

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS

MAESTRIA EN OCEANOGRAFIA COSTERA



"EFECTO DEL CARRAGENANO EN EL SISTEMA INMUNOLOGICO
DE LA LANGOSTA *Panulirus interruptus*"

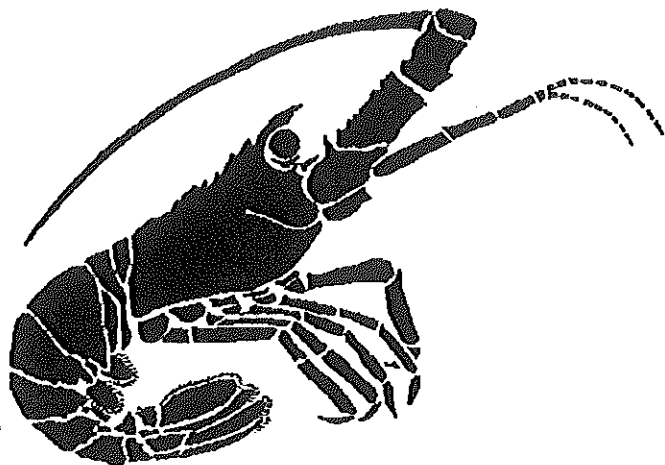
TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

SONIA ARACELI SOTO RODRIGUEZ



ENSENADA, B.C., JUNIO DE 1993

DEDICATORIA

"Date tiempo para trabajar,
es el precio del éxito.
Date tiempo para pensar,
es la fuente del poder.
Date tiempo para jugar,
es el secreto de la eterna juventud.
Date tiempo para leer,
es fundamento de la sabiduría.
Date tiempo para ser amistoso,
es el camino de la felicidad.
Date tiempo para amar y ser amado,
es el privilegio de los dioses.
Date tiempo para compartir,
la vida es demasiado breve para ser egoísta.
Date tiempo para reír,
la risa es la música del alma".

Proverbio islandés.

A MIS PADRES, CON TODO CARIÑO QUE ME HAN APOYADO
MORALMENTE EN TODO MOMENTO,

A MI HERMANA MIREYA, A QUIEN ADMIRO TANTO POR SU
FUERZA, TEMPLE, Y OPTIMISMO EN LA VIDA. QUIEN SIEMPRE HA SIDO
MI EJEMPLO A SEGUIR Y UN GRAN APOYO EN TODAS LAS EMPRESAS QUE
ME HE PROPUESTO EN LA VIDA. GRACIAS HERMANA. .

A MI SOBRINO PONCHO, CON TODO EL CARIÑO DE SIEMPRE,
ESPERO NO DEFRAUDARTE NUNCA.

Y A TODO MIS AMIGOS QUE CON PACIENCIA ME SOPORTARON
EN LOS MOMENTOS DIFICILES.

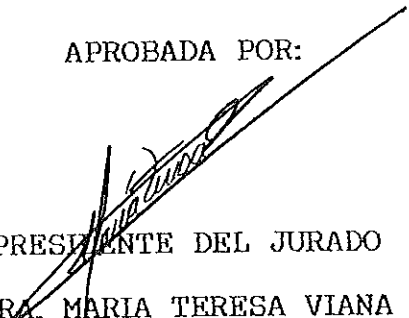
EFFECTO DEL CARRAGENANO EN EL SISTEMA INMUNOLOGICO DE
LA LANGOSTA *Panulirus interruptus*

T E S I S

QUE PRESENTA:

SONIA ARACELI SOTO RODRIGUEZ

APROBADA POR:



