distribuidos y mantenidos en dos acuarios de vidrio control y experimental de 120 l debidamente aireados con filtros Bio-Sponge Filter y Aquarium Pump y colocados individualmente en recipientes de plásticos polipropileno circulares transparentes de 14cm de diámetro y 6cm de profundidad, correspondiente a 154 cm<sup>2</sup> como área de la base. Las paredes de cada recipiente tenían aberturas y un tubo de PVC de 2 cm de diámetro. (Fig. 1).



**Fig. 1.** Sistema de crianza de hembras adultas de *C. caementarius* mediante disposición de recipientes en crianza individual

Durante el tiempo de la experiencia cada camarón fue alimentado *Ad Libitum* utilizando alimento balanceado para camarón (AquaFa con 25% de proteína cruda) a razón del % del peso total, y dos veces al día 8:00 am y 6:00pm. La limpieza de los acuarios se realizó diariamente por sifoneo de los desechos metabólicos sólidos y de los restos de alimento no consumido. Así mismo, durante la experiencia se determinó la temperatura (°C), O<sub>2</sub> disuelto (mg L<sup>-1</sup>) (Oxímetro digital Hach LDO10±

0,01 mg l<sup>-1</sup>), pH (pH-metro ± 0,01 unidades), NO<sub>3</sub> (mg L<sup>-1</sup>) y NH<sub>4</sub> (mg L<sup>-1</sup>) (Test colorimétricos Nutrafin ± 0,05 mg l<sup>-1</sup>).

### 2.3.1. Activación y preparación del inoculo de *A. salmonicida*

Para la infección experimental se empleó un cultivo de *A. salmonicida* aislada de larvas enfermas de *C. caementarius* e identificada por sistema microbiológico automatizado VITEX 2 BIOERIEUX, el cual fue conservado en medio TSA a 4°C en el laboratorio de Microbiología y Bioquímica de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional del Santa. La activación de *A. salmonicida* se hizo mediante el sembrado en agar TSA en frascos de penicilina, los cultivos fueron incubados por 24 h a 30°C. A partir de los cuales se preparó el inoculo, realizando una suspensión en solución salina fisiológica estéril y determinando la concentración de UFC. ml<sup>-1</sup> mediante turbidimetría, utilizando el tubo N° 3 del Nefelómetro de Mc Farland, (9x10<sup>8</sup> bacterias.ml<sup>-1</sup>).

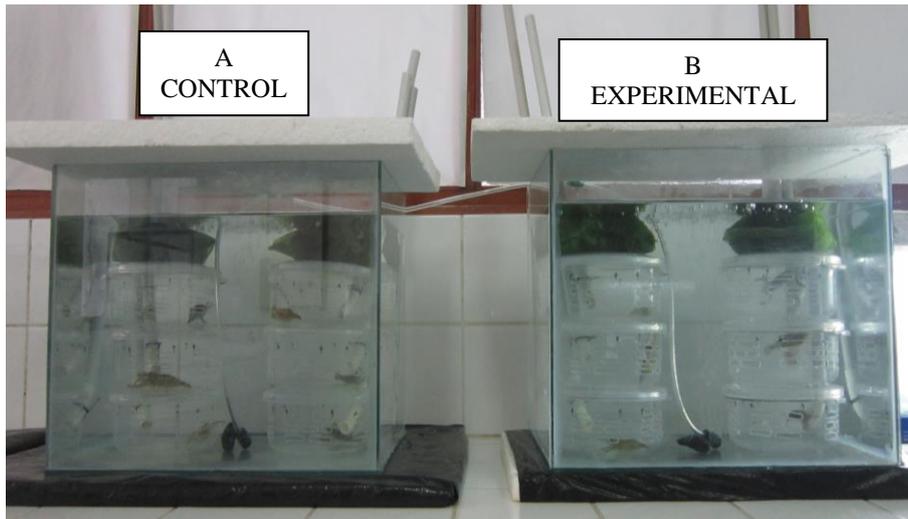
### 2.3.2. Infección experimental de *A. salmonicida* en hembras de *C. caementarius*

De los acuarios de mantención se seleccionaron 12 ejemplares en estado de muda C y/o D según Reyes & Luján (2003) y con un peso y longitud promedio de 2,900±0,1581 a 5,050±1,4391 g y 4,520±0,3114 a 5,533±0,5164 cm, respectivamente. A cada uno de los 6 ejemplares (grupo EXPERIMENTAL) fueron inoculados con 0,050 ml de la suspensión de células viables de 5x10<sup>7</sup> CFU.ml<sup>-1</sup> de *A. salmonicida* en el seno ventral a través de la base del primer pleópodo del segmento abdominal, previamente desinfectados con alcohol de 70° (Fig. 2), los otros 6 ejemplares (Grupo CONTROL) fueron inoculados con 0,050 ml de SSF estéril. Los ejemplares de cada grupo post inoculación fueron distribuidos en 2 acuarios de vidrio con 35 l, e individualmente en depósitos plásticos circulares debidamente acondicionados (Fig. 3). Se tomaron cada vez otros 12 ejemplares para ser evaluados a las 12, 24, 48 y 72 horas post-inoculación, respectivamente. Como basal, tiempo 0, se tomaron 12 ejemplares pre-inoculación, distribuidos con 6 ejemplares para el grupo control y 6 para el grupo experimental.

Fueron evaluados los signos clínicos teniendo en cuenta los cambios en el comportamiento y las características externas de los organismos; y la supervivencia en relación a la mortalidad.



