



**UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
MAESTRÍA EN CIENCIAS MANEJO SUSTENTABLE DE
RECURSOS BIOACUÁTICOS Y MEDIO AMBIENTE**

**Tesis de Grado para la obtención del Título de Magister en Ciencias con
Énfasis en Manejo Sustentable de Recursos Bioacuáticos y Medio Ambiente**

**EFECTO DE LA MODULACIÓN INMUNOLOGICA
EN LA SUPERVIVENCIA DEL CULTIVO DE
CAMARÓN *Litopenaeus vannamei***

BLGO. JONNY VALENZUELA GONZÁLEZ

GUAYAQUIL – ECUADOR

2013

CERTIFICACIÓN DEL TRIBUNAL DE SUSTENTACIÓN

**MSc. VILMA SALAZAR
PRESIDENTE DEL TRIBUNAL**

**DR. LUIS MUÑIZ
MIEMBRO DEL TRIBUNAL**

**MSc. JUAN CARLOS MURILLO
MIEMBRO DEL TRIBUNAL**

**DR. LUIS MUÑIZ
DIRECTOR DE MAESTRÍA**

**MSc. CARMITA BONIFAZ DE ELAO
DECANA**

DEDICATORIA.

A mi esposa e hijos, ya que ellos son el motor de mi vida, por ellos sigo adelante sin descuidar la meta, porque quiero ser su ejemplo a seguir.

A mis padres por darme la educación y el apoyo todo las veces que lo he necesitado.

Aquellos tesisistas que pasan largas horas de trabajo buscando respuestas, y que encuentren en esta tesis un tema de continuidad para una futura investigación.

AGRADECIMIENTOS.

A Dios Todopoderoso por darme la fuerza necesaria para realizar esta investigación.

A la Sra. Isabel Durango Dubois propietaria de la Compañía Corporeal y la Blga. Silvia Medranda administradora del laboratorio Acuagestión por facilitar las instalaciones y su apoyo para la realización de este trabajo.

A mi tutora la Msc. Vilma Salazar por compartir sus conocimientos conmigo.

A mi amiga y colega Milviana Maldonado por su apoyo en la elaboración de este trabajo.

INDICE GENERAL.

INDICE GENERAL.	v
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Justificación.....	2
1.2. Hipótesis.....	2
1.3. Objetivo general.....	3
1.3.1. Objetivos específicos.	3
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
2.1. Tipos de hemocitos.	5
2.2. Respuesta inmune asociada a las enfermedades virales.....	12
2.3. Reacciones de defensa.....	13
2.4. Sustancias inmunoestimulantes como alternativas.	14
2.5. El uso práctico de inmunoestimulantes.....	15
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
3.1. Área de estudio.....	16
3.2. Material biológico.	17
3.3. Preparación y aplicación de la mezcla del inmunomodulador con el alimento balanceado.....	17
3.4. Toma de muestra.	18
3.5. Preparación de reactivo.	19
3.6. Extracción de la hemolinfa.....	19
3.7. Conteo de Hemocitos.	20
3.8. Salud aparente, peso final de cosecha, supervivencia, biomasa y factor de conversión alimentaria.	21
3.9. Diseño y análisis estadístico.....	22
4. RESULTADOS.	25

4.1.	Efectos del inmunomodulador sobre la respuesta inmune del camarón.	25
4.2.	Efectos del inmunomodulador sobre la salud aparente del camarón.	27
4.3.	Efectos del inmunomodulador en el peso final de cosecha, supervivencia, biomasa y factor de conversión.....	29
5.	DISCUSIÓN.....	32
6.	CONCLUSIONES.....	36
7.	RECOMENDACIONES	38
8.	LITERATURA CITADA.....	40
9.	GLOSARIO.....	45
10.	ANEXOS.....	49

INDICE DE CUADROS.

Cuadro 1. Codificación de las piscinas de estudio de la Camaronera.	17
Cuadro 2. Datos de la siembra de las piscinas	17
Cuadro 3. Valores de significancia para las pruebas Cochran y Hartley Barlett antes y después de la transformación logarítmica.	23
Cuadro 4. Estadística descriptiva para los conteos de hemocitos (en 10^6 Hemocitos / ml) agrupado por tratamiento.	25
Cuadro 5. Estadística descriptiva para los conteos de hemocitos (en 10^6 Hemocitos / ml) agrupado por semana de muestreo.....	25
Cuadro 6. Tabla de ANOVA para diferencia entre medias de conteo de hemocitos.	26
Cuadro 7. Estadística descriptiva para los porcentajes de camarones aparentemente enfermos agrupados por tratamiento.....	27
Cuadro 8. Tabla de ANOVA para diferencia entre medias de proporción de camarones aparentemente enfermos.	27
Cuadro 9. Estadística descriptiva y significancia (p), para peso promedio final; supervivencia; biomasa; y factor de conversión alimentaria, agrupados por tratamiento.....	29
Cuadro 10. Matriz de correlación entre piscinas para valores de concentración semanal de hemocitos. Los valores en negrilla son significantes con ($p<0.05$).	34

INDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Clasificación de Hemocitos.	5
Figura 2. Mecanismos de acción de los hemocitos.	6
Figura 3. Procesos celulares de defensa:	7
Figura 4. Ubicación de la camaronera en el Archipiélago de Jambeli.....	16
Figura 5. Hemocitos de <i>Litopenaeus vannamei</i> observados en cámara de Neubauer utilizando microscopio de contraste de fases y aumento de 400x.	20
Figura 6. Intervalos de confianza ($p=0.05$) de la media de concentración de hemocitos para los distintos tratamientos.	26
Figura 7. Intervalos de confianza ($p=0.05$) de la media de concentración de hemocitos durante las semanas de muestreo.	27
Figura 8. Intervalos de confianza ($p=0.05$) de la media de la proporción de camarones aparentemente enfermos para los distintos tratamientos.	28
Figura 9. Intervalos de confianza ($p=0.05$) de la media de la proporción de camarones aparentemente enfermos durante las semanas de muestreo.....	28
Figura 10. Diagrama de cajas para biomasa (en libras / hectárea) entre el tratamiento y el control. Las cajas representan la media más el error estándar, y las barras el intervalo de confianza ($p=0.05$).	29
Figura 11. Diagrama de cajas para factor de conversión alimentaria entre el tratamiento y el control. Las cajas representan la media más el error estándar, y las barras el intervalo de confianza ($p=0.05$).	30
Figura 12. Diagrama de cajas para supervivencia entre el tratamiento y el control. Las cajas representan la media más el error estándar, y las barras el intervalo de confianza ($p=0.05$).	30
Figura 13. Diagrama de cajas para peso promedio final entre el tratamiento y el control.....	31
Figura 14. Evolución de la concentración de hemocitos por semana de muestreo.	33

ABREVIATURAS.

CA	Factor de conversión alimentaria
et al	Y otros
g	Gramo
Has	Hectáreas
kg	Kilogramo
lbs	Libras
mg	Miligramo
ml	Mililitro
NHT	Número total de hemocitos
°C	Grados centígrados
p	Probabilidad
pH	Potencial de Hidrogeno
SE	Error estándar
ufc	Unidades formadoras de colonias
μl	Micro litro
UPS	Unidades practicas de salinidad

RESUMEN.

Se realizó un estudio donde se midió el efecto de la modulación inmunológica, en la concentración de hemocitos del camarón *Litopenaeus vannamei*. La experimentación se desarrolló por un periodo diez semanas. Los tratamientos utilizados consistieron en dosis de 2g, 4g y 6g de inmunomodulador por kilogramo de alimento balanceado, además del control sin inmunomodulador. Se alimentó diariamente a los camarones, regulando la cantidad mediante el uso de comederos de control.

Semanalmente, desde la cuarta hasta la decimotercera semana, se determinó el número total de hemocitos. Adicionalmente se llevaron registros semanales de peso promedio y porcentaje de camarones aparentemente enfermos. Al final de la prueba se determinó la biomasa, peso promedio final, supervivencia y factor de conversión alimentaria para cada unidad experimental.

Se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) en la concentración de hemocitos entre el tratamiento de 6g/kg y el control, pero no entre este y los otros tratamientos, ni entre estos últimos y el control. Se detectó un efecto altamente significativo ($p < 0.01$) de la semana de muestreo, el cual aparentemente estaba relacionado a factores ambientales. No se encontró diferencias significativas ($p = 0.05$) entre las piscinas alimentadas con el inmunomodulador y las de control, para: biomasa, peso promedio final, supervivencia, ni factor de conversión alimentaria.

Palabras claves: Inmunomodulador; camarón.

ABSTRACT.

A study was performed which measured the effect of immune modulation in hemocytes concentration for *Litopenaeus vannamei* . The experiment was carried out for a period of ten weeks. The treatments consisted in doses of 2g, 4g and 6g of immunomodulador per kilogram feed, as well as control without immunomodulador. Shrimp was fed daily, regulating the amount using control feeders.

Every week, from the fourth to the thirteenth week, the total number of hemocytes was determined. Additionally, weekly average weight and percentage of apparently sick shrimp where recorded. At the end of the test; biomass, final mean weight, survival and feed conversion ratio where determined for each experimental unit.

Significant differences ($p < 0.05$) where found in the concentration of hemocytes between the 6g/kg treatment, and the control, but not between this and the other treatments, or between the later and control. A highly significant effect ($p < 0.01$) was detected for sampling week, which apparently was related to environmental factors. No significant difference ($p = 0.05$) between the control and immunomodulador ponds was found for: biomass, final mean weight, survival, and feed conversion.

Keywords: immunomodulador; shrimp.

1. INTRODUCCIÓN.

Las infecciones virales son comunes entre los invertebrados; sin embargo, se conoce poco acerca de la habilidad de estos organismos para controlarlas, lo cual se basa en el hecho de que carecen de defensas antivirales basadas en una inmunidad específica (Kurosky *et al.*, 2000).

El sistema inmune del camarón es el encargado, a través de los hemocitos, de mantener la buena salud del animal, ya que tiene la capacidad de reconocer y neutralizar moléculas nocivas que pueden venir del ambiente o de otras fuentes; es precisamente por eso que el presente trabajo se enfoca en la modulación del sistema inmunológico mediante compuestos extraídos de las paredes celulares de bacterias Gram -, Gram +, hongos y levaduras. Dichos compuestos son lipopolisacáridos, péptidoglicanos y los glucanos; que funcionan como antígenos para la expresión de los hemocitos.

Los hemocitos son las células que intervienen directamente en la respuesta del sistema inmune del camarón. Actualmente se realizan investigaciones para evaluar y mejorar el estado inmune de los camarones, así como para establecer estrategias que permitan el control de los virus en la acuicultura (Bachère, 2000). El uso de técnicas de diagnóstico simples y muy sensibles, altas temperaturas en los cultivos y la inmunoestimulación son algunas de las estrategias que pueden ser utilizadas en las granjas para prevenir las infecciones virales.

Desde el inicio de la actividad camaronera en el Ecuador, el sector ha ido evolucionando de diferentes maneras, una de ella es la técnica de cultivo la cual se ha visto influenciada por muchos factores; entre estos los ambientales.

La acuicultura en nuestro país se ha desarrollado durante muchos años sin un correcto control; razón por la cual la aplicación de productos fue de forma desmedida, causando un gran impacto ambiental a nivel de los ecosistemas y provocando la aparición de enfermedades.

A inicios de la década de 1990; ya había problemas con parásitos, virus y bacterias intra y extra celulares. Por esta razón, se implementaron laboratorios de patología para la detección de estas enfermedades. A finales de la década, el sector fue mermado de manera considerable por una de las enfermedades virales más letales hasta la fecha: el síndrome de la Mancha Blanca o White Spot (WSSV).

A pesar de que se conoce bastante acerca de las condiciones óptimas de cultivo y de los requerimientos nutricionales de los Peneidos, las enfermedades siguen causando estragos en los camarones de las piscinas. Esto se agrava debido a que las granjas camaroneras no cuentan con una herramienta fácil y rápida, que se la pueda aplicar in situ, y que permita conocer si un camarón se encuentra debidamente protegido contra cualquier enfermedad que se presente.

El alcance de este trabajo es proporcionar a los piscicultores una herramienta que les permita conocer el grado de protección que tienen los animales en los sistemas de cultivo, y de esa manera poder enfrentar de una manera más eficiente el posible evento de mortalidad a causa de enfermedades virales y bacterianas.

A través de este trabajo se conocerá si la modulación inmunológica en los camarones aumenta la supervivencia de *Litopenaeus vannamei* cultivados en piscina.

1.1. Justificación.

El estudio del sistema inmune del camarón es una herramienta útil para el diseño de estrategias que permitan mejorar la respuesta de defensa de este hacia patógenos potenciales.

Las investigaciones que se desarrollan en torno al conocimiento del sistema inmune de camarón están motivadas por el interés de mejorar el crecimiento, supervivencia y control sobre las enfermedades que afectan a este organismo; siendo estos componentes de gran relevancia en la producción en los sistemas de cultivo comercial del crustáceo.

Este tema surge por la razón de que los inmunoestimulantes han sido bien documentados en condiciones controladas de experimentación. No obstante a nivel de prácticas de campo se observan los verdaderos problemas de crecimiento, sin observarse en muchos casos el verdadero efecto de protección que se busca al emplear inmunomoduladores en la cría del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*

1.2. Hipótesis.

Los camarones cultivados con la aplicación del inmunomodulador en el balanceado presentan una mayor concentración *de* hemocitos, lo que influencia en una mejor respuesta inmunológica, y supervivencia.

1.3. Objetivo general.

Determinar el efecto de la modulación inmunológica en la respuesta inmune de los camarones *Litopenaeus vannamei* cultivados en piscinas.

