

Efecto de la infección de *Aeromonas salmonicida* sobre la actividad de fenoloxidasa en hembras adultas de *Cryphiops caementarius*

Carlos A. Azañero Díaz, César A. Jara Campos

¹Universidad Nacional del Santa, Facultad de Ciencias; cazanerod67@yahoo.com

²Universidad 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 la actividad de fenoloxidasa (PO) 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 5×10^7 CFU.ml⁻¹ 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 la PO. Los valores de PO de los tratamientos experimentales a las 24, 48 y 72 h son similares, en relación al tiempo 0 o basal y a los valores del grupo control, sin diferencias significativas ($p > 0,05$), pero existe diferencias significativas a las 12 h. La infección experimental con *A. salmonicida* en hembras adultas de *C. caementarius* mostró una regular actividad de PO sin diferencias significativas. La actividad de PO, acompañado de otros parámetros inmunitarios como el número total y diferencial de hemocitos podría ser considerado como un indicador del estado de salud y de importancia en el diagnóstico de enfermedades bacterianas en el camarón de río.

Palabras clave: *Cryphiops caementarius*, *Aeromonas salmonicida*, actividad de fenoloxidasa (PO).

ABSTRACT

It was evaluated the effect of experimental *Aeromonas salmonicida* infection on the activity of Phenoloxidase (PO) 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 ± 0.16 to 5.05 ± 1.44 g and 4.52 ± 0.31 to 5.53 ± 0.52 cm respectively. The experimental design was completely randomized with two treatments (control and experimental) and six 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 5×10^7 CFU.ml⁻¹ viable cells of *A. salmonicida* in the ventral sinus through the base of the first pleopod the abdominal segment. Copies of the CONTROL treatment were inoculated with 0,050 ml of sterile PSS. Hemolymph samples were taken from the pericardial sinus to determine the PO. PO values of experimental treatments at 24, 48 and 72 h are similar, relative to time 0 or baseline and the values of the control group, with no significant differences ($p > 0.05$), but there are significant differences in the 12 h. Experimental infection with *A. salmonicida* in adult females of *C. caementarius* showed regular PO activity without significant differences. The activity of PO, together with other immune parameters such as total and differential hemocyte could be considered as an indicator of health status and importance in the diagnosis of bacterial diseases in shrimp river.

Keywords: *Cryphiops caementarius*, *Aeromonas salmonicida*, Phenoloxidase activity (PO).

I. INTRODUCCIÓN

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 (Aguirre y Asencio, 2000), esto como consecuencia de factores estresantes y condiciones ambientales adversas, muchas veces iniciadas por lesiones físicas o lesiones por parásitos (Ponce et al., 2005). 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 (Rodríguez y Le Moullac, 2000).

Especies de los géneros *Pseudomonas* sp., *Aeromonas* sp. y *Vibrio* sp. conforman la microbiota heterótrofa normal de camarones (Kennedy et al., 2006); sin embargo, estas bacterias están asociadas a “la enfermedad del caparazón”, conocida como necrosis bacilar o mancha negra, observado en *Macrobrachium* sp., como consecuencia de daños mecánicos y mala calidad del agua de cultivo (Cañas et al., 2001). Así mismo, Tonguthai (1997) observó la ocurrencia de enfermedades en larvas del camarón *M. rosenbergii* conocida como “necrosis bacteriana”, causada por *Leucothrix*, provocando una decoloración inicial a nivel de su cutícula, llegando a presentar manchas marrones en las antenas y apéndices cefalotorácicos.