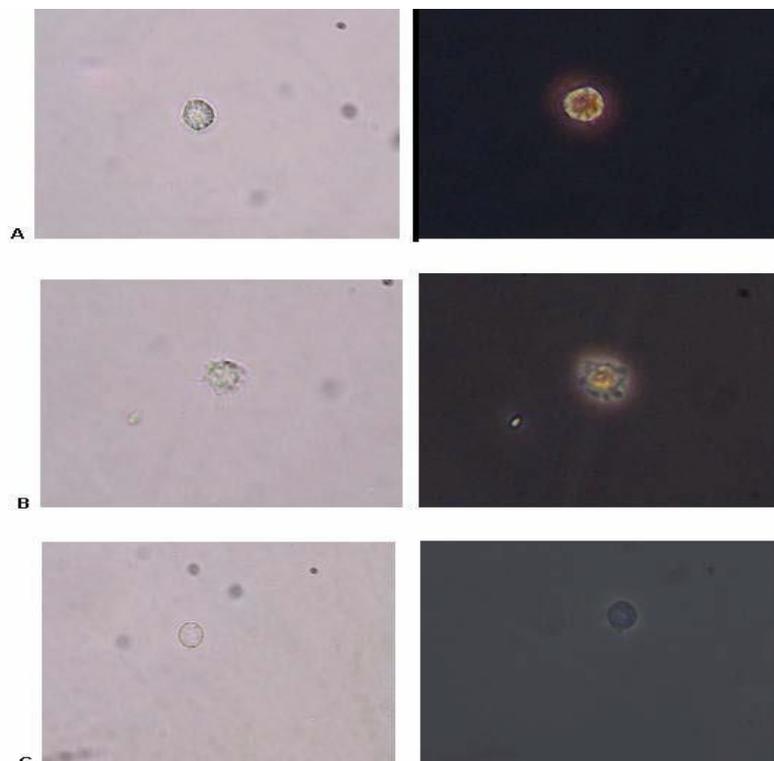
**Fig. 2.** Inoculación experimental de *A. salmonicida* en el seno ventral a través de la base del primer pleópodo del segmento abdominal.



**Fig. 3.** Hembras adultas de *C. caementarius* distribuidos individualmente en depósitos plásticos circulares debidamente acondicionados. A) Grupo control. B) Grupo experimental.

### 2.3.3. Determinación del NTH y NDH en hembras de *C. caementarius*

Post inoculación, y según el tiempo de evaluación, cada camarón tanto del grupo control y experimental fueron extraídos de los acuarios y se colocaron sobre una toalla secante con el fin de eliminar el agua en exceso. La hemolinfa fue obtenida del seno pericárdico usando una jeringa de 1 ml, según Jussila *et al.* (1997). Para la determinación del número total (NTH) y diferencial (NDH) de los hemocitos, se tomó un volumen de hemolinfa diluida 1/10 con anticoagulante Alsever modificado y se utilizó una cámara de Neubauer y un microscopio Leica DM LS2 de luz convencional de campo luminoso provisto de contraste de fases. La identificación se hizo teniendo en cuenta los tipos de hemocitos, según Azañero *et al* (2006) (Fig. 4). El NTH y NDH fue expresado en  $10^5$  células. $ml^{-1}$ , teniendo en cuenta la formula según Jussila (1999).



**Fig. 4.** Hemocitos de *C. caementarius*. Microscopia de Luz convencional de campo luminoso (Izquierda) y microscopia Luz convencional de contraste de fases (Derecha). Hemocito granuloso (A), hemocito semigranuloso (B) y hemocito hialino (C). Preparación en fresco. 40X.

### III. RESULTADOS

El número total (NTH) y diferencial (NDH) de hemocitos en hembras adultas de *C. caementarius* infectados experimentalmente con *A. salmonicida* se muestran en la tabla 1. El NTH en relación al tiempo 0, disminuye significativamente a las 12 h y a las 48 h, con un aumento a las 24 h, pero sin diferencias significativas. Se incrementa a las 24 horas post infección, siendo este el mayor valor ( $p < 0,05$ ) significativamente diferente a los valores a las 12, 48 y 72 horas (fig. 5). No se observan diferencias significativas en el grupo control.

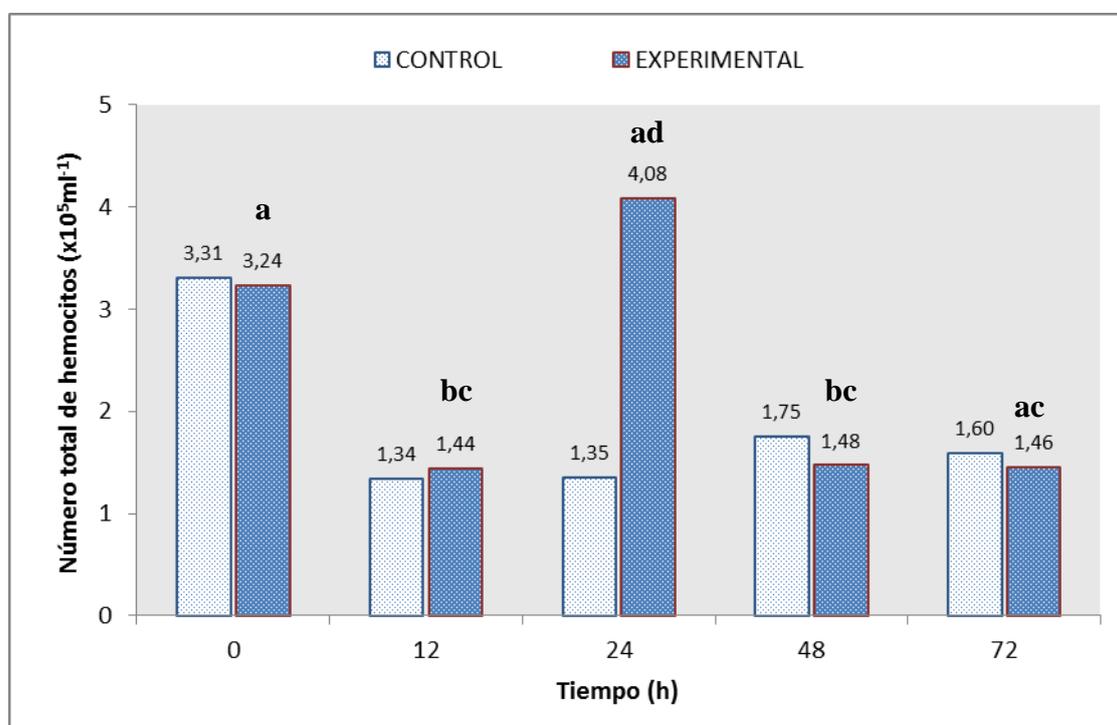
**Tabla 1:** Número total (NTH) y diferencial (NDH) de hemocitos promedios ( $\pm$ DE) de hembras adultas de *C. caementarius* infectados experimentalmente con *A. salmonicida*