1.3.1. Objetivos específicos.

- A. Evaluar la respuesta inmune del camarón al aplicar un inmunomodulador en el alimento balanceado.
- B. Determinar el efecto que produce la aplicación del inmunomodulador sobre la salud del camarón.
- C. Proporcionar un método que le permitirá al acuicultor monitorear (*in vivo*) el estado inmunológico del camarón en la finca y que de esta manera mejorar el estado inmunológico de los camarones que se reflejaría en mejores supervivencias.

2. REVISIÓN DE LITERATURA.

La experiencia ha enseñado que en los sistemas de cultivo de camarón se producen infecciones de diversos tipos y por diferentes factores, incluso ambientales. El sistema inmunológico del camarón es no específico, sin capacidad de memoria (Rendón y Balcázar, 2003).

Los mecanismos de defensa de los crustáceos incluyen dos componentes: barreras físicas pasivas y una respuesta activa contra organismos invasores. En los camarones, las barreras físicas pasivas están representadas por el rígido exoesqueleto y la membrana peritrófica, mientras que la respuesta inmune activa implica un rápido cambio en el número de células circulatorias de la hemolinfa (hemocitos) y la síntesis de nuevas proteínas en la hemolinfa (Pascual C, 2007).

El conocimiento de las condiciones de inmunidad y fisiológicas de los camarones es una información importante para el manejo de la acuicultura. Es bien conocido que ante la presencia de infecciones y o cuerpos extraños en el organismo se produce una explosión de hemocitos, que son parte del mecanismo de defensa del camarón y que van a ayudar a contrarrestar los patógenos.

La función del sistema inmune es mantener la individualidad biológica; por ello, su principal actividad es diferenciar y eliminar todo material extraño de sus tejidos (Vargas y cols., 1996).

El sistema inmune de los invertebrados se diferencia del sistema inmune de los vertebrados, principalmente por la ausencia de moléculas del tipo inmunoglobulina y células linfoides. El sistema de defensa de los crustáceos está basado en efectores celulares y humorales, los cuales se conjugan para eliminar microorganismos potencialmente infecciosos. Los hemocitos son cruciales en estas reacciones inmunitarias siendo capaces de fagocitosis, encapsulación, formación de nódulos y de citotoxicidad (Söderhäll & Cerenius., 1992). Ellos constituyen la fracción celular de la hemolinfa.

En los crustáceos la circulación es abierta y la hemolinfa es un análogo de la sangre y la linfa de los vertebrados. Esta baña los tejidos, denominándose hemocele a los sitios donde ella circula. La hemolinfa presenta un color azul verdoso a causa de la hemocianina (proteína respiratoria, abundante en la hemolinfa de todos los Peneidos).

2.1. Tipos de hemocitos.

Básicamente se han descrito tres tipos de hemocitos:

- Hemocitos hialinos (sin gránulos).
- Hemocitos semigranulosos (con gránulos).
- Hemocitos granulosos (con abundantes gránulos).

Los hemocitos hialinos (Figura 1a), son de citoplasma delgado, con un núcleo central. Se adhieren y extienden con facilidad, no contienen gránulos pero tienen inclusiones citoplasmáticas. Tienen la capacidad de fagocitar, e intervienen en la coagulación. No son refringentes al microscopio de contraste de fases.

Los hemocitos semigranulosos (Figura 1b), tienen gránulos pequeños, de forma redondeada con núcleo redondo o en forma de herradura. Intervienen en la fagocitosis, encapsulación y en la liberación del sistema profenoloxidasa (proPO); además, sintetizan y liberan las peneidinas y pectidos antimicrobianos.

Los hemocitos granulosos (Figura 1c), son células grandes, con núcleo excéntrico y tienen inclusiones citoplasmáticas. Almacenan las enzimas que constituyen el sistema proPO a un nivel más alto que los semigranulosos. Al igual que los hemocitos semigranulosos sintetizan y almacenan las peneidinas, intervienen en la encapsulación. Tienen mucha refringencia cuando se observa al microscopio de contraste de fases (Pascual C *et al.*, 2007; Ruiz-Urbe *et al.* 2007 y Rodríguez *et al.*, 1995).

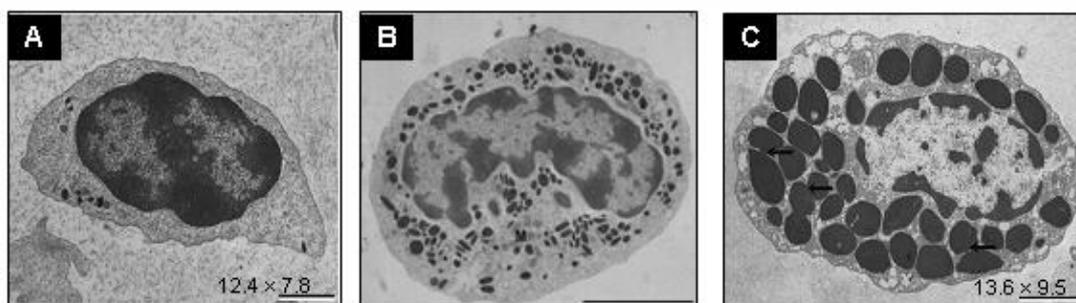


Figura 1. Clasificación de Hemocitos.

(A) Hialinos, (B) Semi-granulares, (C) Granulares (Fotos modificadas de Giulianini *et al.*, 2007) (*Boletín Científico de Nicovita*, 2007).

En la figura 2 se puede apreciar un esquema de los mecanismos de acción de los hemocitos.

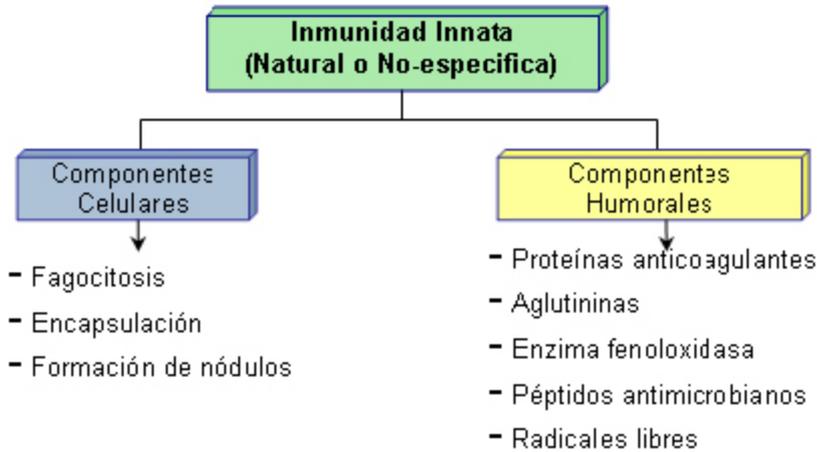


Figura 2. Mecanismos de acción de los hemocitos. Componentes celulares y humorales del sistema inmune de Crustáceos. (Nicovita, 2007).

La fagocitosis (Figura 3a), es la reacción más común de los mecanismos celulares de defensa en crustáceos. Es el proceso por medio del cual las células (hemocitos) ingieren y destruyen los patógenos invasores, partículas extrañas o células modificadas (envejecidas) del mismo organismo.

La encapsulación (Figura 3b) y la formación de nódulos (Figura 3c), son procesos en los cuales varios hemocitos colaboran entre ellos para detener la acción de organismos invasores; cuando el hospedero es invadido por partículas de tamaño muy grande, o por un gran número de partículas muy pequeñas respectivamente. De esta forma son ingeridas y destruidas por las células individualmente (Söderhäll y Cerenius., 1992 citado por Martínez, 2000).

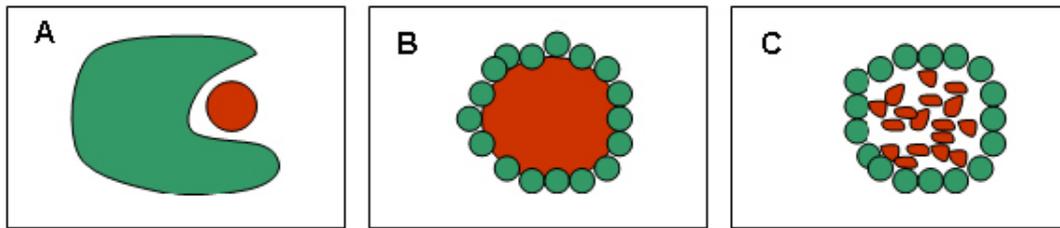


Figura 3. Procesos celulares de defensa:
 (A) Fagocitosis, (B) Encapsulación y (C) Formación de Nódulos. En color verde están representados los hemocitos y en rojo los organismos invasores.

El sistema fenol oxidasa (proPO), al ser activado, se manifiesta por una serie de reacciones enzimáticas en cascada (Vázquez & cols., 1998 citado por Rendón & Balcázar). El sistema proPO de los camarones se encuentra en el interior de los gránulos de los hemocitos granulados y semigranulosos, y puede ser liberado por estimulación de peptidoglucanos, β -glucanos o lipopolisacáridos. Una vez liberado el contenido granular por degranulación, el proPO es activado en fenol oxidasa (PO). La enzima activadora es una serina-proteasa de tipo tripsina llamada Profenoloxidasas Activating Protein (ppA) (Vargas & Yepiz; 1998 citado por Rendón & Balcázar).

Esta última es responsable de la oxidación de fenoles en quinones 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 (Smith & Söderhäll, 1983 citado por Rendón & Balcázar).

Los péptidos antimicrobianos, son proteínas que presentan actividades antibacterianas (sobre bacterias Gram positivas) y antifúngicas. Muchos estudios han investigado la caracterización de péptidos antimicrobianos, que matan o inhiben el crecimiento de microorganismos (Destoumieux, & Cols. 2000 citados por Rendón & Balcázar). Estos autores demostraron que las peneidinas son mayormente sintetizadas en los hemocitos, donde ellas son continuamente procesadas y almacenadas; y en tal caso almacenadas dentro de los gránulos citoplasmáticos.

Según (Bachere-, *et al.*2002), el conteo de hemocitos permite analizar los efectos de factores de medio ambiente o condiciones alimentarias que pueden inducir al stress o a deficiencias metabólicas (Bachere., *et al* 2002 citado por Marrero, *et al*).

Por otra parte; Owen & O'Neill (1997) demostraron que el conteo de hemocitos totales no está influenciado por la edad, el peso, longitud del caparazón o fuente poblacional (Owen & O'Neill 1997. citado por Marrero., *et al*).

El incremento de los hemocitos hialinos podría ser explicado por selección natural: sobreviven los animales con alta capacidad de proliferación. Al ser los hemocitos hialinos células jóvenes y poco diferenciadas podrían considerarse como indicadores de proliferación. Adicionalmente se ha reportado que estos hemocitos no serían infectados por WSSV (Rodríguez. J, *et al* 1995).

La infección por WSSV estimula la presencia de tres poblaciones hemocitarias, sugiriendo en el camarón la capacidad de reconocer como no propio a este virus. Los hemocitos hialinos y el superóxido mantuvieron una relación inversa con el grado de infección de WSSV. La carga viral está directamente correlacionada con la presencia de hemocitos anómalos, los mismos que son generados por las subpoblaciones de hemocitos granulados y hemocitos hialinos. No se observó replicación viral en los hemocitos debido a que las anomalías son producto de la activación y el desgaste celular en el proceso de defensa (Montesdeoca. B, 2001).

Se ha reportado que la variación de la fórmula hemocitaria se produce a las 24 horas de la exposición del individuo al patógeno, pero también depende del tipo de infección presente (Maldonado M, 2003).

En pruebas de laboratorio se demostró que el sistema inmunológico puede ser estimulado con la aplicación de bacterias prebióticas del tipo vibrios y bacilos (Gullian M & Rodríguez. J., 2002). Espinoza demostró que los hemocitos aumentaban en número frente a una infección en camarones inmunoestimulados con probióticos y betaglucanos mientras que los que no fueron estimulados disminuyeron (Espinoza. Y, 2003).

Los crustáceos no poseen un sistema inmunitario específico ni con capacidad de memoria (Berger, 2000), lo que impide la utilización de vacunas. En la respuesta inmune de los crustáceos se distinguen los efectores celulares y humorales que actúan en conjunto para eliminar los agentes extraños.

El empleo de estimulantes del sistema inmune, como agentes preventivos, viene siendo materia de investigación a fin de determinar con precisión sus mecanismos de acción y cuantificar su efecto en cultivos comerciales de camarón. La estimulación se provoca al nivel de los efectores humorales y no específicos. La inmunoestimulación se proyecta como una alternativa de prevención a los agentes virales, ya que existen evidencias publicadas que señalan el efecto protector de los β -glucanos y péptidoglicanos contra el WSSV. (Berger, 2000),

Según Bachère (2002), la respuesta inmune de los crustáceos puede ser dividida en varias fases:

1. Etapa inmediata e inducible correspondiente al reconocimiento de lo no propio. Los crustáceos no poseen un sistema inmunitario adaptativo pero se ha demostrado que algunos factores presentes en la hemolinfa poseen una alta especificidad de reconocimiento (Destoumieux *et al.*, 1997; Vázquez *et al.*, 1998).
2. Etapa de defensa celular y síntesis de efectores. Los hemocitos llevan a cabo la respuesta inmunitaria de manera inespecífica. También están involucrados en la coagulación de la hemolinfa (Söderhall & Cerenius, 1992; Vázquez *et al.*, 1998), así como en sintetizar y almacenar moléculas con acción antimicrobiana (Destoumieux *et al.*, 1997). Respecto a las infecciones virales de peneidos se han reportado las siguientes respuestas celulares:
 - a. Endocitosis, considerada la primera línea de defensa.
 - b. Encapsulación.
 - c. Melanización.
 - d. Nodulación.
 - e. Formación de esferoides del órgano linfoide.
3. Etapa humoral y de recuperación celular: Se ha reportado que los hemocitos liberan su contenido por exocitosis incluyendo factores para la coagulación de la hemolinfa, sistema proPO (Söderhall & Cerenius, 1998) o péptidos antimicrobianos como las peneidinas (Destoumieux *et al.*, 1997), caracterizadas en *Litopenaeus vannamei*; las cuales son activas contra hongos y bacterias Gram (+) (Wang *et al.*, 1999) y además actúan como opsoninas contra bacterias Gram (-) según Muñoz. M., *et al.* (2002).