En los artrópodos la respuesta inmune se presenta en dos fases, una fase inmediata no inducible, generalmente asociada a los efectores celulares (hemocitos), quienes son responsables junto a otros fagocitos inmóviles, del proceso de fagocitosis y protagonizan los eventos de nodulación y encapsulación de invasores, ellos catalizan el proceso de coagulación y almacenan en su citoplasma las enzimas de la cascada profenoloxidasa (proPO), responsable de la melanización que acompaña la respuesta inflamatoria en todos los artrópodos. La segunda fase de la respuesta inmunitaria se caracteriza por la síntesis de varios efectores humorales, proteínas y péptidos con fuertes propiedades microbicidas, contra bacterias Grampositivas y Gramnegativas y hongos (Sotomayor, 2000). Por lo tanto, en los crustáceos, los mecanismos de defensa se basan en componentes celulares y humorales, que se interrelacionan para detectar y eliminar patógenos, que evidencian un peligro potencial para el hospedero (Van de Braak, 2002; Rendón y Balcazar, 2003), regulando y reparando el 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 fagocitar y encapsular, formar nódulos y producir citotoxicidad (Lee, 2001; Van de Braak, 2002; Rendón y Balcazar, 2003). En *C. caementarius*, Azañero et al., (2006) 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 granulosos (G) con gránulos grandes. Estos últimos, intervienen en la fagocitosis, encapsulación, melanización (por la liberación del sistema profenoloxidasa (proPO), y sintetizan y liberan péptidos antimicrobianos, como las peneidinas (Martin y Hose, 1992; Johansson et al., 2000; Rendón y Balcazar, 2003).

En diversos crustáceos se han realizado muchos estudios teniendo en cuenta los cambios en los parámetros de la hemolinfa, utilizados para detectar las variaciones fisiológicas, 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).

Uno de los parámetros inmunológicos de importancia en los camarones, es el sistema proPO, que al ser activado, se manifiesta en una serie de reacciones enzimáticas en cascada. Este sistema proPO, observada en crustáceos e insectos se encuentra en el interior de los gránulos de los hemocitos granulosos y semigranulosos que puede ser liberado por estimulación de péptidoglicanos (PG), β -glucanos o lipopolisacáridos (LPS). Una vez liberado el contenido granular, el proPO es activado en fenoloxidasa (PO), el cual es el responsable de la melanización, por oxidación de fenoles en quinonas los cuales se polimerizan en melanina. La melanina es un pigmento pardo-negro al cual, se le adjudican diversas propiedades biológicas tal como la inhibición de la actividad de enzimas bacterianas y fúngicas (Rendón y Balcazar, 2003). (Fig. 1).

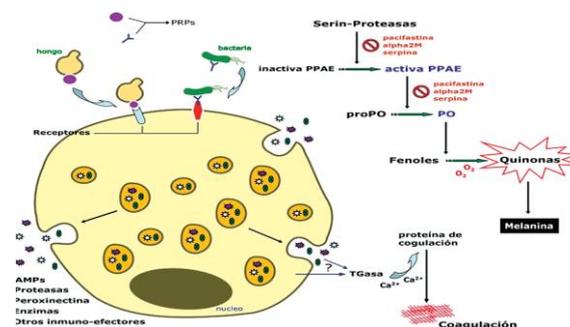


Fig. 1. Liberación de diferentes efectores inmunológicos (proPO) después de la activación de hemocitos por patógenos.

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 podría verse afectada por enfermedades infecciosas; sin embargo no existen reportes de estudios realizados en relación a enfermedades infecciosas relacionados con los parámetros inmunitarios, por lo tanto, una mejor comprensión de la respuesta inmunológica en estos crustáceos permitirá establecer diseños de estrategias más eficientes para el control de las enfermedades y sobretodo, como un indicador de la salud la cual se refleja por una función inmunológica adecuada, relacionado con el estado de salud.

Por consiguiente, en este trabajo se ha investigado el efecto de la infección experimental de *Aeromonas salmonicida* sobre la actividad de fenoloxidasas (PO) 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.

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*.
- Espectrofotómetro AQUAMATE PLUS UV-VIS de Thermo Fisher Scientific-USA, para la determinación de la actividad de la Fenoloxidasas (PO) (Hernandez-Lopez *et al*, 1996).
- Sistema microbiológico automatizado VITEX 2 BIOERIEUX para la identificación de *A. salmonicida*.
- Oxímetro digital Hach LDO10 ± 0,01 mg l⁻¹ para la medición del oxígeno disuelto.
- Test colorimétricos Nutrafin ± 0,05 mg l⁻¹, para la determinación de NO₃ (mg L⁻¹) y NH₄ (mg L⁻¹).
- 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 cm² como área de la base. Las paredes de cada recipiente tenían aberturas y un tubo de PVC de 2 cm de diámetro. (Fig. 2).