TIEMPO (h)	TRATAMIENTO	Nro.	PESO (g)	LONGITUD (cm)	NUMERO DE HEMOCITOS				
					NTH (celx10 <sup>5</sup> )	NDH (celx10 <sup>5</sup> )			
						G	SG	H	
0	Control	6	3,3 $\pm$ 0,4	4,2 $\pm$ 0,5	3,31 $\pm$ 1,21	0,31 $\pm$ 0,05	2,80 $\pm$ 1,21	0,20 $\pm$ 0,08	
	Experimental	6	3,5 $\pm$ 0,6	4,7 $\pm$ 0,4	3,24 $\pm$ 0,73 <sup>a</sup>	0,44 $\pm$ 0,09 <sup>a</sup>	2,47 $\pm$ 0,77 <sup>a</sup>	0,31 $\pm$ 0,08 <sup>a</sup>	
12	Control	6	2,9 $\pm$ 0,1	4,5 $\pm$ 0,3	1,34 $\pm$ 0,37	0,07 $\pm$ 0,05	0,74 $\pm$ 0,25	0,53 $\pm$ 0,21	
	Experimental	6	3,0 $\pm$ 0,1	5,0 $\pm$ 0,2	1,44 $\pm$ 0,54 <sup>bc</sup>	0,05 $\pm$ 0,04 <sup>bc</sup>	0,88 $\pm$ 0,49 <sup>b</sup>	0,51 $\pm$ 0,03 <sup>bc</sup>	
24	Control	6	3,8 $\pm$ 1,1	5,2 $\pm$ 0,5	1,35 $\pm$ 0,70	0,11 $\pm$ 0,06	0,54 $\pm$ 0,32	0,70 $\pm$ 0,40	
	Experimental	6	4,1 $\pm$ 0,9	5,2 $\pm$ 0,4	4,08 $\pm$ 2,23 <sup>ad</sup>	0,63 $\pm$ 0,29 <sup>ad</sup>	2,18 $\pm$ 1,45	1,27 $\pm$ 0,73 <sup>bd</sup>	
48	Control	6	5,1 $\pm$ 1,4	5,5 $\pm$ 0,5	1,75 $\pm$ 1,10	0,07 $\pm$ 0,09	0,90 $\pm$ 0,82	0,79 $\pm$ 0,41	
	Experimental	6	4,9 $\pm$ 1,4	5,5 $\pm$ 0,5	1,48 $\pm$ 1,53 <sup>bc</sup>	0,16 $\pm$ 0,23 <sup>bc</sup>	0,90 $\pm$ 1,15	0,42 $\pm$ 0,15	
72	Control	6	4,5 $\pm$ 1,0	5,3 $\pm$ 0,4	1,60 $\pm$ 0,82	0,14 $\pm$ 0,11	0,94 $\pm$ 0,74	0,52 $\pm$ 0,34	
	Experimental	6	4,3 $\pm$ 1,1	5,3 $\pm$ 0,4	1,46 $\pm$ 2,21 <sup>ac</sup>	0,27 $\pm$ 0,56 <sup>ac</sup>	0,90 $\pm$ 1,40	0,29 $\pm$ 0,26	

Los valores con las letras a y b, c y d difieren estadísticamente para  $p < 0,05$  según prueba de Duncan

Control : Inoculados con 0,05ml de SSF estéril

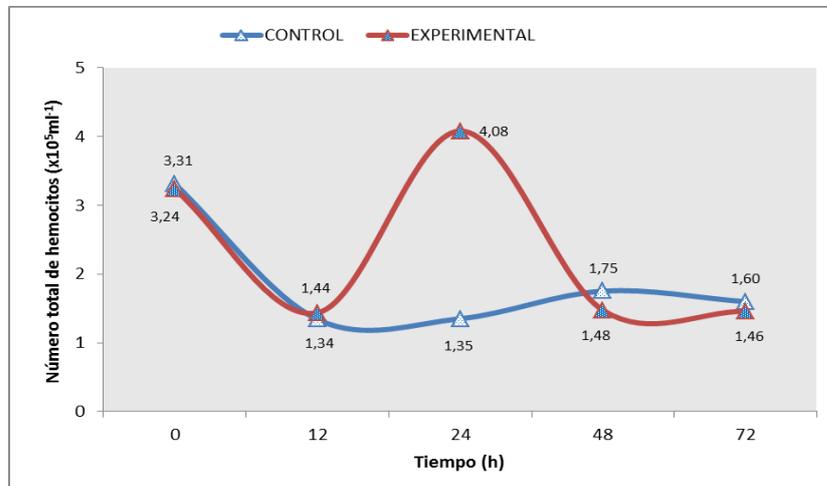
Experimental : Inoculados con 0,05ml de suspensión de  $5 \times 10^7$  CFU.ml<sup>-1</sup> de *Aeromonas salmonicida*



( $p < 0,05$ )

**Fig. 5.** Número total de hemocitos (NTH) ( $\times 10^5$ ml<sup>-1</sup>) promedios de *C. caementarius* infectados experimentalmente con *A. salmonicida*.

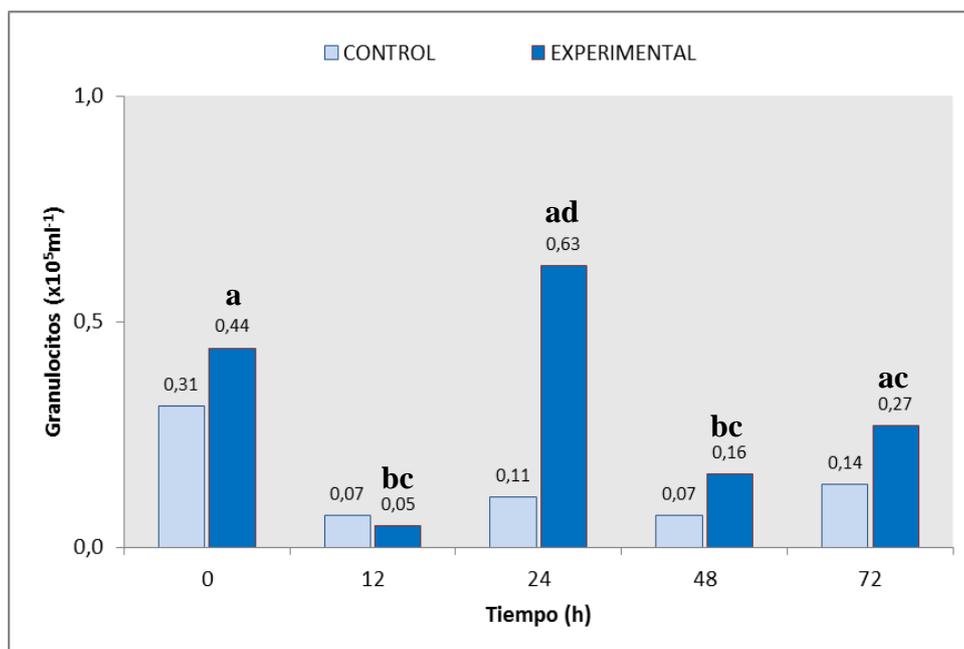
En la fig. 6, se observa la curva del NTH en relación al tiempo de infección, se ve a las 24 horas en el grupo experimental una tendencia ascendente bien marcada, significativamente diferentes a los otros tiempos, pero igual con el basal. Posteriormente se ve una disminución a las 48 horas y mantenerse significativamente iguales las 72 horas, pero ligeramente por debajo del grupo control, siendo en estos valores significativamente iguales.