Los hemocitos circulan en el hemocele y también son capaces de migrar a los tejidos (Hasson *et al.*, 1999a; Montesdeoca *et al.*, 2002 y Muñoz *et al.*, 2002).

Los sistemas inmunes se han desarrollado para proteger a los organismos multicelulares de la invasión de partículas extrañas. Durante la evolución se han desarrollado dos tipos de sistemas inmunes para detectar dichas sustancias; el sistema innato (natural) y el adaptativo (adquirido) (Lee & Söderhäll., 2002). Los crustáceos no pueden producir inmunoglobulinas, células receptoras T, ni células de memoria T (Thörnqvist & Söderhäll, 1997; Arala-Chávez & Sequeira, 2000); por ende no tienen memoria inmune. Poseen un sistema inmune innato rápido y eficiente para reconocer y destruir material no específico, incluyendo patógenos (Van de Braak *et al.*, 1996).

Los crustáceos poseen proteínas con función de comunicación o adhesión celular, capaces de reconocer carbohidratos como los lipopolisacáridos (componentes de la pared celular de microorganismos). Un ejemplo es la peroxinectina que puede actuar como aglutinina u opsonina (Van de Braak *et al.*, 1996), la que se encuentra asociada al sistema profenoloxidasa (proPO) y cumple una doble función: adhesión celular durante los procesos de fagocitosis, nodulación y/o encapsulación y actividad peroxidasa. Estas proteínas se sintetizan en los hemocitos, se almacenan en los gránulos secretores en forma inactiva y se liberan en respuesta a un estímulo (Van de Braak, 2002).

También se han encontrado proteínas con actividad antimicrobiana como las peneidinas, aisladas originalmente en *Litopenaeus vannamei*, las que están constituidas por tres miembros principales Peneidinas 1,2 y 3 (5,48 – 6,62 kDa). Estas se expresan constitutivamente en los hemocitos, encontrándose los péptidos maduros en los gránulos citoplasmáticos de hemocitos granulares (Destoumieux *et al.*, 2000). La tasa de producción de peneidinas puede incrementarse bajo desafíos microbianos (Muñoz. M *et al.*, 2002).

Otras proteínas que presentan actividad antimicrobiana son: la hemocianina, que es un pigmento respiratorio y representa entre el 60% al 93% del total de la proteína en la hemolinfa de Peneidos (Cheng *et al.*, 2002); y la callinectina, una proteína aislada del cangrejo *Callinectes sapidus*, la cual presenta una estructura similar a las peneidinas.

Los niveles de respuesta inmune varían entre las diferentes especies de crustáceos por lo cual se considera que ciertos factores tanto ambientales como fisiológicos contribuyen de manera importante en la inmunidad de estas especies (Vásquez *et al.*, 1998). Estos factores son: condiciones de estrés (Jussila *et al.*, 2001), aclimatación (Lignot *et al.*, 2000; Sánchez *et al.*, 2001; Lemaire *et al.*, 2002), condiciones ambientales y sustancias tóxicas o contaminantes (Lee *et al.*, 1999; Celso, 2000; Chen & Chen, 2000; Le Moullac & Haffner, 2000), estadio de desarrollo y cercanía a la etapa de ecdisis (Vásquez *et al.*, 1998; Okumura & Katsumi, 2000).

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 patógenos (Gullian, 2001).

Varios procedimientos cuantitativos han sido adaptados para evaluar la expresión de la respuesta inmune de los peneidos. Un primer paso es la medición *in vitro* de los parámetros inmunitarios tales como:

- Hemogramas, consistentes en el conteo del número total de hemocitos (NHT) (Perazzolo *et al.*, 2002) y conteo diferencial de los tipos de hemocitos.
- Cuantificación de la actividad fenol oxidasa (PO) (Sritunyalucksana & Söderhäll, 2000).
- Medición de intermediarios reactivos de oxígeno (ROIs) (Muñoz .M, *et al.*, 2000), con especial énfasis en la producción del anión súper óxido (O_2^-) (Anderson *et al.*, 1992).
- Cuantificación de la actividad antibacteriana del plasma (AA) (Alabi *et al.*, 2000).
- Cuantificación de la concentración de proteína plasmática (PP) (Rodríguez & Le Moullac, 2000).

Entre los principales factores que provocan las mortalidades de camarones en los cultivos están citadas las enfermedades virales; a ello se une un deficiente manejo de los factores ambientales en las piscinas tales como el suelo y la calidad de agua. Alta incidencia de virus ha sido detectado en áreas donde los desechos químicos y

biológicos son recirculados desde una granja a otra con lo cual se incrementa el grado de contaminación (Kautsky *et al.*, 2000).

Muchos mecanismos de defensa celular en los crustáceos dependen de la producción controlada de radicales libres durante la fagocitosis (Muñoz *et al.* 2000; Rodríguez y Le Moullac, 2000). No obstante, la producción sin control puede ocasionar que estos radicales libres, tales como el anión superóxido (O_2^-), fuguen desde rutas metabólicas específicas conduciendo a la iniciación de la per oxidación de lípidos con implicaciones patológicas que van desde la distrofia muscular, incremento a la susceptibilidad a enfermedades e incluso la muerte del animal (NRC 1993; Chew, 1995).

El interés en el uso de inmunoestimulantes ha aumentado con el apareamiento de enfermedades en camarones frecuentemente expuestos a condiciones estresantes. Investigaciones en el área de los glucanos reportaron una mayor resistencia a enfermedades en *Penaeus monodon* (Chang *et al.* 1999) y mayor respuesta inmunitaria en *Litopenaeus vannamei* (Otero. 2001). También se pudo observar en la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) un efecto positivo sobre la actividad de los macrófagos, se observó como consecuencia de la combinación de vitamina C y β -glucanos (Verlhac *et al.* 1996).

2.2. Respuesta inmune asociada a las enfermedades virales.

En la limpieza de las partículas extrañas que llegan al hemocele de los crustáceos están involucrados varios tipos de células (Johnson, 1987):

- a) Los podocitos o nefrocitos, los cuales están localizados en branquias y en el celosoma de la glándula antenal, ellos están especializados en la pinocitosis de proteínas y posiblemente virus.
- b) Los hemocitos, células circulantes en la hemolinfa, son las células fagocíticas más abundantes, consideradas como los elementos principales en el reconocimiento y eliminación del material extraño.
- c) Las células fagocíticas de reserva, estas se presentan en el corazón de los peneidos; Son derivadas del tejido hematopoyético y están involucradas en filtrar otras sustancias, sin embargo no existe evidencia de que estén relacionadas con la fagocitosis de bacterias o virus.

d) Los fagocitos fijos, también derivados del tejido hematopoyético, ubicados en los espacios hemales del hepatopáncreas, en donde secuestran gran cantidad de partículas.

e) El órgano linfoide, considerado una parte integral del sistema circulatorio de los camarones peneidos, se asume que funciona como filtro de la hemolinfa, por lo que tendría gran importancia en la limpieza y captura de partículas virales (Van de Braak *et al.*, 2002).

2.3. Reacciones de defensa.

En los camarones, como en otros invertebrados, los mecanismos celulares y humorales contribuyen a la defensa del organismo; limitando invasiones microbianas y virales que son eliminadas de la hemolinfa y tejidos (Söderhall & Cerenius, 1992; Vázquez *et al.*, 1998; Bachère, 2000).

Ante la agresión por WSSV los camarones proliferarían hemocitos los cuales se infiltrarían en los tejidos infectados. Si la proliferación celular se detiene, lo cual es una ventaja para el virus, en la hemolinfa se acumularían hemocitos desgastados. Esto indica que las infecciones virales pueden ser controladas en tanto que los camarones sean capaces de proliferar hemocitos en buen estado y movilizarlos a los tejidos infectados (Montesdeoca, 2002).

Además; Montesdeoca *et al.* (2002) muestran una relación directa entre la carga viral, y la presencia de hemocitos en apoptosis (hemocitos anómalos) en animales infectados por WSSV; pero no reportan la replicación viral dentro de los hemocitos, sugiriendo por este motivo que las anomalías son producto de la activación o el desgaste celular en el proceso de defensa. También; Sahtout *et al.* (2001) muestran evidencias de apoptosis en hemocitos de camarones infectados con YHV.

Variaciones en el medio ambiente inducen cambios en los mecanismos de defensa de los crustáceos (Le Moullac & Haffner, 2000). El estrés provocado por

variaciones de temperatura modifica el número de hemocitos (Sánchez *et al.*, 2001) altera los mecanismos que regulan al sistema proPO (Söderhall & Cerenius, 1998). Al respecto Vargas-Albores *et al.* (1998), han sugerido que la temperatura determina la efectividad de la respuesta inmune.

El camarón requiere de cuatro días para eliminar el virus de la mancha blanca a temperaturas elevadas, por lo que un periodo más largo posiblemente permite una limpieza muy eficaz, pero ante la falta de estímulo la respuesta inmune decae. En estos casos se recomienda el uso de estimulantes con el objetivo de potenciar la alerta inmunitaria antes de que los animales enfrenten un nuevo ataque viral (Sonnenholzner *et al.*, 2002).

2.4. Sustancias inmunoestimulantes como alternativas.

Como tratamiento alternativo, existen componentes biológicos ‘inmunoestimulantes’, que juegan el papel de moléculas de alarma para activar el sistema inmune. El sistema inmune de los animales responde a un inmunoestimulante como a una agresión microbiana. La mayoría de las moléculas inmunoestimulantes son fragmentos de la pared celular de microorganismos que hacen a los animales más resistentes a infecciones microbianas. Muchos componentes activos son extraídos de paredes celulares bacterianas: fragmentos de péptidos muramil, lipopolisacáridos, lipopéptidos, aciloligopéptidos y ciertos péptidos. En la pared celular de levaduras y mohos, hay principalmente β -glucanos, moléculas poliglucosas ligadas a través de β -1,3 en una larga cadena y con ramificaciones β -1,6 de glucosa.

Ya que el camarón es principalmente dependiente de procesos inmunes no específicos para su resistencia a infecciones, puede esperarse que los inmunoestimulantes lleguen a ser una herramienta importante para reducir las enfermedades de crustáceos en la acuicultura.

Cómo ya se explicó, la defensa en crustáceos está basada en los hemocitos que cumplen varias funciones, tal como: coagulación; fagocitosis; encapsulación y cicatrización de heridas (Johansson & Söderhäll, 1989, Hose & Martin, 1989, Bell & Smith, 1993, Bachère *et al.*, 1995a). La mayoría de esas funciones de defensa son desencadenadas por la presencia de microorganismos vivos o fragmentos de microorganismos muertos en la hemolinfa del camarón. El plasma del camarón contiene factores capaces de reconocer a las bacterias o virus. Son caracterizados dos tipos de proteínas ligantes, la proteína ligante lipopolisacárida y la β -glucano, así

como su receptor sobre el macrófago (Duvic & Söderhäll, 1990, Duvic & Söderhäll, 1992, Vargas-Albores, 1995).

2.5. El uso práctico de inmunoestimulantes.

Existen numerosos métodos para valorar la efectividad de los inmunoestimulantes. Un primer paso es medir *in vitro* la actividad de hemocitos para el suceso metabólico asociado con fagocitosis en camarón (Song & Hsieh, 1994) y la activación de la profenoloxidasa (Ashida & Söderhäll, 1983, Smith & Söderhäll, 1983, Lang *et al.*, 1993). Luego de esto, el proceso de prueba *in vivo* puede ser dirigido, para medir la supervivencia después de que el camarón ha sido puesto a prueba con un patógeno.

Sung *et al.* (1994) realizaron una prueba de inmersión del camarón en una solución de inmunoestimulantes con postlarvas de *P. monodon*, y reportaron que la entrega oral parece ser el método más atractivo para la estimulación inmune.

Sin embargo, los resultados de experimentos en condiciones controladas no son suficientes para concluir sobre la eficiencia de una sustancia inmunoestimulante; esta sustancia tiene que ser evaluada *in situ*, en un área epidémica con especial atención a la interacción con condiciones ambientales.

Este trabajo pretende presentar una herramienta para la determinación del estado inmunitario del camarón, relacionándolo a posibles ataques de patógenos, con base en la cuantificación de hemocitos presentes en la hemolinfa. Con esto se pretende además establecer una metodología que permita realizar un chequeo a la salud de los animales de forma continua y en el propio lugar donde se realiza el cultivo de los camarones.

3. MATERIALES Y MÉTODOS.

El experimento se llevó a cabo en una camaronera ubicada en la provincia de El Oro durante el período comprendido del 1 de septiembre del 2009 al 3 de diciembre del mismo año, el periodo señalado correspondió a la estación fría del Ecuador continental. Los parámetros en que se desarrollo el ensayo fueron: Salinidad 20 UPS, temperatura promedio 25°C – 29°C.

3.1. Área de estudio.

El aérea de estudio para esta prueba fue la camaronera de la compañía Corporeal, la cual está situada en las coordenadas 3° 21' 32" latitud Sur y 80° 6' 18" longitud Oeste; ubicada en el Archipiélago de Jambelí, Provincia de El Oro, cantón Santa Rosa, sector Pongalillo, estero el venado.(Figura 4).



Figura 4. Ubicación de la camaronera en el Archipiélago de Jambelí.
(Fuente. <http://earth.google.es/>).

Para la realización del estudio se utilizaron cinco piscinas, con un área de entre 4,00 y 7,68 hectáreas. La distribución de las mismas la observamos en el cuadro 1.

Cuadro 1. Codificación de las piscinas de estudio de la Camaronera.