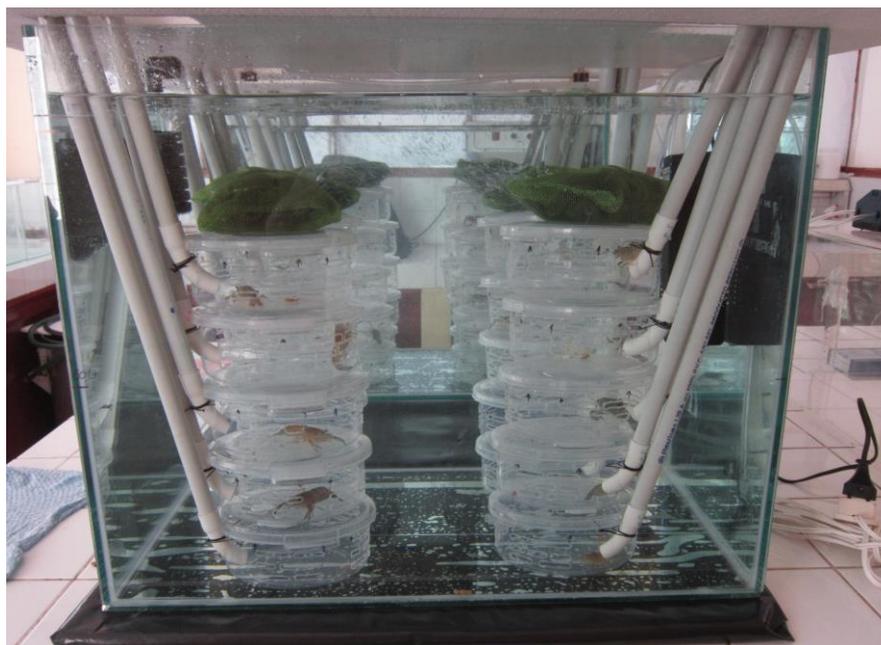


Fig. 2. Sistema de crianza de hembras adultas de *C. caementarius* mediante disposición de recipientes en crianza individual.

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 ($^{\circ}\text{C}$), O_2 disuelto (mg L^{-1}) (Oxímetro digital Hach LDO10 \pm 0,01 mg l^{-1}), pH (pH-metro \pm 0,01 unidades), NO_3 (mg L^{-1}) y NH_4 (mg L^{-1}) (Test colorimétricos Nutrafin \pm 0,05 mg l^{-1}).

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^{-1} mediante turbidimetría, utilizando el tubo N° 3 del Nefelómetro de Mc Farland, (9×10^8 bacterias. ml^{-1}).

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 $2,900 \pm 0,1581$ a $5,050 \pm 1,4391$ g y $4,520 \pm 0,3114$ a $5,533 \pm 0,5164$ cm, respectivamente. A cada uno de los 6 ejemplares (grupo EXPERIMENTAL) fueron inoculados con 0,050 ml de la suspensión de células viables de 5×10^7 CFU. ml^{-1} 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. 3), 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. 4). 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. 3. Inoculación experimental de *A. salmonicida* en el seno ventral a través de la base del primer pleópodo del segmento abdominal.

2.3.3. Determinación de la actividad de Fenoloxidasa (PO) 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. Las muestras de hemolinfa fueron tomadas del sinus pericárdico de cada camarón usando una jeringa de 1 ml (Insulin Syringe 26G 1/2), según Jussila et al. (1997), previamente bañada el interior con anticoagulante de Solucion Alsever modificada a 4°C (Van de Braak).