(p < 0,05)

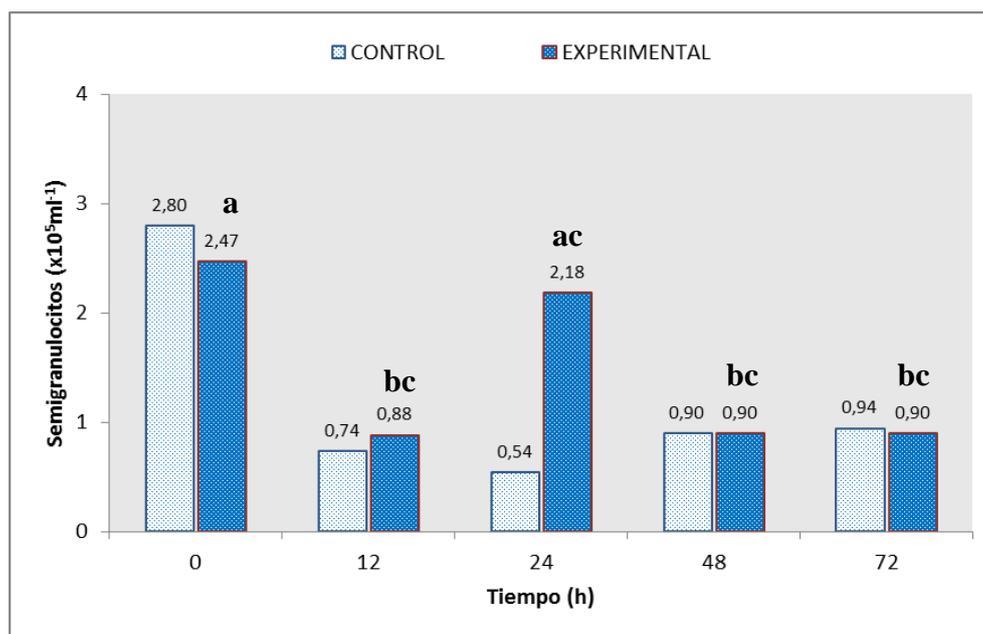
**Fig. 6.** Número total de hemocitos (NTH) (x10<sup>5</sup>ml<sup>-1</sup>) en relación al tiempo de *C. caementarius* infectados experimentalmente con *A. salmonicida*.

En la tabla 1 se observa que los semigranulocitos muestran los mayores valores en relación a los hialinocitos y granulocitos respectivamente. Se observa en la Fig. 7 y 8, que los granulocitos y semigranulocitos disminuyen a las 12 horas y 48 horas con diferencias significativas (p < 0,05) en relación al tiempo 0, pero aumentan a las 24 horas, sin diferencias significativas (p > 0,05). Se observa además, que a las 72 horas los granulocitos no presentan diferencias significativas, pero si con los semigranulocitos en relación al basal. Los hialinocitos, menores que los granulocitos y semigranulocitos aumentan progresivamente a 12 y 24 horas, siendo estos significativamente diferentes a los del basal, para luego disminuir a las 48 y 72 horas sin diferencias significativas. (fig. 9).



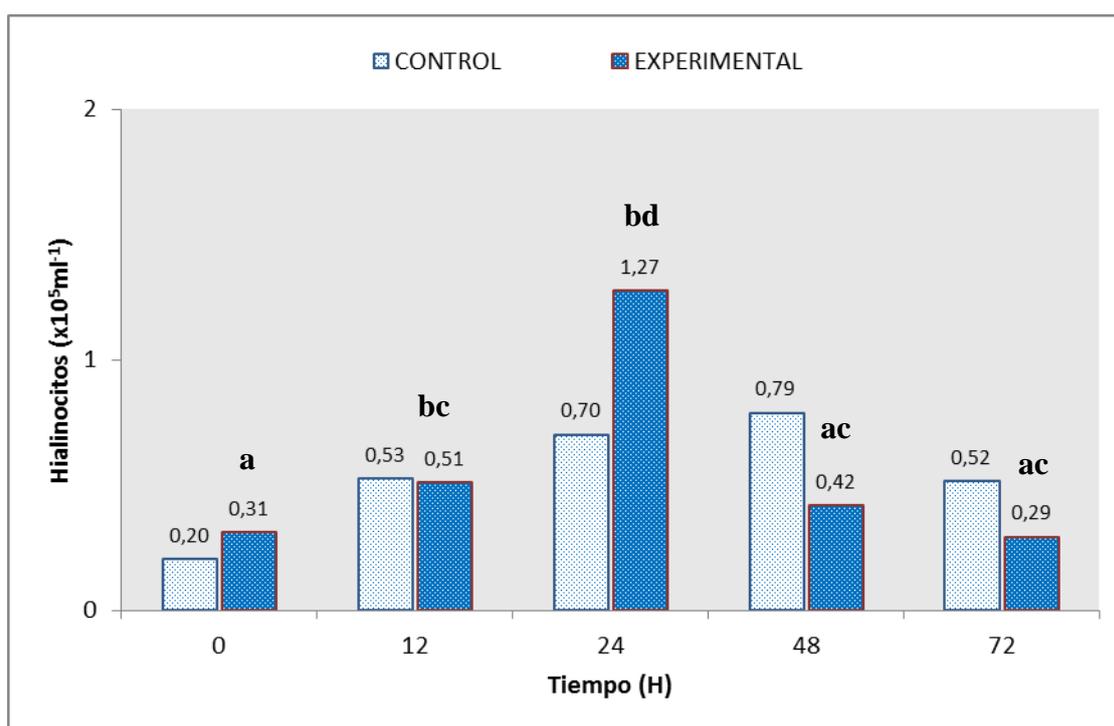
(p < 0,05)

**Fig. 7.** Numero de **granulocitos** (x10<sup>5</sup>ml<sup>-1</sup>) promedio de *C. caementarius* infectados experimentalmente con *A. salmonicida*.