Código de las piscinas	#Piscina	Hectáreas	Utilización	Tratamiento (g inm / kg alimento)
A	8	6,84	Tratamiento	2
B	2	5,68	Tratamiento	4
C	4	4,00	Tratamiento	6
D	7	6,60	Control	0
E	13	7,61	Control	0

3.2. Material biológico.

Se obtuvieron postlarvas de *Litopenaeus vannamei* en un laboratorio ubicado en la provincia de Santa Elena. Las mismas fueron sembradas en los precriaderos de la camaronera para una mejor adaptación al medio. Luego de 15 días los juveniles fueron transferidos a las piscinas experimentales.

Cinco piscinas fueron seleccionadas, tres destinadas a tratamientos y dos como controles. Cada una fue sembrada a una densidad de 65000 post larvas por hectárea. Los datos generales de la siembra pueden ser observados en el cuadro 2.

Cuadro 2. Datos de la siembra de las piscinas

Denominación de las piscinas	Has	Siembra	Cantidad Total	Densidad individuos/Has
A	6,84	4/9/09	413000	65142
B	5,68	4/9/09	372000	65493
C	4,00	4/9/09	260000	65000
D	6,60	4/9/09	430000	65152
E	7,61	4/1/09	495000	65046

3.3. Preparación y aplicación de la mezcla del inmunomodulador con el alimento balanceado.

El inmunomodulador es un producto comercial el cual está compuesto de una mezcla de bacterias y hongos (*Bacillus sp.*, *Enterococcus sp.*, *Lactobacillus sp.*) en una concentración de 1×10^{12} ufc/kg.; además contiene extracto de pared celular de bacterias Gram (-) y Gram (+), así como de levaduras. Este fue almacenado dentro de la camaronera en un lugar fresco y seco.

La preparación del alimento para las piscinas durante las semanas de cultivo consistió en mezclar en una tina plástica la dieta diaria de alimento balanceado, más

la dosis establecida del inmunomodulador. Como attractante se usó aceite de pescado en un volumen de 1 litro por cada 25 kg de alimento.

A partir de la tercera semana se procedió a utilizar los comederos, pues el tamaño de los animales les permitía ingresar hasta los mismos. La dieta en este tiempo fue determinada por el consumo de alimento en los comederos, en una relación de 50% de bokashi y 50% de alimento balanceado de 35% de proteína. A partir de la cuarta semana solo se alimentó con alimento balanceado de 35% de proteína, a partir de la sexta semana, se continuó alimentando con alimento balanceado de 23% de proteína.

Se utilizó tres comederos por hectáreas, en los cuales se colocaba el 3% del total de la dieta diaria. El restante se aplicó al boleó, una vez al día, en horas de la tarde. Los comederos eran revisados al día siguiente por la mañana, para determinar el consumo de alimento.

En esta investigación los comederos fueron los indicadores para preparar las raciones alimenticias, si los comederos se encontraban vacíos, la dieta se incrementaba en un 10% a 20%. El incremento o reducción de la dieta estaba relacionada con el sobrante del alimento presente en los comederos. Dependiendo del número de comederos con alimento sobrante se reducía la dieta en igual porcentaje. Este procedimiento se mantuvo hasta el final de la corrida.

3.4. Toma de muestra.

Las piscinas seleccionadas se iniciaron a monitorear a partir de la cuarta semana de cultivo. Diez camarones fueron tomados de cada piscina por medio de una atarraya de nylon. Las muestras se tomaron cada semana por el tiempo que duró el ciclo de cultivo.

Se seleccionó para el análisis a animales que tenían una textura dura (intermuda). Estos fueron colocados en una funda plástica con agua de la misma piscina y oxígeno. Cada una de las muestras fueron colocadas en un cartón de transporte de larvas, la temperatura fue bajada de 3 a 5 °C por debajo de la temperatura inicial, con el objetivo de evitar el stress en los camarones y asegurar así un conteo correcto.

Las muestras fueron transportadas hasta el laboratorio el cual se encontraba ubicado en la ciudad de Machala a un tiempo de 30 minutos en bote. Una vez en el laboratorio se procedió a realizar la extracción de hemolinfa.

3.5. Preparación de reactivo.

Para el desarrollo de este trabajo se procedió a la preparación de la solución de citrato de sodio al 10%, la misma que se utilizó como solución anticoagulante. Para ello se procedió a pesar 10g de citrato de sodio a partir de un frasco de 500 g de la marca DIFCO, se colocó esto en un volumen de 100 ml en una fiola con capacidad de 500 ml de la marca PYREX.

Posteriormente la esterilización del medio de cultivo se llevó a cabo en autoclave (SPEEDY vertical Type) a 120 °C y 15 lbs de presión, durante 20 minutos. Después de la esterilización se dejó enfriar, y luego se reguló el pH a 7.0.

Con esta solución se preparaban jeringuillas de 1ml de capacidad (tipo insulina) con 100 µl de la misma. Las mismas que eran guardadas en refrigeración hasta que se las usaba para la extracción de la hemolinfa.

3.6. Extracción de la hemolinfa.

Los camarones *Litopenaeus vannamei* originarios de la camaronera eran colocados, inmediatamente al llegar al laboratorio, en baldes con 15 litros de agua de la camaronera.

Antes de la extracción de la hemolinfa se revisaba que los camarones que se sintieran duros al tacto, señal de que se encontraban en estadio de intermuda, y en óptimas condiciones para el conteo. Una vez revisado esto, se procedía a quitar el exceso de agua en el camarón, secando completamente la parte baja ventral del cefalotórax con una toalla de papel.

Se sostenía al camarón con la parte ventral hacia arriba y se introducía la aguja de una de las jeringas, previamente preparadas y refrigeradas con la solución anticoagulante de citrato de sodio al 10%, en el seno ventral; localizado en la base del primer segmento abdominal. Inmediatamente se empezaba a extraer 100 µl de hemolinfa, haciendo succión con la jeringuilla hasta completar un volumen total de 200 µl (100 µl de hemolinfa más 100 µl de solución anticoagulante). Se tuvo mucho

cuidado de no hacer burbujas con la hemolinfa ni extraer agua que podría estar en el cuerpo del camarón.

La mezcla del citrato con la hemolinfa se colaba en un micro tubo de 1.5ml, previamente marcado para identificarlo. Este tubo era colocado sobre un refrigerante.

3.7. Conteo de Hemocitos.

Las muestras de hemolinfa de los 10 animales de cada piscina eran combinadas y homogenizadas en un bortex por 30 segundos. Luego, se tomaba una muestra de esta solución y se colocaba en un Hemocitómetro (cámara de Neubauer) para determinar el número total de hemocitos.

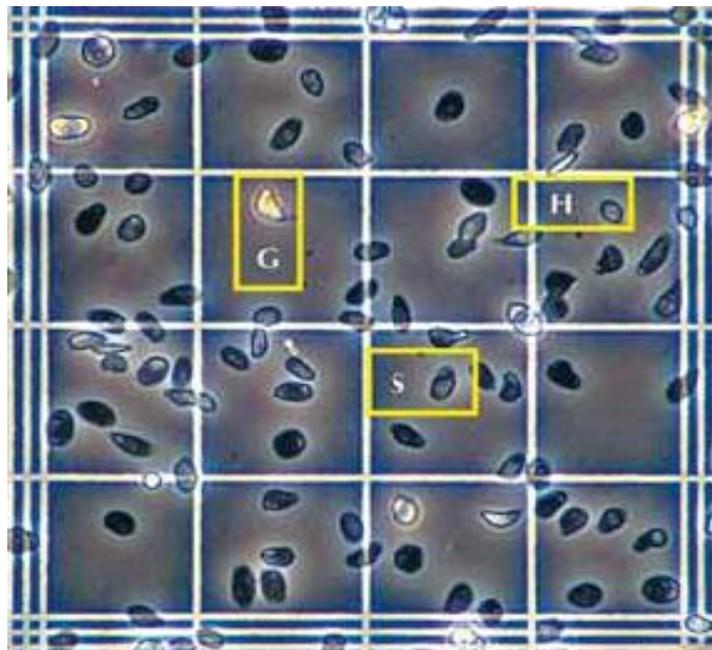


Figura 5. Hemocitos de *Litopenaeus vannamei* observados en cámara de Neubauer utilizando microscopio de contraste de fases y aumento de 400x. Se pueden observar en los recuadros amarillos los tres tipos de hemocitos diferenciados. Tomado de la Guía Técnica-Patología e inmunología de camarones peneidos Nicovita 2008.

Se determinó el número total de hemocitos (NHT) presentes en el plasma por conteo con cámara de Neubauer, utilizando un microscopio de contraste de fases en un aumento de 400x, tal como lo recomienda Muñoz (1996). En la Figura 5 se puede observar una vista de los distintos tipos de hemocitos en pre adultos de *Litopenaeus vannamei*, observados en una cámara de Neubauer, utilizando un microscopio de contraste de fases y con un aumento de 400x.

Para realizar los cálculos de la densidad de hemocitos se aplicó la siguiente fórmula:

$$NH = \frac{\sum_1^8 CTH}{8} \times \text{dilución} \times 10^4$$

En donde:

NHT = número total de hemocitos (10^6 células/ml)

CTH = conteo de hemocitos en 8 cuadrantes por dilución de la muestra en la cual se observa la hemoaglutinación

3.8. Salud aparente, peso final de cosecha, supervivencia, biomasa y factor de conversión alimentaria.

A partir de la cuarta semana de cultivo, se inició el chequeo visual de los animales en las piscinas de estudio. Para este monitoreo se realizaron cuatro lances de atarraya en cada piscina, contando el número de camarones que visualmente se consideraban enfermos o sanos. Los camarones que se consideraron enfermos fueron aquellos que presentaban una coloración roja en el telson, antenas rugosas, opacidad en el exoesqueleto y flácidos. Los animales considerados sanos carecían de las características antes mencionadas. El registro de los datos se realizó en la bitácora de trabajo.

A partir de la cuarta semana, se realizaron muestreos semanales de peso promedio del camarón en cada piscina de cultivo.

La biomasa cosechada para cada piscina se la determinó mediante el peso reportado por la empacadora en las liquidaciones de pesca. Esta está directamente influenciada por la cantidad de camarones cosechados y el peso promedio alcanzado. Debido a que la biomasa total es dependiente del área de la piscina, para los análisis se utilizó la biomasa por hectárea.

La supervivencia representa la proporción de individuos sembrados que son cosechados al final del ciclo en la cosecha. Para calcular el número de camarones cosechados se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Número de camarones cosechados} = \frac{\text{Biomasa g}}{\text{Peso promedio final g}}$$

En donde el peso promedio final fue determinado mediante una muestra de 300 camarones al momento la cosecha.

La conversión alimentaria es una medida de la eficiencia para convertir el alimento en biomasa. La misma está dada en función al alimento consumido y al incremento de biomasa, reflejando las libras de balanceado usado para ganar una libra de biomasa.

$$\text{Conversión Alimentaria} = \frac{\text{Alimento Consumido}}{\text{Incremento de Biomasa}}$$

Debido a que el camarón se lo sembró con un peso inicial de 0,03g, la biomasa inicial fue muy pequeña en relación a la biomasa final; por lo que se utilizó la biomasa cosechada en vez del incremento de biomasa.

El factor de conversión alimentaria varía durante el ciclo de producción, el alimento utilizado, y entre las poblaciones. Rangos de conversiones adecuadas son: entre 0.6-1.0 en camarones de hasta 10 g de peso y entre 1.0 y 1.3 para camarones de 13 g. En tallas mayores la CA no debería ser mayor a 1.5 (Nicovita, 1997).

3.9. Diseño y análisis estadístico.

Para probar la hipótesis principal de este trabajo, esto es, que la aplicación del inmunomodulador afecta a la concentración de hemocitos en camarón; se consideró como variable principal dependiente a la concentración de hemocitos en camarón. Además se consideró dos variables independientes (factores), así como su interacción.

1. **Dosis de aplicación de inmunomodulador**, la misma que fue fijada en cuatro niveles: 2g, 4g, 6g (tratamiento) y 0g por kilogramo de alimento balanceado (control).
2. **Semana de muestreo**, la misma que correspondía a cada una de las diez semanas en que se contó los hemocitos. Esta variable se la utilizó para

determinar el efecto de factores ambientales externos, que afectarían a todos los tratamientos.

De esta forma el diseño utilizado fue uno de dos factores, en donde cada observación (conteo de hemocitos para cada dosis en cada semana), correspondía a la ecuación lineal:

$$Y_{ij} = \mu + D_i + S_j + \varepsilon_{ij}$$

En donde:

Y_{ij} : Concentración de hemocitos para el tratamiento i en la semana j .

μ : media general.

D_i : Efecto de la dosis i .

S_j : Efecto de la semana j .

ε_{ij} : Error, efecto de todas las otras variables no consideradas en el estudio.

Todos los cálculos estadísticos se realizaron mediante el software STATISTICA v7.0, a un nivel de confianza del 95%.

Para determinar los efectos de los factores, se realizó un análisis de varianza con tres fuentes de variación (dos factores más su interacción). Previo al ANOVA se comprobó los supuestos de normalidad, mediante pruebas de Shapiro – Wilk y de homogeneidad de varianzas, mediante las pruebas de Cochran y Hartley Barlett. Debido a que se no se cumplía el supuesto de homogeneidad, se realizó una transformación logarítmica, con la cual se corrigió esto (cuadro 3).

Cuadro 3. Valores de significancia para las pruebas Cochran y Hartley Barlett antes y después de la transformación logarítmica.

Efecto	Hemocitos	log(Hemocitos+1)
Tratamiento	0.357	0.623
Semanas	0.000	0.042
Interacción	0.045	0.100

Posterior al análisis de varianza, en caso de encontrar diferencias significativas entre las medias, se realizó la prueba múltiple de Tuckey.

Para determinar si hubo una diferencia entre la proporción de camarones enfermos detectados en los muestreos semanales, se utilizó un diseño de bloques aleatorios, considerando a la semana de muestreo como bloque. La prueba utilizada fue un análisis de varianza de dos vías (efectos principales). Antes de realizar la

misma los datos fueron transformados con arco seno, para asegurar la independencia entre medias y varianzas.