La actividad de la fenoloxidasa fue determinada según Hernández-López et al. (1996). Se preparo la suspensión celular, a partir de 100 µl de hemolinfa adicionado en un microtubo (Eppendorf) con 900 µl de solución Alsever modificado a 4°C (Van de Braak, 2002), luego se centrifugó a 4 °C x10' (3000 rpm), después se eliminó el sobrenadante y se re suspendió en 1 ml de Buffer Cacolidato – Citrato, volviéndose a centrifugar y eliminar el sobrenadante, para luego volver a resuspender en 200 µl de Buffer Cacolidato. Una vez obtenido la suspensión celular, se colocó 100 µl a un microtubo por duplicado (para la muestra y el control), se agregó 50 µl de Trypsina para la muestra y para el control se agregó Buffer Cacolidato en la misma cantidad, se dejó reposar entre 25 a 26 °C x 10', luego se agregó 50 µl de L-Dopa, se dejó reposar durante 5', por último se agregó 800 µl de Buffer Cacolidato, para leer la DO a 490 nm.

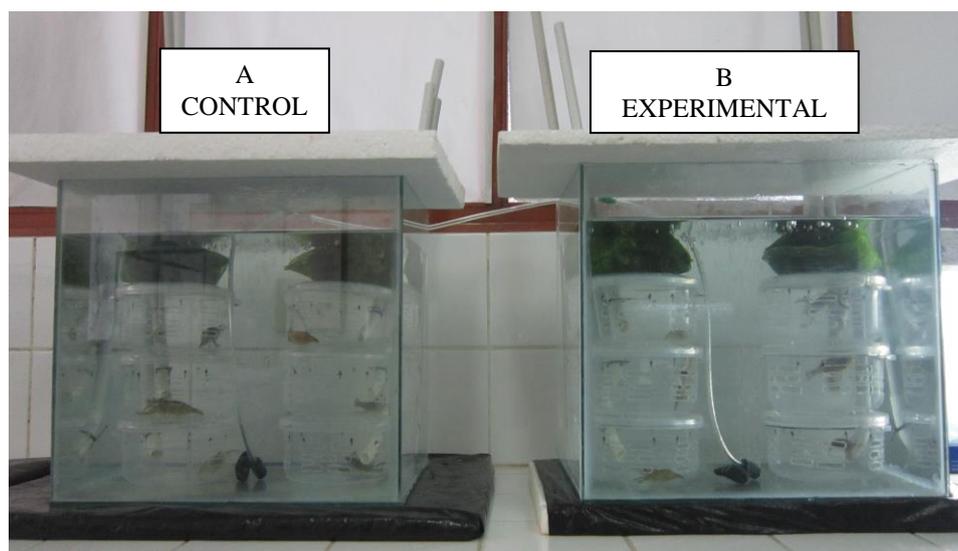


Fig. 4. Hembras adultas de *C. caementarius* distribuidos individualmente en depósitos plásticos circulares debidamente acondicionados. A) Grupo control. B) Grupo experimental.

III. RESULTADOS

Los valores de absorbancia de la actividad fenoloxidasa expresados en Dopacromo x 50 μ l de hemolinfa se muestran en la tabla 1. El análisis de la actividad fenoloxidasa inicial (Basal en tiempo 0) de los tratamientos control y experimental, es decir, antes de la infección, mostró valores de 0,013 y 0,015 respectivamente, sin diferencias significativas. Los valores de los tratamientos experimentales durante los diferentes tiempos son similares, sin diferencias significativas ($p > 0,05$), en relación a los valores del grupo control.

Tabla 01. Actividad fenoloxidasa (PO) promedio (\pm DE) de hembras adultas de *C. caementarius* infectados experimentalmente con *A. salmonicida*

TIEMPO (h)	TRATAMIENTO	NÚMERO	PESO (g)	LONGITUD (cm)	ACTIVIDAD FENOLOXIDASA (Dopacromo/50 μ hemolinfa)
0	Control	6	3,3 \pm 0,4	4,2 \pm 0,5	\pm 0,005 ^a
	Experimental	6	3,5 \pm 0,6	4,7 \pm 0,4	0,013 \pm 0,004 ^{ac}
12	Control	6	2,9 \pm 0,1	4,5 \pm 0,3	0,015 \pm 0,005 ^a
	Experimental	6	3,0 \pm 0,1	5,0 \pm 0,2	0,018 \pm 0,005 ^{bc}
24	Control	6	3,8 \pm 1,1	5,2 \pm 0,5	0,010 \pm 0,014 ^a
	Experimental	6	4,1 \pm 0,9	5,2 \pm 0,4	0,021 \pm 0,020 ^{ac}
48	Control	6	5,1 \pm 1,4	5,5 \pm 0,5	0,007 \pm 0,008 ^a
	Experimental	6	4,9 \pm 1,4	5,5 \pm 0,5	0,006 \pm 0,003 ^{ad}
72	Control	6	4,5 \pm 1,0	5,3 \pm 0,4	0,009 \pm 0,004 ^a
	Experimental	6	4,3 \pm 1,1	5,3 \pm 0,4	0,013 \pm 0,012 ^{ac}