(p&lt;0,05)

**Fig. 8.** Numero de **semigranulocitos** (x10<sup>5</sup>ml<sup>-1</sup>) de *C. caementarius* infectados experimentalmente con *A. salmonicida*.



(p&lt; 0,05)

**Fig. 9.** Numero de **hialinocitos** (x10<sup>5</sup>ml<sup>-1</sup>) promedio de *C. caementarius* infectados experimentalmente con *A. salmonicida*.

En relación a los signos clínicos se observaron ciertas manifestaciones post infección con *A. salmonicida* en algunos de los ejemplares camarones hembras adultas de *C. caementarius*, como, un ligero oscurecimiento del cuerpo a las primeras 12 y 24 horas de la infección, así como observar el cuerpo ligeramente encorvado. Durante las primeras 12 y 24 horas se mostraron poco activos frente

al tacto. Tanto en el grupo control y experimental durante las 12, 24, 48 y 72 horas post inoculación no se presentó mortalidad.

Los parámetros básicos de calidad de agua tanto de los grupos control y experimental se encontraron dentro de los rangos de valores considerados normales (Tabla 02).

Tabla 02: Parámetros físicos y químicos (media  $\pm$  desviación estándar) del agua de los acuarios durante la experiencia con *C. caementarius* infectados experimentalmente con *A. salmonicida*

Grupo	Parámetro de calidad de agua				
	T (°C)	O <sub>2</sub> (mg l <sup>-1</sup> )	pH	NO <sub>2</sub> (mg l <sup>-1</sup> )	NH <sub>3</sub> (mg l <sup>-1</sup> )
Control	24,98 $\pm$ 0,76	6,44 $\pm$ 0,08	7,66 $\pm$ 0,04	0,38 $\pm$ 0,29	0,15 $\pm$ 0,1
Experimental	25 $\pm$ 0,42	6,66 $\pm$ 0,07	7,71 $\pm$ 0,01	0,2 $\pm$ 0,12	0,15 $\pm$ 0,1

#### IV. DISCUSIÓN

La infección con *A. salmonicida* en hembras adultas de *C. caementarius* provocó a las 12 horas un descenso significativo del NTH, en relación al tiempo 0 basal, para luego incrementar a las 24 horas, siendo este el mayor valor ( $p < 0,05$ ) significativamente diferente a los valores a las 12, 48 y 72 horas post infección; sin embargo, no hubo diferencias significativas con los del grupo control (Fig. 5). Así mismo, en la fig. 6, se observa la curva del NTH en relación al tiempo de infección, en la cual se ve a las 24 horas en el grupo experimental una tendencia ascendente bien marcada, significativamente diferentes a los otros tiempos, disminuyendo a las 48 horas y manteniéndose significativamente igual a las 72 horas, pero ligeramente por debajo del grupo control, siendo estos valores significativamente iguales.

Supamattaya *et al* (2005) en individuos sanos de *P. monodon* determinaron un número total de hemocitos de  $10^4$  a  $10^5$  células/mm<sup>3</sup> mientras que los mantenidos en una ambiente desfavorable (por ejemplo, contenido bajo de oxígeno), o con infecciones bacterianas o virales, muestran una marcada disminución en el conteo de hemocitos, según nuestros resultados, tabla 1, esto coinciden a las 12 horas, pero difieren ya que se observa que el NTH, fue mayor a las 24 horas en el grupo experimental en relación a los del grupo control; sin embargo, Gullian (2001) frente a la inoculación de bacterias vivas en cultivos de *Penaeus vannamei*, demostró que el mecanismo celular no se mantiene activado, ya que la tasa de estimulación no difirió significativamente del control 12 horas después del último inóculo; esto es probable, que el mecanismos celular posea un pico de activación horas después del ingreso de alta carga antigénica, para luego disminuir en relación al agotamiento enzimático. Probablemente una de las razones de la disminución del NTH a las 12 horas en hemolinfa es que tras la inoculación los hemocitos se estarían infiltrando en la zona de inoculación, para luego aumentar a las 24 horas y bajar y mantenerse sus niveles.

Tal como se observa la fig. 6 el número de hemocitos de *C. caementarius*, frente a la infección con *A. salmonicida* aumento desde las 12 horas hasta las 24 horas post infección, esto debido a que el LPS presente en las bacterias Gram negativas como *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* y *A. salmonicida*, estaría estimulando la fagocitosis, similar a lo observado en las células sanguíneas de la langosta y el pargo rojo (Supamattaya *et al*, 2005). Tal como se conoce, los hemocitos presentan en sus membranas proteínas como la Lipopolysaccharide Binding Protein (LPSBP) quien reconoce los lipopolisacáridos (Rendon y Balcazar, 2003; Cooper, 2002), esta proteína fue descrita como una aglutinina y es capaz de aglutinar bacterias, una vez que reacciona con el LPS o bacterias, esta proteína se une a los hemocitos y estimula la fagocitosis.

Según nuestros resultados, en lo que respecta al NDH, en la tabla 1 se puede observar que los semigranulocitos muestran los mayores valores en relación a los hialinocitos y granulocitos respectivamente. Los granulocitos y hialinocitos a las 24 horas en los grupos experimentales mostraron un incremento con diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en relación a los otros tiempos (fig. 7 y fig. 8, respectivamente); sin embargo, los semigranulocitos mostraron valores significativamente iguales ( $p > 0,05$ ) entre los diferentes tiempos (fig. 9).

Los hemocitos presentes en la hemolinfa de los crustáceos presentan péptidos antimicrobianos (peneidinas) que constituyen proteínas con actividades antibacterianas y antifungales, estos en los hemocitos son sintetizados y almacenados dentro de gránulos citoplasmáticos (Rendon y Balcazar, 2003). Lo anterior estaría relacionado con nuestros resultados debido a que dichos gránulos presentes en los semigranulocitos y granulocitos, principalmente en los semigranulocitos, tal como se observa, en las figuras 7, 8 y 9, estarían cumpliendo dicha función lo cual se demuestra con el aumento a las 24 horas.