Para determinar si hubo un efecto del inmunomodulador en el peso final de cosecha, supervivencia, biomasa y factor de conversión; se consideró la inclusión del inmunomodulador en la dieta, y ya no su concentración, como variable independiente (factor). Esto corresponde a un diseño completamente aleatorio, con dos tratamientos.

En este caso se consideró a cada piscina como unidad muestral, uniendo las tres dosis de aplicación de inmunomodulador en un solo tratamiento, el cual se comparó con el control. De esta forma, las réplicas para el tratamiento con inclusión de inmunomodulador fueron $n=3$ y para el control $n=2$.

Para el determinar el efecto del inmunomodulador en estas variables se utilizó una prueba t-Student para comparación de diferencias de dos medias. En el caso de peso final y supervivencia, se tomó en cuenta la corrección de Welch para diferencias en varianzas. En el caso de supervivencia, antes del análisis se realizó una transformación arco seno para asegurar la independencia de medias y varianzas.

Es de notar que los datos de muestreo de peso promedio semanal durante todo el cultivo solo se los presentó con fines informativos. No se realizó ninguna prueba para determinar diferencias entre estos. Ya que todas las piscinas fueron sembradas con camarón del mismo peso promedio inicial y, a que el tiempo de cultivo fue el mismo en todas ellas (89 días), cualquier posible efecto de los tratamientos en el crecimiento se lo hubiera detectado en la prueba t para diferencias entre medias en peso promedio final.

4. RESULTADOS.

4.1. Efectos del inmunomodulador sobre la respuesta inmune del camarón.

Los resultados de los conteos semanales de hemocitos en cada uno de los tratamientos, se encuentran en el Anexo I. En el cuadro 4 se puede apreciar un resumen de estos datos, agrupados por tratamiento, y en el cuadro 5 los mismos datos agrupados por semana de muestreo.

Cuadro 4. Estadística descriptiva para los conteos de hemocitos (en 10^6 Hemocitos / ml) agrupado por tratamiento.

	n	Promedio	Desviación Estándar	Error Estándar	Grupo (p>0.05)
A (2g/kg)	10	5.5	3.1	1.0	ab
B (4g/kg)	10	5.5	3.2	1.0	ab
C (6g/kg)	10	7.0	4.5	1.4	a
D+E (Control)	20	4.7	2.7	0.6	b

Grupos con la misma letra indican que no hay diferencias significativas (p=0.05).

Cuadro 5. Estadística descriptiva para los conteos de hemocitos (en 10^6 Hemocitos / ml) agrupado por semana de muestreo.

	n	Promedio	Desviación Estándar	Error Estándar	Grupo (p>0.05)
Semana 4	5	1.6	0.5	0.2	ad
Semana 5	5	3.3	1.2	0.5	ab
Semana 6	5	7.4	2.1	0.9	ce
Semana 7	5	6.0	2.2	1.0	bcef
Semana 8	5	1.3	0.2	0.1	d
Semana 9	5	7.0	5.1	2.3	ef
Semana 10	5	3.8	1.3	0.6	bf
Semana 11	5	8.8	1.2	0.6	ce
Semana 12	5	8.8	2.2	1.0	ce
Semana 13	5	7.1	1.2	0.5	ce

Grupos con la misma letra indican que no hay diferencias significativas (p=0.05).

Se encontraron diferencias entre las medias de los tratamientos para el efecto de la dosis de inmunomodulador (< 0.05) y de semanas ($p < 0.01$), pero no para una interacción de estas dos variables ($p=0.13$). En el cuadro 6 se tiene la tabla de ANOVA, en donde se puede apreciar la descomposición de la varianza por cada fuente de variación.

Cuadro 6. Tabla de ANOVA para diferencia entre medias de conteo de hemocitos.

Fuente de Variación	Suma Cuadrados	Grados de libertad	SMC	F	p
Semanas	2.30	9	0.26	32.54	0.00
Tratamiento	0.09	3	0.03	3.78	0.05
Interacción	0.42	27	0.02	1.98	0.13
Error	0.08	10	0.01		
Total	2.89	49			

Los resultados de la pruebas de Tuckey para determinar diferencias individuales entre las medias debido al nivel de inclusión de inmunomodulador, se encuentra en el Anexo II. En el Anexo III se halla los resultados de dicha prueba para diferencias entre las medias debido al efecto de la semana de muestreo.

Al evaluar el efecto individual de las dosis de inclusión del inmunomodulador en la dieta, se detectó que únicamente la mayor dosis (6g/Kg) presentó diferencias significativas ($p=0.03$) con el control; pero no se detectó diferencias significativas ($p>0.05$) entre éste y los otros tratamientos con menor dosis de inclusión (2g/kg y 4g/kg), ni entre estos últimos y el control. Esto se lo puede apreciar en la Figura 6.

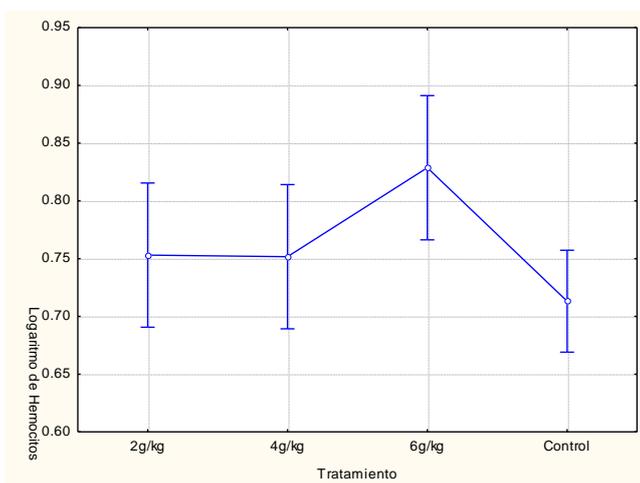


Figura 6. Intervalos de confianza ($p=0.05$) de la media de concentración de hemocitos para los distintos tratamientos.

En la Figura 7 se muestra los intervalos de confianza para la media en las distintas semanas de muestreo. Se puede apreciar que existen diferencias significativas ($p<0.05$) para algunas de las semanas, lo que podría indicar un efecto de algún efecto externo común para todos los tratamientos.

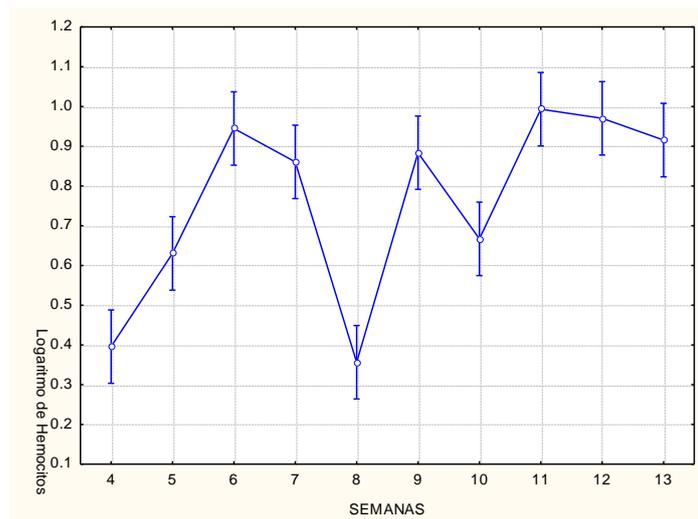


Figura 7. Intervalos de confianza ($p=0.05$) de la media de concentración de hemocitos durante las semanas de muestreo.

4.2. Efectos del inmunomodulador sobre la salud aparente del camarón.

Los porcentajes de camarones aparentemente enfermos (por inspección visual) encontrados en los muestreos semanales de las piscinas se encuentran en el Anexo IV. En el cuadro 7 se puede apreciar un resumen de estos datos, agrupados por tratamiento.

Cuadro 7. Estadística descriptiva para los porcentajes de camarones aparentemente enfermos agrupados por tratamiento.

Dosis	Cuenta	Promedio	Desviación Estándar
2g/kg	9	0.05%	0.09%
4g/kg	10	0.13%	0.22%
6g/kg	10	0.02%	0.06%
Control	20	0.09%	0.15%

No se encontraron diferencias significativas ($p= 0.31$) entre las medias debidas a los niveles de inclusión del inmunomodulador, pero si debido a la semana de muestreo ($p=0.04$). En el cuadro 8 se tiene la tabla de ANOVA.

Cuadro 8. Tabla de ANOVA para diferencia entre medias de proporción de camarones aparentemente enfermos.

Fuente de Variación	Suma Cuadrados	Grados de libertad	SMC	F	p
Semana	30.72	9	3.41	2.26	0.04
Dosis	5.56	3	1.85	1.23	0.31
Error	54.38	36	1.51		
Total	90.65	48			

En la figura 8 se tiene los intervalos de confianza para medias entre los niveles de inclusión del inmunomodulador.

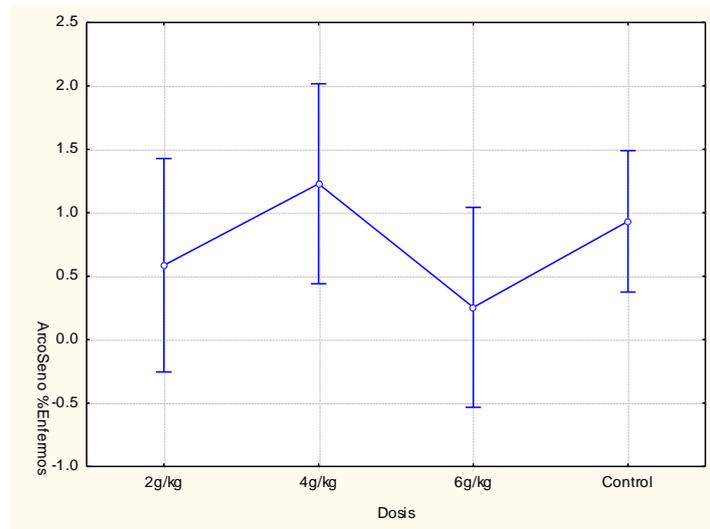


Figura 8. Intervalos de confianza ($p=0.05$) de la media de la proporción de camarones aparentemente enfermos para los distintos tratamientos.

Tal como se aprecia en la Figura 9, solo se encontraron diferencias significativas ($p<0.05$) en las medias de camarones aparentemente enfermos entre la cuarta semana y las semanas 10, 11 y 12; pero no se encontraron diferencias entre estas cuatro semanas y el resto.

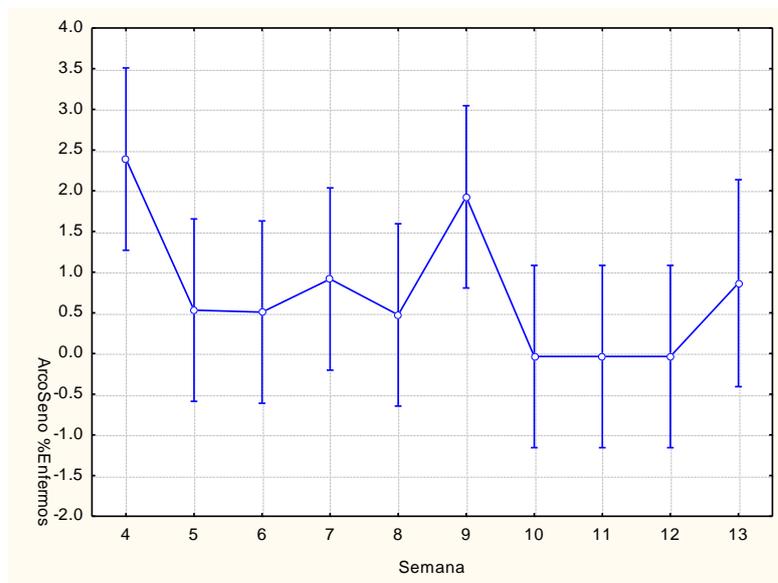


Figura 9. Intervalos de confianza ($p=0.05$) de la media de la proporción de camarones aparentemente enfermos durante las semanas de muestreo.

4.3. Efectos del inmunomodulador en el peso final de cosecha, supervivencia, biomasa y factor de conversión.

Los resultados a cosecha de peso promedio final; supervivencia; biomasa; y factor de conversión alimentaria, obtenidos en las piscinas de prueba se encuentran en el Anexo V. En el cuadro 9 se puede apreciar un resumen de estos datos agrupados por tratamiento, así como el valor de significancia de la prueba t.

Cuadro 9. Estadística descriptiva y significancia (p), para peso promedio final; supervivencia; biomasa; y factor de conversión alimentaria, agrupados por tratamiento.

Tratamiento	N	Biomasa(lbs/Has)		CA		Supervivencia (%)		Peso Final (g)	
		Promedio	p	Promedio	p	Promedio	p	Promedio	p
Control	2	1576	0.643	0.85	0.561	79%	0.913	13.9	0.299
Inmunomodulador	3	1715		0.90		82%		14.6	
Total	5	1659		0.88		81%		14.3	

En la Figura 10 se puede apreciar que no hay diferencias significativas ($p=0.64$) para medias de biomasa final entre el tratamiento y el control.