Los valores con letras diferentes (a, b) entre los tratamientos (control y experimental) en cada tiempo difieren estadísticamente para $p < 0,05$ según prueba de ANOVA.

Los valores con letras diferentes entre los tratamientos experimentales (c, d) en cada tiempo difieren estadísticamente para $p < 0,05$ según prueba de ANOVA.

Control: Inoculados con 0,05ml de SSF estéril

Experimental: Inoculados con 0,05ml de suspensión de 5×10^7 CFU.ml⁻¹ de *Aeromonas salmonicida*

A las 12 h, después de la infección, los valores de PO disminuyeron ligeramente en relación a los valores basales, tiempo 0, para incrementarse a las 24 h, sin diferencias significativas, entre estos tiempos. Estos valores mostraron diferencias significativas con los observados a las 48 h, para luego aumentar a las 72 h, con valores similares a los basales. (fig. 5).

Los valores con letras diferentes (a, b) entre los tratamientos (control y experimental) en cada tiempo difieren estadísticamente para $p < 0,05$ según prueba de ANOVA.

Los valores con letras diferentes entre los tratamientos experimentales (c, d) en cada tiempo difieren estadísticamente para $p < 0,05$ según prueba de ANOVA.

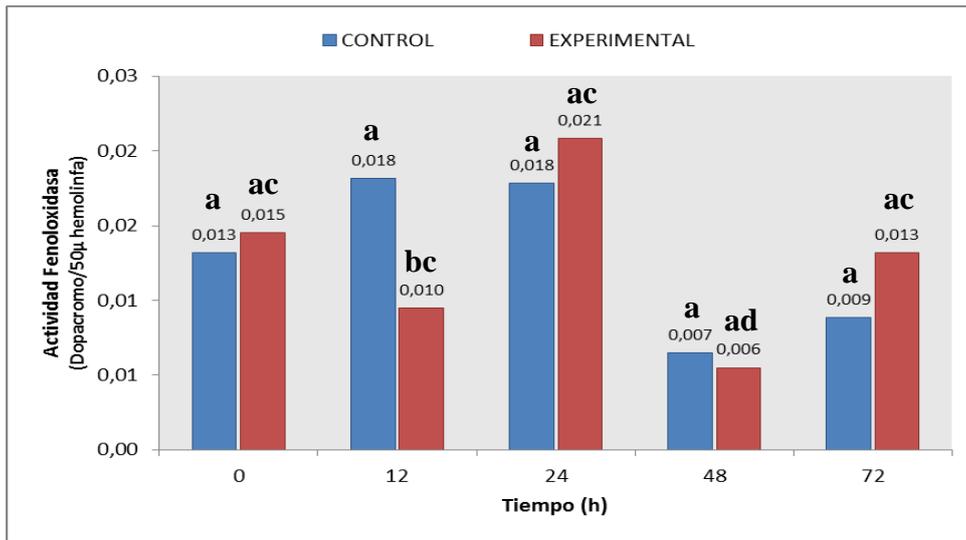


Fig. 5. Actividad fenoloxidasa (PO) (Dopacromo x 50µl de hemolinfa) en *C. caementarius* infectados experimentalmente con *A. salmonicida*.

La fig. 6 muestra el comportamiento de los tratamientos control y experimental de la actividad fenoloxidasa en relación al tiempo y en la que se observó valores entre ellos sin diferencias significativas a las 24, 48 y 72 h; sin embargo, se observó diferencias a las 12 h. En relación a los tratamientos experimentales se observa una variación fluctuante entre los tiempos, observándose un ligero descenso a las 12 h, pero mayor a las 48 horas y con diferencias significativas en relación al basal.