PRESIDENTE DEL JURADO

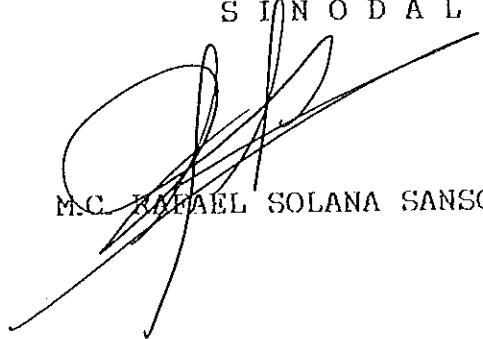
DRA. MARIA TERESA VIANA

S I N O D A L



M.C. ANTONIO SILVA LOERA

S I N O D A L



M.C. RAFAEL SOLANA SANORES

RESUMEN

Se evaluó el efecto del carragenano sobre los hemocitos de la langosta *Panulirus interruptus* en ensayos *in vivo* e *in vitro*. Las pruebas *in vivo* fueron de dos tipos: una, con langostas libres y confinadas en jaulas y otra, utilizando como control y tratamiento al mismo grupo de langostas. En esta última, primero, las langostas fueron los controles y después, se utilizaron como tratamientos. Para todos las pruebas al TRATAMIENTO se le administró carragenano (0.2 mg ml^{-1}) y al CONTROL, solución salina estéril. A intervalos de tiempo, se extrajeron muestras de hemolinfa y se determinó el conteo total de hemocitos (CTH) y el conteo diferencial de hemocitos (CDH). Para esto último, los hemocitos se clasificaron en: prohialocitos (PRO), hialocitos (HIA), granulocitos (GRA) y granulocitos de gránulos grandes (GGG) calculando el porcentaje de cada uno. El CTH del experimento con langostas libres no mostró diferencias significativas ($\alpha=5\%$) en los tiempos analizados; con langostas confinadas, la significancia se presentó a las 6, 12 y 24 h. Cuando las mismas langostas se utilizaron como sus propios controles fue significativo a las 6, 12, 24, 36 y 72 h. En todas las pruebas *in vivo* los controles mostraron los CTH menores comparados con los tratamientos, indicando que el carragenano amortigua el decremento del nivel celular durante la experimentación. En cuanto al CDH, la significancia varió en cada tiempo de acuerdo al tipo de hemocito. La correlación de los tipos de hemocitos del experimento utilizando como control y tratamiento al mismo grupo de langostas, mostró que existe una relación lineal inversa entre los HIA y GRA ($p<0.001$) para el control y tratamiento.

En los experimentos *in vitro* *Vibrio* presentó los porcentajes de asociación mayores con respecto a los de *E. coli*, así mismo, los porcentajes aumentaron con el aumento de la concentración de carragenano. Esto indicaría que el carragenano puede incrementar la capacidad fagocítica (si se relaciona con el grado de asociación) de los hemocitos. Las muestras de *E. coli* incubadas en suero de langosta mostraron porcentajes más grandes comparadas con las muestras incubadas en solución fisiológica, lo que demuestra la propiedad de opsonización de los factores humorales de la hemolinfa de la langosta.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo formó parte del proyecto de investigación "Biotecnología de Productos Pesqueros para ser Aprovechados Dentro de la Acuicultura" del Instituto de Investigaciones Oceanológicas, financiado por la Secretaria de Educación Pública dentro del programa SEP/DIGICSA de acuerdo al convenio No. 91-01-02-001-648.

Se agradece a las Sociedades Cooperativas de Producción Pesquera "La Purísima", S.C.L. y "Bahía Tortugas", S.C.L. por el suministro de langostas en óptimas condiciones que se utilizaron durante la experimentación de este trabajo de tesis.

Así mismo, se agradece a la empresa Tecnología y Servicios del Mar, S.A. de C.V. (TECMAR) por el pescado fresco que se utilizó como alimento para las langostas.

También al Ocean. Alfredo Salas y Ocean. Eugenio Carpizo por facilitarnos el Laboratorio de Moluscos donde se mantuvieron a las langostas durante la experimentación y por su ayuda durante la misma.

Muy especialmente a la Dra. Meredith Gould por su infinita paciencia, valiosa asesoría y por permitirme obtener las fotografías de microscopio de este trabajo; a la maestra Victoria Orozco Borbón y M. C. Roxana Rico por su asesoría en los aspectos bacteriológicos y las aportaciones de material.

De igual manera a los integrantes del proyecto "Bioquímica Marina": Carmen, Lucy, Alejandra y Elda por su ayuda durante el manejo de las langostas y especialmente, por su apoyo moral en todo momento. También a Marco y Saúl por su compañerismo demostrado en tantas horas que compartimos en el laboratorio. También se agradece a los servicios sociales del proyecto por su trabajo y esfuerzo.

Por supuesto, a la directora del proyecto, Dra. María Teresa Viana, por su tiempo incondicional que siempre ha mostrado con todas nosotras.

A Edgar Ruiz y Ana Luisa Tovar por la asesoría computacional que me brindaron y sobre todo por su paciencia.

Y a todos aquellos que se escapan a la memoria y que contribuyeron de una u otra manera a la realización del trabajo.