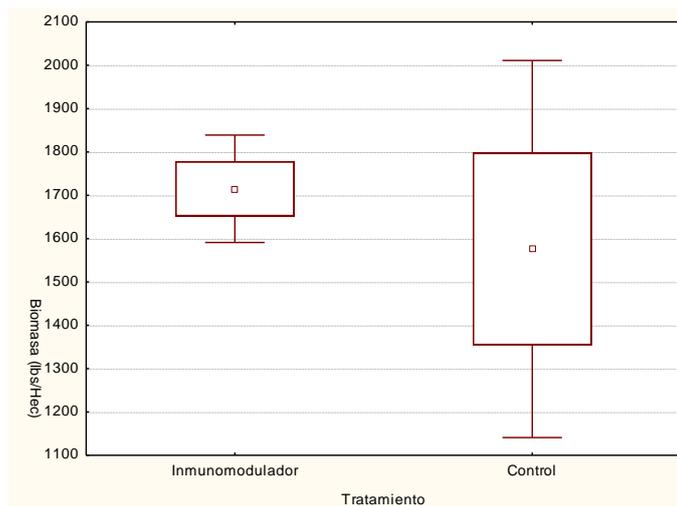


Figura 10. Diagrama de cajas para biomasa (en libras / hectárea) entre el tratamiento y el control. Las cajas representan la media más el error estándar, y las barras el intervalo de confianza ($p=0.05$).

Tal como se ve en la Figura 11, no hay diferencias significativas ($p=0.56$) para medias de factor de conversión alimentaria entre el tratamiento y el control.

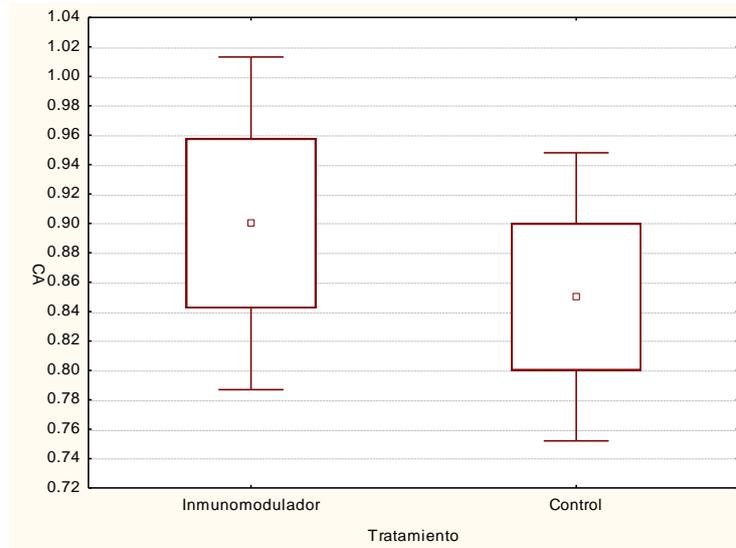


Figura 11. Diagrama de cajas para factor de conversión alimentaria entre el tratamiento y el control. Las cajas representan la media más el error estándar, y las barras el intervalo de confianza ($p=0.05$).

En la Figura 12 se puede apreciar que no hay diferencias significativas ($p=0.91$) para medias de supervivencia final entre el tratamiento y el control.

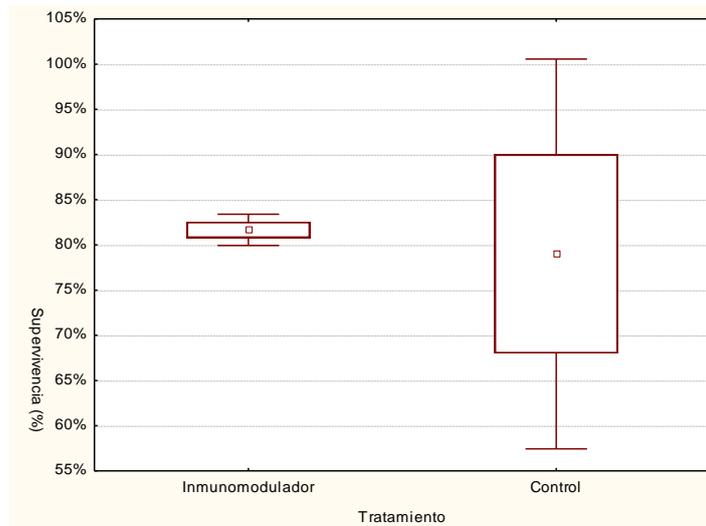


Figura 12. Diagrama de cajas para supervivencia entre el tratamiento y el control. Las cajas representan la media más el error estándar, y las barras el intervalo de confianza ($p=0.05$).

Tal como se ve en la Figura 13, no hay diferencias significativas ($p=0.30$) para medias de peso promedio final entre el tratamiento y el control.

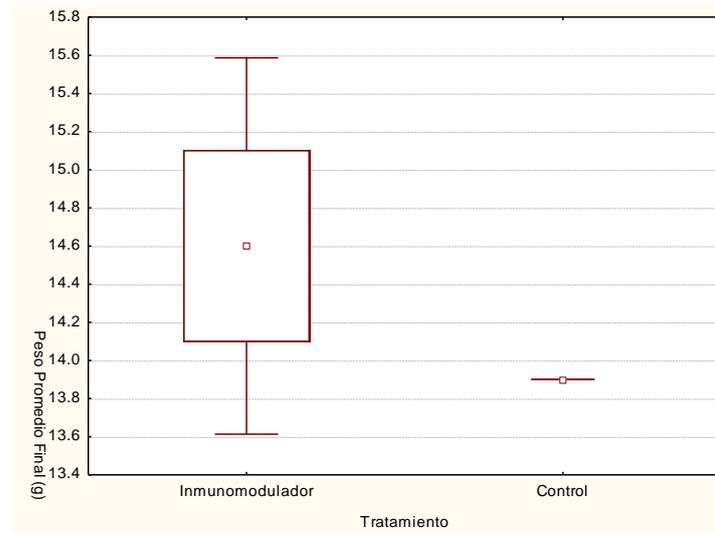


Figura 13. Diagrama de cajas para peso promedio final entre el tratamiento y el control. Las cajas representan la media más el error estándar, y las barras el intervalo de confianza ($p=0.05$).

En el Anexo VI se tiene el detalle de los muestreos semanales de crecimiento para las piscinas utilizadas en este ensayo. Sin embargo, estos datos no fueron analizados, ya que; al haber partido de un peso promedio inicial de siembra igual y haber tenido todas las piscinas igual duración de cultivo; si no existen diferencias en peso promedio final, se puede concluir que la inclusión del inmunomodulador no demostró un efecto en el crecimiento.

5. DISCUSIÓN.

Existen numerosos métodos para valorar la efectividad de los inmunoestimulantes. Un primer paso es medir *in vitro* la actividad de hemocitos para el suceso metabólico asociado con fagocitosis en camarón (Song & Hsieh, 1994) y la activación de la profenoloxidasa (Ashida & Söderhäll, 1983, Smith & Söderhäll, 1983). El método de conteo del número total de hemocitos *in vivo*, permite una valoración rápida de la efectividad del inmunomodulador, lo que la hace viable como una herramienta de trabajo en las camaroneras de producción comercial.

Algunos autores han reportado que la administración de inmunoestimulantes vía inmersión mejora la respuesta inmune del camarón (Itami *et al.*, 1998, Alabi *et al.*, 1999). Así mismo otros estudios han reportado que los inmunoestimulantes mejoran la supervivencia del camarón (Itami *et al.*, 1989, Sung *et al.*, 1994). pero aún no se han demostrado cuales componentes del sistema inmune se incrementan. En este estudio se demostró que, una inclusión de 6g de inmunoestimulante por kg de alimento balanceado, aumentaba significativamente la concentración de hemocitos en la hemolinfa, comparado con una concentración menor y con el control.

Las levaduras han sido usadas como activadoras, moduladoras y fortificadoras del sistema inmune en diversos organismos debido a la presencia de β -glucanos, mananoligosacáridos y otros componentes de la pared celular, esto sugiere la posibilidad de usar estos microorganismos como inmunoestimulantes y fuente de bio-productos empleados para ese fin en acuicultura (Zhen-Ming *et al.*, 2010). En el presente estudio, el inmunomodulador que contenía una mezcla de bacterias y hongos activó el sistema inmune de los camarones (medido como concentración de hemocitos), cuando se lo usó en la dosis adecuada.

La concentración de los inmunoestimulantes es muy importante para observar el efecto protector. (Sung *et al.* 1994) encontraron efectos positivos en infecciones experimentales con bacterias en *P. monodon* con concentraciones de 0,5 y 1.0 mg/ml de glucanos, pero no fue efectivo a 0,25 y 2.0 mg/ml de glucanos. El efecto protector duró hasta 18 días después de la inmersión. En el presente trabajo se observó, de forma similar, un efecto significativo ($p < 0.05$) de la dosis de aplicación en la concentración de hemocitos.

En el presente estudio se observó un fuerte efecto ($p < 0.01$) del factor semana de muestreo en la concentración de hemocitos en la hemolinfa de los camarones. En la Figura 14 se puede apreciar que estas variaciones parecían estar sincronizadas entre las piscinas, ya que tenían comportamiento similar.

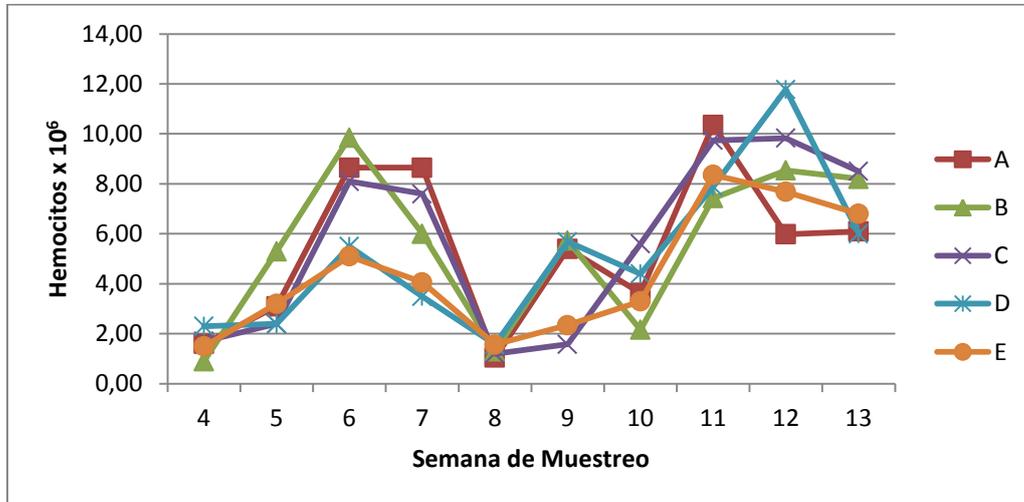


Figura 14. Evolución de la concentración de hemocitos por semana de muestreo.

Se encontró una correlación significativa ($p < 0.05$) para concentración de hemocitos en el 70% las posibles combinaciones entre piscinas (cuadro 10). No se pudo detectar cual fue la causa de este comportamiento, ya que este no era el objetivo del estudio. Esta variable se la controló en el diseño para disminuir el error aleatorio y de variables perturbadoras, aunque no para explicar la causa de este efecto (Kish 2004).

La causa de este efecto puede tener varias explicaciones tentativas: inestabilidad del efecto del inmunomodulador, efectos ambientales no reportados, procesos fisiológicos propios del animal a determinadas edades o por periodos de muda.

Sánchez *et al.* (2001) mencionan que el estrés provocado por variaciones de temperatura modifica el número de hemocitos. Al respecto Vargas-Albores *et al.* (1998), han sugerido que la temperatura determina la efectividad de la respuesta inmune. La variación en la temperatura que se registró durante el ciclo de cultivo, la cual osciló entre 26 y 29°C, pudo determinar estas variaciones en los conteos de hemocitos.

Vásquez *et al.*, (1998); y Okumura & Katsumi, (2000) reportaron que la cercanía a la etapa de ecdisis también afecta los niveles de la respuesta inmune de los crustáceos.

Por otra parte; Owen & O'Neill (1997) demostraron que el conteo de hemocitos totales no está influenciado por la edad, el peso, longitud del caparazón o fuente poblacional.

Otras posibles causas para este fenómeno pueden haber sido la concentración de patógenos en el medio, sin embargo; el diseño del experimento no permitió determinar esto, ya que no era uno de los objetivos del mismo.

Cuadro 10. Matriz de correlación entre piscinas para valores de concentración semanal de hemocitos. Los valores en negrilla son significantes con ($p < 0.05$).

Piscina	A (2g/kg)	B (4g/kg)	C (6g/kg)	D	E
A (2g/kg)		0.80	0.63	0.55	0.75
B (4g/kg)	0.80		0.62	0.69	0.79
C (6g/kg)	0.63	0.62		0.66	0.45
D	0.55	0.69	0.66		0.83
E	0.75	0.79	0.45	0.83	

Es importante notar que esta variación ligada al tiempo debe de ser tomada en cuenta para futuros trabajos, ya que si no la tomamos en cuenta, enmascararía el efecto del tratamiento. En este caso, de haber elegido un modelo con el tratamiento como única fuente de variación, no se habría podido detectar dicho efecto, obteniéndose un valor de significancia de $p = 0.37$.

Futuros trabajos también pueden realizarse para determinar más precisamente el efecto del inmunomodulador en la concentración de hemocitos en condiciones controladas, como acuarios. Sin embargo, aunque esto aumentaría la estabilidad del efecto del inmunomodulador, tal como comenta Kish (2004), esto conlleva a disminuir la representatividad y el realismo de los resultados obtenidos

El presente estudio no pudo demostrar el efecto de la inclusión del inmunomodulador en las variables de eficiencia de cultivo: peso promedio final, biomasa, supervivencia y factor de conversión alimentaria. Sin embargo hay que notar que el modelo usado solo permitía comparar el efecto de la inclusión o no del inmunomodulador, y no el de cada dosis del mismo. Ya que las dosis bajas (2g/kg y

4g/kg), las cuales no mostraron efecto en la respuesta inmune, estaban confundidas con la dosis que sí tuvo efecto (6g/kg), no podemos llegar a ninguna conclusión al respecto.