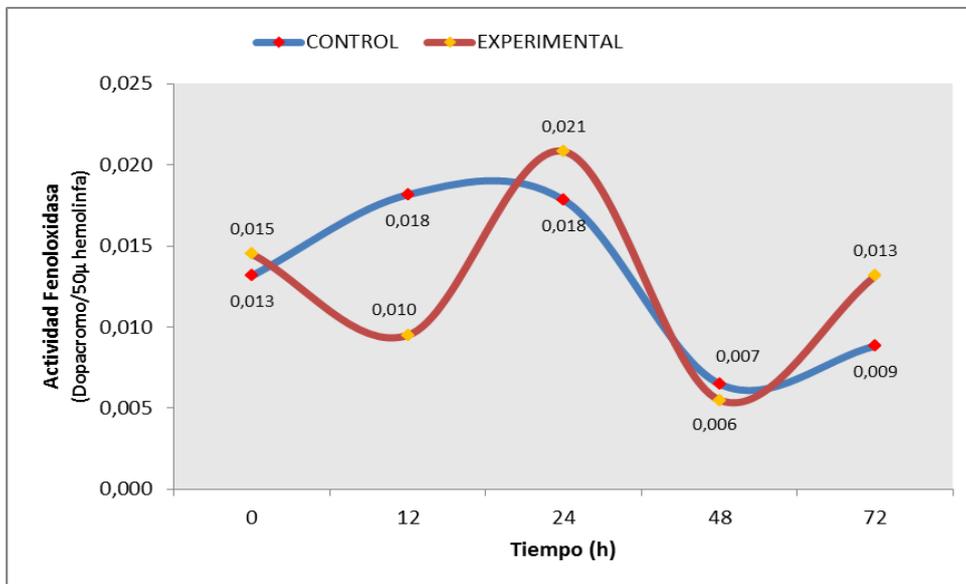


Fig. 6. Actividad de fenoloxidasa (PO) (Dopacromo/50µl de hemolinfa) en relación al tiempo de *C. caementarius* infectados experimentalmente con *A. salmonicida*.

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. camentarius* infectados experimentalmente con *A. salmonicida*.

Grupo	Parámetro de calidad de agua				
	T (°C)	O ₂ (mg l ⁻¹)	pH	NO ₂ (mg l ⁻¹)	NH ₃ (mg l ⁻¹)
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

En la inmunidad humoral de los crustáceos, la actividad del sistema de la proPO posee una función similar al sistema del complemento, ya que al ser activado, se manifiestan una serie de reacciones enzimáticas en cascada. En los crustáceos este sistema enzimático se encuentra como un precursor inactivo (proenzima) en la hemolinfa o en los hemocitos. La proPO, convierte a la tirosina en DOPA y a la DOPA en DOPA-quinona, siendo este último el precursor de la melanina. La melanina es un pigmento pardo-negro al cual, se le adjudican diversas propiedades biológicas tal como la inhibición de la actividad de enzimas bacterianas y fúngicas (Vásquez et al. 1998).

Los hemocitos juegan un papel central en la defensa inmune de los crustáceos, por que eliminan partículas extrañas en el hemocele por fagocitosis, encapsulación y nódulo-agregación, y por que participan en la cicatrización de heridas por aglutinación celular y la iniciación de los procesos de coagulación a través de la liberación de los factores necesarios para la gelificación de plasma, y el transporte y liberación de la profenoloxidasa (Rodríguez y Le Moullac, 2000). La PO es responsable del proceso de melanización en los artrópodos, siendo el resultado de la activación de la enzima proPO. El sistema de activación proPO ha sido muy bien estudiado en los crustáceos, especialmente en cangrejos de río. En los camarones peneidos, la primera obra en la formación de melanina fue descriptivo, centrado en observaciones histoquímicas de su presencia en sitios de inflamación con actividad hemocítica. El uso de estos diferentes métodos, la función del sistema ProPO puede entenderse en relación con el estado de salud de los camarones. Algunos estudios han demostrado que los ProPO podrían ser utilizados como marcadores de la salud y el medio ambiente ya que los cambios son correlacionados con el estado infeccioso y las variaciones ambientales.