CONTENIDO

	Pag.
INDICE DE FIGURAS.....	iii
INDICE DE TABLAS	iv
1.0 INTRODUCCION	
1.1 Transportación de langostas vivas	1
1.2 Mecanismo de defensa interna de crustáceos	5
1.3 Activación <i>in vitro</i> del mecanismo de defensa interno de crustáceos	7
2.0 OBJETIVOS	12
3.0 MATERIALES Y METODOS	
3.1 Condiciones preliminares a la experimentación	13
3.1.1 Determinación de las características biométricas y mantenimiento del cultivo	13
3.1.2 Selección de las condiciones para el manejo de los hemocitos de langosta	15
3.2 Registro de la variación temporal de hemocitos: conteo total y clasificación	16
3.3 Experimento con langostas libres y confinadas	18
3.4 Experimento utilizando como control y tratamiento al mismo grupo de langostas	20
3.5 Ensayo de asociación <i>in vitro</i>	22
3.5.1 Preparación de los cultivos de bacterias	23
3.5.2 Incubación de bacterias, preparación de monocapas y ensayo de asociación	24
4.0 RESULTADOS	
4.1 Registro de la variación temporal de hemocitos: conteo total	26
4.2 Clasificación y conteo diferencial de hemocitos (CDH).....	28
4.3 Experimento con langostas libres y confinadas	32
4.3.1 Langostas libres	32
4.3.2 Langostas confinadas	35
4.4 Experimento utilizando como control y tratamiento al mismo grupo de langostas	42
4.5 Ensayo del grado de asociación	49
5.0 DISCUSIONES	
5.1 Registro de la variación temporal de hemocitos	54
5.2 Clasificación y conteo diferencial de hemocitos (CDH).....	56
5.3 Experimentos <i>in vivo</i> con carragenano.....	59
5.4 Ensayo del grado de asociación	69

6.0 CONCLUSIONES 73

7.0 BIBLIOGRAFIA 74

8.0 ANEXOS 82

INDICE DE FIGURAS

	Pag.
1. Fórmula estructural del lambda carragenano (tomado de McHugh, 1987)	11
2. Registro mensual de temperatura y de <i>P. interruptus</i> . Los cuadros indican el promedio de hemocitos $\text{ml}^{-1} \times 10^6$ (CTH), las barras el error estándar y los triángulos la temperatura promedio del agua	27
3. Esquema de los cuatro tipos de hemocitos encontrados en <i>Panulirus interruptus</i> . a, prohialocitos; b, hialocitos; c, granulocitos y d, granulocitos de gránulos grandes....	31
4. Incrementos del conteo total de hemocitos (CTH) para el grupo control y tratamiento del experimento con langostas libres. Las curvas se construyeron con los incrementos de la tabla II.....	34
5. Incrementos del conteo total de hemocitos (CTH) para el grupo control y tratamiento del experimento con langostas confinadas. Las curvas se construyeron con los incrementos de la tabla III	37
6. Porcentaje promedio del conteo diferencial de hemocitos por tiempos del experimento con langostas confinadas	39
7. Incrementos del conteo total de hemocitos (CTH) para el grupo control y tratamiento del experimento con el mismo grupo de langostas. Las curvas se construyeron con los incrementos de la tabla IV	44
8. Porcentaje promedio del conteo diferencial de hemocitos por tiempos del experimento utilizando como control y tratamiento al mismo grupo de langostas	46
9. Grado de asociación entre hemocitos y bacterias utilizando diferentes concentraciones de carragenano en muestras incubadas en suero de langosta (INC) e incubadas en medio para hemolinfa de langosta (SINC)....	50
10. Granulocito refráctil de gránulos grandes de <i>P. interruptus</i> sin bacterias adheridas (CONTROL)	51
11. Hemocitos de la langosta <i>P. interruptus</i> . a, granulocito no refráctil de gránulos pequeños con <i>E. coli</i> adherida; b, granulocitos refráctiles con <i>E. coli</i> adherida y aglomeración de esta bacteria	53

INDICE DE TABLAS

	Pag.
I. Principales características de los cuatro tipos de hemocitos encontrados en la <i>langosta roja</i> <i>Panulirus interruptus</i>	29
II. Conteo total de hemocitos (CTH) e incrementos del CTH para el control y tratamiento en cada tiempo del experimento con langostas (<i>P. interruptus</i>) libres	33
III. Conteo total de hemocitos (CTH) e incrementos del CTH para el control y tratamiento en cada tiempo del experimento con langostas (<i>P. interruptus</i>) confinadas.....	36
IV. Conteo total de hemocitos (CTH) e incrementos del CTH para el control y tratamiento en cada tiempo del experimento utilizando como control y tratamiento al mismo grupo de langostas (<i>P. interruptus</i>)	43
V. Características fisicoquímicas y flujo del agua de los tanques de mantenimiento de las langostas. Valores promedio durante la experimentación	82
VI. Equivalencia del diagrama de Aiken (1980) a los estadios mayores y subdivisiones del ciclo de muda en crustáceos	82