Es importante anotar que la potencia que tuvo la prueba utilizada para determinar efectos en las variables de producción, estuvo en alrededor de 18%, esto es, que en caso de haber existido un efecto, tenía una probabilidad del 82% de no detectar este efecto real (error tipo II). Se estimó que para futuros experimentos, en caso de querer determinar estos efectos, se debería de utilizar al menos 10 piscinas por cada tratamiento para tener un poder del 80%, y de 18 piscinas para cada tratamiento para una potencia del 95%.

No se pudo detectar efectos significativos en la salud aparente del camarón de la concentración de inmunomodulador en el alimento ($p=0.31$), aunque sí de la semana de muestreo ($p=0.04$). Sin embargo no se encontró ningún patrón claro en esta.

6. CONCLUSIONES

Basados en la información analizada es factible de llegar a las siguientes conclusiones:

1. La inclusión de inmunomoduladores en el alimento balanceado pueden incrementar el número de hemocitos en la hemolinfa de *Litopenaeus vannamei*
2. Se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) en concentración de hemocitos en hemolinfa entre el tratamiento alimentado con una dosis de 6g por kg de alimento balanceado de inmunomodulador y el control, pero no con respecto a los tratamientos con menor dosis (2 y 4g/kg), ni de estos últimos con el control.
3. Se detectó un efecto altamente significativo ($p < 0.01$) de la variable semana de muestreo, en la concentración de hemocitos en hemolinfa. Adicional a esto se observó una fuerte correlación ($p < 0.05$) de los valores semanales de dicha variable entre las distintas piscinas del ensayo. Esto parece indicar que la concentración de hemocitos en hemolinfa podría estar ligada a algún factor ambiental, como temperatura; presencia de patógenos en el medio, o algún otro elemento de estrés. Sin embargo no se pudo demostrar cual era dicho factor.
4. Aunque la concentración de hemocitos en los camarones con dieta de de 6g de inmunomodulador por kg de balanceado, resultó estadísticamente mayor que las concentraciones del control. es importante replicar el experimento bajo condiciones más controladas, debido a que existió una gran inestabilidad en la concentración de hemocitos durante el periodo del cultivo.
5. No se pudo detectar efecto significativo ($p < 0.05$) de la inclusión inmunomodulador en peso final de cosecha, supervivencia, biomasa ni factor de conversión alimentaria. Esto se puede deber, ya sea porque el diseño utilizado no tuvo la suficiente potencia (18%), o porque no existió este efecto en realidad.

6. Es importante determinar si el efecto de aumento de hemocitos que se obtuvo en el tratamiento con mayor dosis tiene repercusión en los parámetros de producción, ya que solo esto justificaría su uso.
7. La metodología de conteo de hemocitos, utilizada para determinar el estado inmunitario de los camarones es aplicable para ser usada en sistemas de producción comercial, debido a que es sencilla, requiere poca inversión y permite obtener resultados rápidamente.
8. Esta metodología puede proporcionar un método que le permitirá al acuicultor monitorear (in vivo) el estado inmunológico del camarón en la finca.
9. Una baja concentración de hemocitos podría llegar a considerarse como un marcador de baja salud en los animales, por lo que una buena producción de estos, conjuntamente con factores medioambientales adecuados, podrían influenciar de manera positiva en la prevención de enfermedades.
10. El número de hemocitos y los factores de estrés guardan relación con enfermedades del camarón cultivado en cautiverio, es por esto que se debe mantener animales con sistemas inmunes bien modulados.

7. RECOMENDACIONES

Con base en lo anteriormente revisado, se puede emitir las siguientes recomendaciones:

1. Se aconsejaría utilizar una dosis de 6g de inmunomodulador por kilogramo de alimento balanceado, si se desea aumentar la concentración de hemocitos en la hemolinfa de *Litopenaeus vannamei*. Sin embargo, no se ha demostrado que esto repercuta de una manera favorable en los parámetros de producción, por lo que se debería comprobar esto, antes de utilizarlo en piscinas de cultivo comercial.
2. Para futuras pruebas para determinar el efecto del inmunomodulador en los parámetros de producción en piscinas comerciales de *Litopenaeus vannamei*, se recomienda utilizar un tamaño de muestra de al menos 10 réplicas por cada tratamiento.
3. En caso de querer mantener fijos los factores ambientales externos que causan variación en la concentración de hemocitos en camarón, se recomienda realizar pruebas en acuarios.
4. Se puede incluir el conteo de hemocitos en los muestreos semanales de salud del camarón en camaroneras, como una medida del estado inmune del camarón.
5. Es aconsejable mantener los parámetros físicos, químicos y biológicos en equilibrio adecuado, para evitar los cambios bruscos que podrían causar estrés en el animal y de esta manera asegurar una respuesta inmune adecuada.
6. Se debe de mejorar el método rápido utilizado para detectar la salud aparente del camarón, de tal forma que se lo pueda utilizar de forma más eficiente como un indicador del estado de la misma, tanto para experimentos como para el manejo rutinario de los cultivos.
7. Es importante el desarrollo de pruebas organizadas, correctamente diseñadas y rigurosamente analizadas, siguiendo el método científico; por esta razón se debería incentivar a los productores para mejorar sus habilidades experimentales, lo cual les llevaría a mejorar el manejo de sus estanques.

8. Se recomienda continuar con la investigación en campo (in vivo) del uso de inmunomoduladores, para determinar el efecto real de estos en los parámetros de eficiencia de cultivo, como son: supervivencia, crecimiento, biomasa y factor de conversión alimentaria.
9. Se debe también continuar con estas investigaciones para detectar la dosis óptima de inmunomodulador, así como la frecuencia de aplicación del mismo.
10. Es recomendable realizar mayor investigación en campo para determinar el efecto de otros factores en la concentración de hemocitos en camarón, así como para conocer cómo se comportan estos a lo largo del tiempo.

8. LITERATURA CITADA

- Arala-Chavez, M. & Sequeria, T. (2000).** Is there any Kind of adaptive immunity in invertebrates. *Aquaculture*, 191,247-258.
- Alabi, A.O ., J.W. Latchford, D.A. Jones. 2000.** Demonstration of residual antibacterial activity in plasma of vaccinated *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* 187:15–34
- Bell, & Smith. (1993).** In vitro Superoxide production by hyaline cell of the shore crab *Carcinusmaenas* (L).*Developmetal and Comparative Immunology*, 17,211-219.
- Bachère, E; Mialhe, E. (1995a).** Knowledge and research prospects in marine mollusc and Crustacean immunology. *Aquaculture*, 132,17-32.
- Bachere, E. (2000).** Shrimp immunity and disease control. *Aquaculture*, 191,3-11
- Bachere, E. (2002).** Anti-Infections immune effectors in marine invertebrate. Potential for disease control in larviculture.*Aquaculture*,237,427-438.
- Cheng. (2002).** Hemolymph oxyhemocyanin, protein, osmolality, and electrolyte levels of white Shrimp. *Litopenaeus vannamei* in relation to size and molt stage. *Aquaculture*, 211,325-339.
- Chen & Chen. (2000).** Effects of pH, temperature and Salinity on immune parameters of the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Fish Shellfis Immunology*, 10,387-391.
- Celso, D.B.A. 2000.** Biochemical responses in penaeids caused by contaminants. *Aquaculture* 191: 163-168
- Delphine. (2000).** Los hemocitos, células de defensa contra las enfermedades del camarón marino, *Journal of Science* 113, pp 461-469.
- Duvic, B; & Söderhäll, K. (1990).** Purification and partial Characterization of a β 1,3-glucan binding protein membrane receptor from blod cell of Crayfish *Pasifastacus leniusculus*. *Eur. J. Biochen* 207,223-228.
- Destoumieux, D. (1997).** Penaeidins, a new family of antimicrobial péptides isolated from the Shrimp *.Litopenaeus vannamei* (Decapoda). *The journal of Biological Chemistry*, 272(45), 28398-28406.

- Destoumieux, D. Cols. (2000).** Penaeidins, a family of antimicrobial peptides from penaeid Shrimp (Crustacea, Decapoda). CMLS, Cellular and Molecular Life Science, 57,1260-1260.
- Espinoza, O. Yuri. (2003).** Inmunoestimulación temprana de *L vannamei* para inducir una mayor respuesta inmune al virus de la mancha blanca, Tesis de grado, CENAIM.
- Gullian, M; & Rodriguez, J. (2002).** Immunostimulant qualities of Probiotic Bacteria, Global Aquaculture Advocate magazine. Key word: Immunostimulant
- Hasson, K; W. Lightner. (1999a).** Taura Syndrome Virus (TSV) lesion development and the disease cycle in the pacific White Shrimp *Litopenaeus vannamei* Diseases of Aquatic Organisms,36,81-93.
- Hose, & Martin. (1987).** Cytochemical features of shrimp hemocytes. Biological Bulletin,173,178-187.
- Johnson, P. T. (1987).** A. review of fixed phagocytic and pinocytotic cell of decapods crustaceans, with remark on hemocytes. Developmental and comparative Immunology,11,679-704.
- Johansson, & Söderhäll. (1989).** Cellular immunity in crustaceans and the proPo system Parasitology Today,5(6),171-176.
- Jussila, J., S. McBride, J. Jago, y L.H. Evans. 2001.** Hemolymph clotting time as an indicator of stress in western rock lobster (*Panulirus Cygnus* George). Aquaculture 199: 185-193
- Kish, L. (2004).** Statistical Design for Research, John Wiley & Sons. 3-5.
- López, L; Claudia et al. (2005).** Inmunoprofilaxis para el mejoramiento de la calidad Sanitaria de Especies Acuícolas, Panorama Acuícola 20-21. Palabra clave inmunología.
- Lee, S.Y; & Söderhäll, K. (2002).**Early events in Crustacean innate immunology,12,421-437.
- Muñoz, M; & Montesdeoca. (2002).**Expression on distribution of penaeidin antimicrobial peptides are regulated by hemocyte reactions in microbial Challenged Shrimp.Eur.J.Biochem,269,2678-2689.

- Maldonado, V. Martha. (2003).** Respuesta inmunitaria en familias de *Litopenaeus vannamei*, bajo condiciones de infección con WSSV y el efecto de la adición de B 1-3 glucanos, Tesis de grado, CENAIM.
- Martínez, F. (2007).** Sistema Inmune de Camarones, Boletín Científico de Nicovita.
- Marrero, J. (2002).** Efecto de los Lipopolisacáridos sobre el número de Hemocitos y la producción de Oxido Nítrico en el camarón Blanco (*Litopenaeus schimitti*), Universidad de la Habana, revista Investigaciones Marinas 23 (3), pp. 221-227.
- Montesdeoca, B. (2002).** Parámetros Inmunitarios en camarones juveniles *Litopenaeus vannamei* en piscinas camaroneras infectadas con White Spot virus, Universidad Técnica de Manabí. Palabra clave: Hemocitos.
- Morales, V. & J. Cuéllar-Anjel, (eds.). (2008).** Guía Técnica - Patología e Inmunología de Camarones Peneidos. Programa CYTED Red II-D Vannamei, Panamá, Rep. de Panamá. 270 pp.
- Muñoz, M. (2000).** Measurement of reactive oxygen intermediate production in haemocytes of the penaeid shrimp, *Litopenaeus vannamei*, Aquaculture 191, pp 89-107.
- Pascual Cristina, (2007).** Bases teórico prácticas para el conteo de células sanguíneas en camarones cultivados, Facultad de Ciencias Universidad Autónoma de México (UNAM).
- Rendón, L; & Balcazar J. L. (2003).** Inmunología de Camarón: Conceptos básicos y recientes avances, revista AquaTIC # 19 pp. 27-33.
- Rodríguez, J. & Le Moullac, G. (2000).** State of the art of immunological tools and health control of Penaeid Shrimp, Aquaculture magazine 191, pp 109-119. Key Words: immune survey, penaeid shrimp, health control.
- Rodríguez, J; & Echeverría, F. (1995).** El camarón *Peneaeus vannamei* sus patógenos virales, estado actual de conocimientos de mecanismos de defensa celular, CENAIM-ESPOL, palabra clave Hemocitos.

- Rodriguez, J. (1995).** Characterization of shrimp haemocytes and plasma components by monoclonal antibodies, *Journal of Cell Science magazine* 108,pp 1043-1050. Key Words: crustacean, haemocyte subpopulation, immunity.
- Ruiz Uribe, (2007).** Citospin, una alternativa para el estudio y caracterización morfológica de Hemocitos de camarones Peneidos, *revista Ciencia y Mar XI (31)*, PP 33-38.
- Sahtout, A; & H. Hassan, (2001).** DNA fragmentation, an indicator of apoptosis, cultured black tiger shrimp *Penaeus monodon* infected with White spot syndrome virus (WSSV) *Diseases of Aquatic Organisms*, 44,155-159.
- Smith, V.J.; Söderhäll, K. (1983).** B1,3 glucan activation of crustacean hemocytes in vitro and in vivo. *Biological Bullentin*,164,299-314.
- Soderhall, K; Cerenius, L; (citado por Martinez. (1992).** Crustacean immunity. *Annual Rev. of Fish Disease*,3-23.
- Sonnenholzner, S., J. Rodríguez, F. Pérez, I. Betancourt, F. Echeverría, and J. Calderón. (2002).** Supervivencia y respuesta inmune de camarones juveniles *Litopenaeus vannamei* desafiados por vía oral a WSSV a diferentes temperaturas. *Boletin El Mundo Acuícola* 8(1), 50-56.
- Song, Y.L., and Y.T. Hsieh. (1994).** Immunostimulation of tiger shrimp (*Penaeus monodon*) hemocytes for generation of microbicidal substances: Analysis of reactive oxygen species. *Developmental Comparative Immunology* 18, 201-209.
- Sung, H.H., G.H. Kou, and Y.L. Song. (1994).** Vibriosis resistance induced by glucan treatment in tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Fish Pathology* 29, 11-17.
- Thörnqvist, & Söderhäll, (1997).** Psonic activity of cell adhesion protein and β -1,3 glucan binding proteins from two Crustaceans. *Developmental and Comparative Immunology*,18(1),3-12.
- Owen, & O'neill. (1997).** Use of a clinical cell flow Cytometer for differential Counts of prawn *Penaeus monodon* haemocytes. *Disease of Aquatic Organisms*,31,147-153.
- Vásquez, L; & Colls. (1998).** Mecanismos de Inmunidad en Crustáceos, *Revista Interciencia* vol. 23 # 6 pp. 344-348. Palabra clave Inmunidad en crustáceos

- Van de Braak, C.B; T., Faber, R; Boon, J. H. (1996).** Cellular and humoral Characteristics of *Penaeus monodon* (Fabricius, (1798) haemolymph. Comparative hematology International,6,194-203.
- Vargas-Albores. (1998).** Influence of temperature and salinity on the yellow leg Shrimp, *Penaeus californiensis* Holmes, prophenoloxidase system aquaculture Research,29,549-553.
- Van de Braak, (2002).** Preliminary Study on haemocyte response to White spot Syndrome Virus infection in black tiger Shrimp *Penaeus monodon*. Diseases of Aquatic Organisms,51,149-15.