Jones, (1999) manifiesta que la importancia relativa de los mecanismos de defensa celular y humoral en langostas aún no se ha determinado; sin embargo, parece ser que los hemocitos, semigranulocitos y granulocitos circulantes desempeñan un papel central a través de su participación en inmunoreconocimiento y en los procesos de neutralización y eliminación de agentes extraños, esto por emisión de pseudópodos y participación de factores humorales, tal como ocurre en respuesta a *Vibrio* sp., siendo la fagocitosis el principal mecanismo de defensa observado. En nuestra experiencia, *A. salmonicida*, una bacteria Gramnegativa, estaría siendo fagocitada por los hemocitos durante las primeras 12 horas hasta las 24 horas, tal como se observa, evitando su diseminación posterior.

Cheng *et al.*, (2003) observaron que la inyección de bacterias en *Carcinus maenas* causa haemocytopenia marcado *in vivo*, con altas cargas de bacterias que se está eliminando rápidamente de la circulación; así mismo, el conteo de hemocitos de *P. japonicus* posterior a la inyección del material bacteriano o extraño es compensada por la proliferación de hemocitos circulantes. Por otro lado, el NTH de *M. rosenbergii*, 6 h después de la inyección con suspensiones de carbono polvo o *Enterococcus* aumentó, pero disminuyó significativamente después de 30 h, aumentando a las 54 y 66 h de la inyección. El aumento 6 h después de la inyección de material extraño se considera debido a la movilización de la reserva de hemocitos, y la disminución después de 30 h y 42 h de la inyección con material extraño se considera que se relaciona con los hemocitos que fagocitan partículas extrañas, y luego migran a los órganos específicos del cuerpo (por ejemplo: branquias, intestino y hepatopáncreas) o para formar numerosos nódulos pequeños en el sitio de inyección, sin embargo, la recuperación después de 54 h y 66 h de inyección puede ser compensado por un aumento en la proliferación de hemocitos circulantes. Lo anterior se relaciona con lo ocurrido en el caso del comportamiento del NTH y NDH en especial con los semigranulocitos, según se observa en las figuras 5, 6, 7, 8 y 9.

Las enfermedades en acuicultura, vienen provocando anualmente pérdidas millonarias, por lo que la prevención y control encierra la mayor importancia a este problema. Gran parte de las enfermedades son causadas por virus y bacterias (Rendon y Balcazar, 2003). Una de las principales causas de pérdidas en la crianza intensiva del camarón de agua dulce *Macrobrachium rosenbergii* se da por una infección por agentes bacterianos quitinolíticos, representados por especies de la familia Vibrionacea, presentes en agua dulce y saladas. Estos en condiciones ambientales adecuados no son patógenos, pero son oportunistas pudiendo instalarse a partir de lesiones del exoesqueleto. Así mismo, otros factores agravantes son una calidad inadecuada del agua, acumulación de restos alimenticios y detritos en los estanques, superpoblación y alimento alterado. Estas bacterias quitinolíticas, como *Aeromonas* sp., *Pseudomonas* sp. y *Vibrio* sp. causan la enfermedad conocida como necrosis bacteriana o "black spot" (Hipolito, *et al.* 1996). En nuestra experiencia, las condiciones ambientales y alimentación se mantuvo en condiciones óptimas y debidamente controladas durante toda la experiencia, la infección experimental con *A. salmonicida* en machos adultos de *C. caementarius* no provoco lesiones ni cambios graves evidentes en los ejemplares infectados, solo mostraron comportamientos y un ligero oscurecimiento en las primeras 12 horas.

Así mismo, Aguirre y Asencio (2000) reportan que *Benekea* spp., *Pseudomonas* spp., *Aeromonas* spp., *Spirillum*, spp son bacterias asociadas con enfermedad quitinolítica bacteriana, enfermedad de la concha, marrón, quemado, o enfermedad de las manchas negras y la enfermedad de la roya. Estas bacterias podrían afectar a todas las especies de peneidos sometidos a cultivos. El exoesqueleto de los organismos infectados se erosiona, necrotiza e inflama, y se melaniza, sembrando a una vibriosis.

Jones, (1999) manifiesta que el exoesqueleto de la langosta es una barrera efectiva que evita la entrada de agentes infecciosos, así como proporcionan anclaje muscular y proteger el tejido blando subyacente. Esto es muy difícil de penetrar, incluso para los agentes patógenos que secretan quitinasas extracelulares. Tras una lesión del exoesqueleto, se requiere el sellado rápido para evitar la pérdida de hemolinfa y minimizar la invasión oportunista. Las reacciones que conducen a la herida en la reparación langostas consisten de una rápida acumulación de hemocitos y la agregación en la zona de la herida seguida por una coagulación intravascular.

Según Supamattaya *et al* (2005) los problemas de enfermedades son comunes en *P. monodon*, siendo las enfermedades más importantes y conocidos causadas por el virus de la mancha blanca, el virus de la cabeza amarilla, y vibriosis, especialmente la enfermedad luminiscente causada por *Vibrio harveyi*, mostrando el efecto de estas tres enfermedades en camarones una reducción en el recuento de hemocitos y actividades fagocíticas en comparación con *P. monodon* saludables como control. Tal como se observó en nuestra experiencia el NTH y NDH, principalmente los semigranulocitos aumento. Está claro que las enfermedades infecciosas tienen un gran efecto en la composición de la hemolinfa y la función del sistema inmune en *P. monodon* ya que estos parámetros se ven alterados notablemente cuando se comparan los camarones infectados y sanos.

La infección experimental, no produjo mortalidad durante el tiempo que duró la experiencia, esto debido a la resistencia de los ejemplares, ya que se trabajó con adultos, siendo estos más resistentes a diferencia de los estadios larvales los cuales son más susceptibles, siempre y cuando se mantengan buenas condiciones de cultivo y una nutrición adecuada.