Los valores de actividad de fenoloxidasa expresados en Dopacromo x 50 μ l de hemolinfa que se muestran en la Tabla 1 y las figuras 5 y 6, no muestran diferencias significativas; sin embargo, tales valores con comportamientos variados, sugieren tomarlos en cuenta, porque a pesar de no existir diferencias, estos datos reflejan una respuesta similar en otras experiencias, como los de Cheng et al. (2003) quienes observaron valores altos de PO en estadio C, en nuestro caso fueron estudiados ejemplares en estadios C, los cuales mostraron valores ligeramente elevados (tiempo 0).

El sistema proPO de los camarones se encuentra en el interior de los gránulos de los hemocitos granulados y semigranulosos que puede ser liberado por estimulación de las proteínas de unión en la superficie de los hemocitos al contacto con cuerpos extraños o agentes patógenos relacionados con sus compuestos tales como péptidoglicanos (PG), β -glucanos o lipopolisacáridos (LPS), una vez liberado el contenido granular por degranulación, la profenoloxidasa (proPO) es activado en fenoloxidasa (PO) (Supamattaya et al., 2005) (Rendon y Balcazar, 2003). La reducción altamente significativa de la actividad fenoloxidasa independientemente del tipo de inductor en langostas enfermas sugiere que esta prueba puede ser un indicador útil de la salud de cangrejos (Norton et al., 1999), similar comportamiento fue observado, según nuestros resultados, con una ligera reducción de la PO a las 12h y mayor a las 48h, lo cual sugiere ser un indicador de infección.

La inoculación de bacterias Gram negativas como *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* y *Aeromonas salmonicida* en la langosta y el pargo rojo (Supamattaya et al., 2005) provocaron un aumento en las células sanguíneas o hemocitos, y la estimulación de la fagocitosis, esto por la presencia del LPS en la pared celular de estas bacterias, quien reacciona con los receptores presentes en las membranas de los hemocitos como la Lipopolysaccharide Binding Protein (LPSBP) quien reconoce los lipopolisacáridos (Rendon y Balcazar, 2003; Cooper, 2002). Como se observa en la fig. 6, la PO presente en el interior de los gránulos de los hemocitos granulados y semigranulosos, estaría liberándose como consecuencia de la presencia de *A. salmonicida*, bacteria Gramnegativa la cual provoco la estimulación de los hemocitos, elevándose desde las 12 h post inoculación hasta las 24 h., esto se explica la elevación de la PO, directamente relacionada con la elevación de los hemocitos. Según Le Moullac et al. (1998) en el camarón, las reacciones de resistencia a patógenos están basadas en el número de hemocitos circulantes en la hemolinfa. Los camarones con un alto número de hemocitos resisten mejor a la infección que camarones con un bajo número de hemocitos. Esto sugiere que por los valores observados en relación a la actividad de PO, relacionado directamente con los hemocitos, los camarones en estudio fueron resistentes a la infección con *A. salmonicida*.

Las enfermedades en acuicultura son causadas generalmente por virus y bacterias (Rendon y Balcazar, 2003). En crianza intensiva del camarón de agua dulce *Macrobrachium rosenbergii* se ha observado una infección por agentes bacterianos quitinolíticos, de la familia Vibrionacea. Estos en condiciones ambientales adecuados no son patógenos, pero son oportunistas por lesiones del exoesqueleto y acompañados por una calidad inadecuada del agua, acumulación de restos alimenticios y detritos en los estanques, superpoblación y alimento alterado. Estas bacterias quitinolíticas, además de *Aeromonas* sp., *Pseudomonas* sp. y *Vibrio* sp. causan la enfermedad conocida como necrosis bacteriana o "black spot" (Hipolito, et al., 1996) en especies de peneidos sometidos a cultivos (Aguirre y Asencio, 2000). En nuestra experiencia, las condiciones ambientales y alimentación se mantuvieron en condiciones óptimas y debidamente controladas durante toda la experiencia, la infección experimental con *A. salmonicida* en hembras adultas 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, por el aumento de los hemocitos y la formación de melanina producto de la activación de la PO entre las 12 y 24 h después de la infección.