9. GLOSARIO.

Aglutinación, Reacción inmunológica que se efectúa cuando se combinan antígenos particulados con sus anticuerpos específico, presentando mayor facilidad y alta sensibilidad de precipitación.

Actividad antibacteriana, del plasma corresponde a un elemento primordial del sistema inmunitario anti-infeccioso que protege al camarón de septicemias originadas por alteraciones de tejidos internos. Los camarones tienen capacidad de defensa mediante péptidos antibacterianos con propiedades microbicidas contra bacterias gram-, gram + y hongos. Estos péptidos antibacterianos son pequeñas proteínas que se fijan en la membrana de las bacterias y la perforan.

Apoptosis, es una forma de muerte celular, que está regulada genéticamente. Glándulas intestinales (que es un epitelio de crecimiento rápido) y durante la lactancia en su período preparatorio, en que el tejido mamario aumenta su masa celular. Está en equilibrio respecto de la mitosis en los tejidos adultos sanos.

Bacterias, término genérico que cubre el conjunto de los microorganismos unicelulares con núcleo desprovisto de membrana, con cromosoma único, generalmente con una pared exterior, y capaces de multiplicarse por escisiparidad. Los microorganismos unicelulares procariontes son los seres más primitivos y resistentes que habitan la tierra. Ocupan todos los hábitats conocidos, desde los hielos de la Antártida hasta las profundidades de los océanos. Especies vivientes caracterizadas por ser unicelulares y producir cambios en su estructura, capaces de ser cultivadas y reproducidas por un elemento orgánico no vivo.

Coagulación, la cutícula forma una protección del cuerpo muy eficaz como barrera contra la invasión de los agentes patógenos externos. Sin embargo, puede ser alterado accidentalmente por heridas. Así la coagulación es un importante proceso en los camarones ya que permite el rápido sellado de las heridas para prevenir pérdidas de hemolinfa y también para evitar el ingreso de microorganismos.

Citotoxicidad, celular constituye uno de los mecanismos efectores de determinadas poblaciones celulares especializadas del sistema inmunitario, consistente en la capacidad para interactuar con otras células y destruirlas. Cualquier tipo celular, normal o patológico, puede ser potencialmente susceptible a

las células citotóxicas, y se emplea gráficamente el término "células diana" (target cells) para su designación.

Encapsulación, nivel de focos infecciosos, numerosos hemocitos intervienen en conjunto, lo que resulta en estructuras multicelulares de encapsulación y después de **Nodulación**, dentro de los cuales los patógenos son destruidos, en particular mediante el proceso de:

Melanización, la melanina es una molécula tóxica para las bacterias y los hongos cuya producción está regulada por una enzima: la fenoloxidasa. Este tipo de estructura puede ser observada en histología.

Fagocitosis, la fagocitosis es la más común de las reacciones de los organismo. Son procesos digestivos enzimáticos propios, se observan en las células fagocitarias otros fenómenos que conducen a la formación de radicales de oxígeno, altamente reactivos y tóxicos, este proceso oxidativo es conocido como:

Choque respiratorio, y se caracteriza por el incremento de la actividad metabólica de los fagocitos como respuesta a estímulos provocados por partículas foráneas, durante el choque respiratorio el oxígeno es reducido parcialmente en anión superóxido, que por un proceso de dismutación, puede ser convertido en peróxido de hidrógeno; otras reacciones formarán el singlete de oxígeno, el radical hidroxilo e hipohalógenos, estos radicales son tóxicos y tienen la capacidad de destruir microorganismos.

Inmunología, Rama de la biología que estudia los fenómenos inherentes a la inmunidad y, de una forma general, todos los procesos que tienen relación con la antigeneidad y con la elaboración de los anticuerpos.

Infección, irrupción en un organismo vivo de un agente extraño microscópico (microbio, virus, hongo) capaz de multiplicarse o de secretar toxinas.

Inmunidad, es el conjunto de procesos de defensa que se manifiestan ante la presencia de moléculas extrañas (Vásquez *et al.*, 1998). Durante la evolución se han seleccionado dos sistemas que proveen defensa interna contra agentes infecciosos; el sistema inmune innato natural y el adquirido que es adaptativo (van de braak *et al*, 1996), la inmunidad adquirida es filogenéticamente joven, se encuentra solamente en vertebrados y opera a través de los linfocitos.

Inocular, poner un microorganismo, o una sustancia que lo contenga, sobre o dentro de un organismo o un substrato.

Inmunomodulador, las sustancias inmunoestimulantes tienen la cualidad de poner en alerta al sistema inmune y son por regla general extraídas de las paredes de microorganismos como bacterias gram negativas (lipopolisacáridos), bacterias gram positivas (peptidoglicano) y de hongos, levaduras y algas (β-glucanos).

Hemograma, (cuantificación de células hemocitaria), el hemograma corresponde a la determinación del número de hemocitos/ml de hemolinfa extraída del camarón con una solución anticoagulante. La cuantificación de las células se realiza por observación microscópica (fotónica) en un hemocitómetro de tipo Neubauer.

Hemocito, células características responsables de la respuesta inmune de los crustáceos. Serán estudiados con detalle en la unidad correspondiente al sistema inmunológico.

Hemocito hialino, presentan un delgado citoplasma basófilo, un núcleo amplio y céntrico. Son células que se adhieren y se extienden fácilmente, no contienen gránulos densos. Los hemocitos hialinos inician la defensa contra patógenos externos con el proceso de coagulación, un mecanismo crítico que sirve para proteger al camarón de una pérdida excesiva de líquidos así como para capturar e inmovilizar microbios invasores.

Hemocito granuloso, se caracterizan por ser células grandes, poseen grandes gránulos, alta relación citoplasma-núcleo y excéntrico, inclusiones citoplasmáticas, así como un retículo endoplasmático liso y ribosomas libres en citoplasma. Estos hemocitos almacenan las enzimas que constituyen el sistema proPO en los crustáceos a un nivel más alto que los semigranulosos. Los hemocitos granulosos secretan enzimas defensivas que dan muerte a los microbios antes de ser eliminados por otros granulocitos mediante los procesos de fagocitosis o encapsulación, una vez que los microbios son encapsulados o fagocitados; el proceso de melanización (que también es liderado por los hematocitos granulosos) los deja inertes y los prepara para ser expulsados mediante la excreción cuticular o durante el próximo ciclo de muda.

Hemocito semigranuloso, poseen un núcleo esférico o en forma de herradura y muchos gránulos pequeños de forma redondeada. En los camarones, estas células intervienen en la fagocitosis, encapsulación y en la liberación del sistema profenoloxidasa (proPO) (melanización). Además ellas sintetizan y liberan las peneidinas, péptidos antimicrobianos, tienen moderada refringencia cuando se observan al microscopio de contraste de fase.

Juvenil, estadio en el cual un organismo ha adquirido la morfología del adulto, pero aun no es capaz de reproducirse.

Mionecrosis, Es una forma grave de gangrena (muerte tisular) causada generalmente por el *Clostridium perfringes* infección necrosante subcutánea También puede provenir del grupo de estreptococos A. El *Staphylococcus aureus* y el *Vibrio vulnificus* pueden causar infecciones similares. Nombres alternativos: Infección tisular por *Clostridium*; Infección de los tejidos por *Clostridium*.

Peritrófica, Constituye la porción más larga de intestino. La mucosa intestinal está compuesta por un epitelio simple, columelar descansando en una membrana basal. La musculatura está representada por una capa circular y una capa longitudinal.

Peneidinas, Los péptidos antimicrobianos son proteínas que presentan actividades antibacterianas (bacterias Gram positivas) y antifungales. En particular, muchos estudios han investigado la caracterización de péptidos antimicrobianos, que matan o inhiben el crecimiento de microorganismos (Destoumieux y cols. 2000). Estos mismos autores demostraron que las peneidinas son mayormente sintetizadas en los hemocitos, donde ellas son continuamente procesadas y almacenadas; y en tal caso almacenadas dentro de los gránulos citoplasmáticos. Las peneidinas se clasifican dentro de tres grupos distintos basados en secuencias de aminoácido, estructuras secundarias y similaridad funcional.

Radicales oxigenados tóxicos, muchos compuestos oxigenados son tóxicos para las células vivas, los más importantes reactivos oxigenados son: el anión superóxido o singlete de oxígeno (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), y el radical hidroxilo (OH).

10. ANEXOS.

ANEXO I.- Resultados de los conteos de hemocitos (en 10^6 hemocitos por mililitro).

Tratamiento =>			2 gr/kg	4 gr/kg	6 gr/kg	Control	Control
Semana	Fecha	Días	Piscina A	Piscina B	Piscina C	Piscina D	Piscina E
1		0	0	0	0	0	0
2		8	0	0	0	0	0
3		15	0	0	0	0	0
4	oct-01	22	1,60	0,90	1,70	2,30	1,50
5	oct-08	29	3,10	5,30	2,40	2,40	3,20
6	oct-15	36	8,65	9,85	8,10	5,50	5,10
7	oct-22	43	8,65	6,00	7,60	3,49	4,06
8	oct-29	50	1,05	1,30	1,20	1,57	1,57
9	nov-05	57	5,40	5,73	1,58	5,68	2,35
10	nov-12	64	3,63	2,16	5,60	4,40	3,30
11	nov-19	71	10,36	7,43	9,74	7,89	8,36
12	nov-26	78	5,98	8,54	9,83	11,78	7,68
13	dic-03	85	6,10	8,20	8,50	6,00	6,80

ANEXO II.- Resultados de la prueba tuckey para diferencias entre medias por niveles de inclusión del inmunomodulador en la dieta.

Tratamiento	{2g/kg} 0.75	{4g/kg} 0.75	{6g/kg} 0.82	{Control} 0.71
2g/kg		1.00	0.28	0.66
4g/kg	1.00		0.27	0.68
6g/kg	0.28	0.27		0.03
Control	0.66	0.68	0.03	

ANEXO III.- Resultados de la prueba tuckey para diferencias entre medias por semana de muestreo.

Semana	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}	{11}	{12}	{13}
	0.41	0.62	0.92	.82	0.37	0.84	0.67	0.99	0.98	0.91
4		0.07	0.00	0.00	1.00	0.00	0.02	0.00	0.00	0.00
5	0.07		0.01	0.08	0.02	0.05	0.99	0.00	0.00	0.01
6	0.00	0.01		0.81	0.00	0.93	0.03	0.94	0.96	1.00
7	0.00	0.08	0.81		0.00	1.00	0.27	0.22	0.25	0.88
8	1.00	0.02	0.00	0.00		0.00	0.01	0.00	0.00	0.00
9	0.00	0.05	0.93	1.00	0.00		0.18	0.33	0.38	0.97
10	0.02	0.99	0.03	0.27	0.01	0.18		0.00	0.01	0.04
11	0.00	0.00	0.94	0.22	0.00	0.33	0.00		1.00	0.89
12	0.00	0.00	0.96	0.25	0.00	0.38	0.01	1.00		0.92
13	0.00	0.01	1.00	0.88	0.00	0.97	0.04	0.89	0.92	

ANEXO IV.- Porcentaje semanal de camarones aparentemente enfermos en las piscinas de prueba.

Semana	Piscina A	Piscina B	Piscina C	Piscina D	Piscina E
4	0.00%	0.24%	0.20%	0.42%	0.29%
5	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.25%
6	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.23%
7	0.21%	0.14%	0.00%	0.00%	0.00%
8	0.00%	0.20%	0.00%	0.00%	0.00%
9	0.19%	0.70%	0.00%	0.19%	0.00%
10	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
11	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
12	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
13		0.00%	0.00%	0.44%	0.00%

ANEXO V.- Resultados a cosecha de peso promedio final; supervivencia; biomasa; y factor de conversión alimentaria, obtenidos en las piscinas de prueba.

Piscina	Tratamiento	Peso Final (g)	Supervivencia (%)	Biomasa (lbs/Has)	CA
A	Inmunomodulador	15.2	83%	1815	0.8
B	Inmunomodulador	15.0	80%	1732	1.0
C	Inmunomodulador	13.6	82%	1598	0.9
D	Control	13.9	90%	1798	0.8
E	Control	13.9	68%	1354	0.9

ANEXO VI.- Pesos promedios (en gramos) obtenidos en los muestreos semanales en las piscinas de prueba.

Semana	Piscina A	Piscina B	Piscina C	Piscina D	Piscina E
4	2.36	1.23	1.35	0.77	0.96
5	4.11	2.13	2.02	2.6	2.7
6	6.62	3.39	3.29	4	2.7
7	8.83	5.74	5.32	5.87	5.12
8	11.05	7.44	7.13	8.84	7.3
9	12.42	9.14	9.2	9.55	8.75
10	14.13	10.7	10.3	11.6	10.2
11	14.44	12.5	12.05	12.25	11.9
12	15.2	14.2	12.49	13.86	12.8
13		15	13.6	13.9	13.9