Trujillo, *et al.* (2005) estudiaron la mortalidad en camarones expuestos a una concentración de  $10^6$  ufc ml<sup>-1</sup> de *Vibrio* sp. o *V. parahaemolyticus*, presentándose diferencias significativas en su susceptibilidad a las diferentes cepas de Vibrio empleadas, lo que sugiere que existen diferencias en la patogenia generada por las diferentes especies y cepas de Vibrio, llegándose a generar la muerte de los organismos a las 240 h Post exposición (PE), observándose los síntomas de la enfermedad desde las 72 h PE. Dependiendo de la cepa, genera distintos porcentajes de mortalidad, lo que indica que la resistencia a los agentes patógenos puede estar relacionada con la especie de crustáceo, estadio y edad que se esté empleando. Por otro lado, es importante tomar en cuenta que las condiciones de laboratorio difieren de las condiciones obtenidas durante el cultivo. Ellos, utilizaron concentraciones de *V. harveyi* para infectar juveniles de *Penaeus monodon*, y reportaron mortalidades superiores al 50%. Infectaron con *Vibrio* sp. ( $10^7$  ufc ml) larvas de *Marsupenaeus japonicus*, *Artemia* sp. y *Palaemon pauceidens*, obteniendo sobrevivencias del 70-100%, lo que sugiere que la dosis bacteriana a la cual los camarones están expuestos puede ser un elemento significativo en términos de la patogenia. Por lo anterior, el cultivo de *A. salmonicida* a la dosis empleada de células viables de  $5 \times 10^7$  CFU.ml<sup>-1</sup> no resulto ser patógena para los ejemplares adultos machos de *C. caementarius*.

Los parámetros de calidad de agua durante la experiencia estuvieron dentro de los rangos normales, esto como se conoce para evitar el estrés, tal como lo manifiesta Supamattaya *et al* (2005), los parámetros importantes de calidad del agua en el cultivo de *P. monodon* incluyen parámetros físicos (como la transparencia y la temperatura), los parámetros químicos (pH, oxígeno disuelto (OD), la dureza, salinidad, requerimientos de cal para el suelo, alcalinidad, nitrito (NO<sup>2-</sup>), nitrato (NO<sup>3-</sup>), amoníaco (NH<sup>3+</sup>)), los factores biológicos (por ejemplo, la ecología, las especies microbianas, composición y abundancia de plancton).

Teniendo en cuenta que el cultivo de camarón ha tenido un impresionante crecimiento de importancia económica y social, en muchos países en desarrollo; sin embargo, ha sido afectada por enfermedades infecciosas, principalmente de etiología bacteriana y viral causando gran pérdida de producción. La sostenibilidad de la industria del camarón depende del control de la enfermedad y el estado de salud de los camarones; desde este punto de vista, el sistema inmunológico es una herramienta de valor para evaluar la salud del camarón. Varios autores han estado trabajando en la cuantificación de diferentes parámetros celulares y humorales de la respuesta inmune del cultivo de especies de camarón, tales como: el recuento de hemocitos, reactivos intermediarios del oxígeno (ROI), cuantificación de la actividad de fenoloxidasas (PO), medición de la actividad antibacteriana, determinación de la concentración de proteína plasmática, y anticuerpos específicos contra varias proteínas humorales. Para la aplicación de estos criterios inmunes en programas de control de la salud y de selección genética, es importante identificar los marcadores biológicos inmunes de resistencia a las enfermedades, por lo que es importante tener un modelo de infección experimental lo cual permita la correlación de los parámetros inmunológicos con la resistencia a las enfermedades; sin embargo, para llevar a cabo la vigilancia de la salud, es necesario controlar las actividades acuícolas, conociendo las condiciones ambientales y los valores normales y anormales de la respuesta inmune de camarones (Rodríguez y Le Moullac, 2000). La interpretación de resultados de las pruebas inmunes, debe hacerse considerando factores que interfieren directamente sobre cada uno de estos parámetros. En los camarones, están principalmente la edad, sexo, estado de muda, estrés (ambiental, nutricional o séptico) y condiciones sanitarias (presencia o ausencia de enfermedad); en el agua de cultivo está principalmente la temperatura, salinidad, pH, oxígeno disuelto y presencia de sustancias tóxicas (de origen químico o biológico). (Morales y Cuellar, 2008).

Por lo tanto, el uso de criterios de resistencia abre muchas posibilidades de investigación: los sobrevivientes de infecciones experimentales y camarones con alto nivel de expresión de marcadores de resistencia podría ser utilizada en la selección de los reproductores. Además, es importante para iniciar estudios sobre la heredabilidad de los parámetros inmunes. La aplicación de los conocimientos fundamentales de la inmunología y otras áreas de investigación, como la epidemiología y la genética, podrían contribuir a la mejora de las prácticas de gestión en acuicultura y en la domesticación de camarones adaptado a las condiciones de cría (Rodríguez y Le Moullac, 2000).

## V. CONCLUSIONES

1. El NTH en hembras adultas de *C. caementarius* infectados experimentalmente con *A. salmonicida*, disminuye significativamente a las 12 h y a las 48 h, con un aumento a las 24 h, sin diferencias significativas, en relación al basal, pero siendo significativamente diferente ( $p < 0,05$ ) a las 12, 48 y 72 horas.
2. Los semigranulocitos mostraron los mayores valores a las 24 horas en relación a los hialinos y granulocitos, sin existir diferencias significativas a las 12h, 48h y 72h.
3. El hemocitograma (NTH y NDH), es considerado como un parámetro inmunitario indicador del estado de salud y que se presenta como una opción viable importante en el diagnóstico de enfermedades bacterianas en el camarón de río.

## VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIRRE, G., ASENCIO, F. 2000. **Infectious disease in shrimp species with aquaculture potencial**. *Resent. Res. Desvl. Microbiology* **4**: 333-348.
- AZAÑERO, C.A., REYES, W., LUJAN, H. RODRIGUEZ, R., SAUCEDO, F. 2006. **Caracterización hemocitaria del Camarón de Río *Cryphiops caementarius* Molina, 1872 (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae) del río Lacramarca (Provincia del Santa, Departamento de Ancash, Perú)**. *CIVA 2006*. (<http://www.civa2006.org>.,1-8 Consultado el 12 de noviembre, 2007).