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^2), nitrato (NO^3), amoníaco (NH^3+), los factores biológicos (por ejemplo, la ecología, las especies microbianas, composición y abundancia de plancton).

Los estudios para evaluar los parámetros celulares y humorales como indicadores de la condición del camarón se llevan a cabo con la intención de desarrollar criterios para inspeccionar la sanidad y realizar programas de selección para camarones con alta resistencia a los patógenos (Guillan, 2001). Varios procedimientos cuantitativos han sido adaptados para evaluar la expresión de la respuesta inmune de los peneidos, tales como los parámetros celulares, el hemograma, la generación de intermediarios de radicales de oxígeno (ROIs) y la actividad fenoloxidasa (PO) los cuales han sido considerados como marcadores de salud, ya que sus cambios son correlacionados con el grado de infección y las variaciones ambientales, y los parámetros humorales como la actividad del plasma y la concentración de proteínas plasmáticas (Rodríguez y Le Moullac 2000).

Por lo anterior y teniendo en cuenta que 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 fenoloxidasa (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. La infección experimental con *A. salmonicida* en hembras adultas de *C. caementarius* mostró una regular actividad de PO sin diferencias significativas.
2. La actividad de PO, acompañado de otros parámetros inmunitarios como el número total y diferencial de hemocitos podría ser considerado como un indicador del estado de salud y de importancia en el diagnóstico de enfermedades bacterianas en el camarón de río.

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIRRE, G., ASECIO, F. 2000. **Infectious disease in shrimp species with aquaculture potencial**. Resent. Res. Desvl. Microbiology Vol. 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 05 de octubre, 2013).
- 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., JUANG, F-M., LI, J-T., LIN, M-CH., LIU, CH-H., CHEN, J-CH. 2003. **The immune response of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* and its susceptibility to *Lactococcus garviae* in relation to the moult stage**. Aquaculture Vol. 218:34-45.
- COOPER, E.L. 2002. **Comparative Immunology**. Current Pharmaceutical Design, Vol. 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.

- HERNANDEZ-LOPEZ, J., GOLLAS-GALVAN, T., VARGAS-ALBORES, F., 1996. **Activation of the prophenoloxidase system of the brown shrimp (*Penaeus californiensis* Holmes). Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology** 113, 61-66.
- 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, Vol. 23 (Único): 13-20.
- JOHANSSON, M.W., KEYSER, P., SRITUNYALUCKSANA, K., SÖDERHÄLL, K. 2000. **Crustacean hemocytes and haematopoiesis**. Aquaculture, Vol. 191: 45-52.
- 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.
- 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.
- LE MOULLAC, G., DE LABORIE, L.P., SAULNIER, D., GOARANT, C., DEHASQUE, M. 1998. **Principles and problems involved in the evaluation of immunostimulants on juvenile shrimp**. Páginas 1-12 in R.C. Cerecedo, B.M Claudia J. Perez Estrada, L. E. Cruz Suarez and D. Ricque Marie (editores), Avances de Nutrición Acuicola. Memorias del IV Simposium International de Nutrition Acuicola, La Paz, B.S.C., México.
- 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, Vol. 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 Penaeidos**. Programa CYTED Red II-D Vannamei, Panamá, Rep. de Panamá.
- NORTON, J.H., LEVY, N. Y FIELD, K. 1999. **A preliminary evaluation of 3 haemolymph tests to assess health status in tropical rock lobsters *Panulirus ornatus***. *Proceedings, International Symposium on Lobster Health Management, Adelaide*.
- 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 (Vol. 12)1-12.
- RENDON, L., BALCAZAR, J.L. 2003. **Inmunología de camarones: Conceptos básicos y recientes avances**. Revista AquaTIC, Vol. 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 Vol. 191: 109-119.
- SOTOMAYOR, M.A. 2000. **Obtención de un Modelo de Infección Experimental en Juveniles de *Penaeus vannamei*, con el *Vibrio vulnificus*.** Tesis de Grado. Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL). Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar. Ecuador.
- 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. Vol. 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.
- 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.