- CAÑAS, Y., FIGUEROA, Y., MORENO, C., GRAZIANI, C., VILLARROEL, E. 2001. **Bacterias epibióticas asociadas al camarón de río *Macrobrachium carcinus* en condiciones de cultivo y en medio natural.** IX CONGRESO LATINOAMERICANO SOBRE CIENCIAS DEL MAR San Andrés Isla, Colombia . Septiembre 16 – 20.
- CHENG, W., MING JUANG, F., TONG LI, J., CHUNG LIN, M., HUNG LIU, C.H., CHU CHEN, J. 2003. **The immune response of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* and its susceptibility to *Lactococcus garvieae* in relation to the moult stage.** *Aquaculture* **218**: 33-45.
- CONROY, D.A., CONROY, G. 1990. **Manual de Patología de los Camarones Peneidos.** 2da. Edic. Edit. Comercial Rivero. Maracay, Venezuela. 197 pp.
- COOPER, E.L. 2002. **Comparative Immunology.** *Current Pharmaceutical Design*, 8: 99-110.
- GULLIAN, M. 2001. **Estudio del efecto inmunoestimulante de bacterias pro bióticas asociadas al cultivo de *Penaeus vannamei*.** Tesis de grado. Escuela Superior Politécnica del Litoral. Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar. Guayaquil, Ecuador.
- HIPOLITO, M., BALDASI, L., PIRES, D. de C., LOMBARDI, J.V. 1996. **Prevalencia bacteriana em necrose de camarao de agua doce (*Macrobrachium rosenbergii*, Decapode, Palaemonidae).** B. Inst. Pesca, Sao Paulo, 23 (Unico): 13-20.
- JOHANSSON, M.W., KEYSER, P., SRITUNYALUCKSANA, K., SÖDERHÄLL, K. 2000. **Crustacean hemocytes and haematopoiesis.** *Aquaculture*, **191**: 45-52.
- JONES, B. 1999. **Cellular response to injury in spiny lobsters.** *Proceedings, International Symposium on Lobster Health Management*, Adelaide, September. Australia.
- JUSSILA, J. 1997. **Physiological Responses of Astacid and Parastacid Crayfishes (Crustacea: Decapoda) to conditions of intensive culture.** Doctoral dissertation. Department of Applied Zoology & Veterinary Medicine. University of Kuopio. Perth, Western Australia.
- JUSSILA, J., JAGO, J., TSVETNENKO, E., EVANS, L.H. 1999. **Effects of handling or injury disturbance on total hemocyte counts in western rock lobster (*Panulirus cygnus* George).** *Proceedings International Symposium on Lobster Health Management*.
- KENNEDY, B., VENUGOPAL, M.N., KARUNASAGAR, I. 2006. **Bacterial flora associated with the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*, in the hatchery system.** Elsevier. Department of Fishery Microbiology, Karnataka Veterinary, Animal and Fisheries Sciences University, College of Fisheries, Mangalore - 575 002, India.
- LEE, S.Y. 2001. **Initiation of Innate Immune responses in the Freshwater Crayfish *Pascifastacus leniusculus*.** Dissertation for the Degree of Doctor of Philosophy in Physiological. Uppsala University.
- MALDONADO, M., RODRIGUEZ, J., DE BLAS, I., ECHECARRIA, F. 2003. **Comportamiento hemocitario en familias de *Litopenaeus vannamei* desafiadas al WSSV.** CIVA 2003 (<http://www.civa2003.org>., 891-899, consultado el 16 de septiembre, 2012).
- MARTIN, G.G., HOSE, J.E. 1992. **Vascular Elements and Blood (Hemolymph).** *Microscopic Anatomy of Invertebrates*, **10**: 117-146.
- MORALES, V. Y J.CUÉLLAR. 2008. **Enfermedades virales pp. 55-114. En: Morales, V. y J. Cuéllar-Anjel (eds.). 2008. Guía Técnica - Patología e Inmunología de Camarones Peneidos.** Programa CYTED Red II-D Vannamei, Panamá, Rep. de Panamá.

- PONCE, J.T., GONZALES, R., ROMERO, O., FEBRERO, I., ARREDONDO, J., ESPARZA, H., GARCIA-ULLOA, M. 2005. **Enfermedades del camarón de agua dulce *Macrobrachium tenellum* y *M. rosenbergii* durante el cultivo comercial en estanques rústicos, en empresas rurales.** *Revista electrónica de Veterinaria REDVET*. VI (12)1-12.
- RENDON, L., BALCAZAR, J.L. 2003. **Inmunología de camarones: Conceptos básicos y recientes avances.** *Revista AquaTIC*, 19: 27-33.
- REYES, W.E., LUJÁN, H. 2003. **Estados y subestados del ciclo de muda del camarón de río (*Cryphiops caementarius* Molina, 1872) (Crustacea, Decapoda, Palaemonidae) en laboratorio.** *CIVA 2003* (<http://www.civa2003.org>: 808-817, consultado 11 de setiembre 2012).
- RODRIGUEZ, J., LE MOULLAC, G. 2000. **State of the art of immunological tolos and health control of penaeid shrimp.** *Aquaculture* 191: 109-119.
- SUPAMATTAYA, K., CHITTIWAN, V., BOONYARATPALIN, M. 2005. **Immunological factors in Black Tiger shrimp, *Penaeus monodon*, Fabricius. Nutritional biotechnology in the feed and food industries.** Proceedings of Alltech's 21st Annual Symposium, Lexington, Kentucky, USA, 22-25 May 2005.
- TONGUTHAI, K. 1997. **Diseases of the Freshwater Prawn, *Macrobrachium rosenbergii*.** *The Aquatic Animal Health Research Institute*. 4 (2).
- TRUJILLO, T., AGUIRRE-GUZMÁN, G., GENARO SÁNCHEZ, J., RÁBAGO-CASTRO, J. 2005. **Patogenicidad de *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio* sp. en juveniles de camarón blanco del Pacífico (*Litopenaeus vannamei* Boone, 1931).** *Ciencia y Mar*. IX (27): 11-18.
- TUYET HOA, T.T., HOANG, D.T., PHUONG, G.T. 1999. **Characterization and Pathogenicity of Vibrio Bacteria Isolated from Freshwater Prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) Hatcheries: Part 1: Isolation and Identification of Vibrio spp from Larval Stages** Institute for Marine Aquaculture, College of Agriculture, Can Tho University, Can Tho, Viet Nam.
- VAN de BRAAK, K. 2002. **Haemocitic defence in black tigre shrimp (*Penaeus monodon*).** Tesis PhD. Wageningen Institute of Animal Sciences, The Netherlands.
- VAZQUEZ, L., SIERRA, C., JUAREZ, S., AGUNDIS, C., ZAVALA, A., ZENTENO, E. 1998. **Mecanismos de inmunidad en crustaceos.** *Interciencia*, 23 (6): 344-348.