1.0 INTRODUCCION.

1.1 TRANSPORTACION DE LANGOSTAS VIVAS.

En México la langosta se encuentra entre los seis productos de mayor participación en la exportación pesquera (Anuario Estadístico de Pesca, 1989). Para 1991 la producción de langosta fue de mil toneladas que aportaron 15 millones 890 mil dólares al país (Indicadores de la Producción Pesquera, 1991). La pesquería está altamente regionalizada y apoyada básicamente por cinco especies del género *Panulirus* (White, 1847): *P. interruptus* (langosta roja), *P. inflatus* (langosta azul), *P. gracilis* (langosta verde), *P. penicillatus* (langosta de Isla Socorro) y *P. argus* (langosta caribe) (Ruiz-Durá, 1985).

De las cinco especies del género *Panulirus* (White, 1847) distribuidas en México, la langosta roja *Panulirus interruptus*, representa el 52 % de las capturas comerciales. Es por esto que la langosta *P. interruptus* es la especie de mayor importancia económica (Situación Actual de las Principales Pesquerías Mexicanas, 1988).

Anteriormente, la langosta era una especie reservada a las sociedades cooperativas; actualmente, la nueva Ley Federal de Pesca extiende la comercialización de este crustáceo a cualquier sector de la población mediante un permiso o una

concesión (Ley Federal de Pesca 1992). La mayor producción a nivel nacional se obtiene en la costa occidental de Baja California. Para el período 1981-87 esta zona contribuyó con un promedio de 45.53 % del volumen total de langosta, del cual aproximadamente el 90 % se destinó a la exportación y el resto al mercado interno (Ayala-Martínez et al., 1988).

La comercialización se realiza principalmente en forma de langosta entera cocida y congelada y cola fresca congelada (Anuario Estadístico de Pesca, 1989). En México desde 1957, fecha en la que se inició la explotación de la langosta, se establecieron los períodos de veda y al mismo tiempo se prohibió la exportación de langosta viva (Chapa, 1964). Recientemente, se decretó la venta de langosta viva (Diario Oficial de la Federación, 1992) circunstancia que propiciará mayor impulso en el renglón de la exportación de langosta.

Uno de los países que tiene basta experiencia en el transporte de langosta viva es Canadá, donde se han realizado desde hace tiempo experimentos dirigidos hacia la optimización de este tipo de transporte. McLeese en 1958 probó diferentes tipos de empaques variando la temperatura para determinar el tiempo al que se mantenía a los organismos en buenas condiciones. Seis años después, McLeese y Wilder en 1964 editaron un reporte acerca de los factores que influyen en el transporte de langosta viva. En dicho reporte, encontraron que,

aunque las langostas son organismos marinos pueden, bajo ciertas condiciones favorables, vivir fuera del agua por períodos considerables. Más tarde, en 1965, McLeese descubrió que existe una relación inversa entre la tasa metabólica de la langosta y el tiempo de sobrevivencia fuera del agua en condiciones de aire húmedo. Actualmente, son Canadá y Cuba los países que cuentan con la tecnología más avanzada en el transporte de langosta viva (Lamadrid y Blanco, 1986).

Estudios sobre los efectos de la exposición al aire de langostas se han enfocado principalmente a la bioquímica de la hemolinfa (McMahon *et al.*, 1978; Vermeer, 1987), en los que se demostró que los cambios químicos en la hemolinfa de la langosta no son letales, sino más bien inducen a un estrés que puede resultar peligroso (Vermeer, 1987).

Aunque la langosta es un organismo muy resistente al manejo, durante el traslado, debe permanecer fuera del agua durante horas. En este tiempo sufre de un estrés muy agudo al no encontrarse en su medio natural. De esta manera, el organismo se torna muy susceptible a microorganismos oportunistas (Sindermann, 1990). La exposición al aire y daños corporales que sufren en el transporte en vivo facilita la entrada de microorganismos que pueden ser patógenos, principalmente bacterias y hongos. Las bacterias son epibiontes comunes de los crustáceos en un medio natural. En ausencia de

estrés, estas bacterias no causan daño, pero en presencia de éste pueden provocar una grave infección (Johnson, 1983). De la misma manera, cuando factores abióticos como la temperatura, concentración de amonía o de oxígeno se mantienen por debajo los niveles óptimos, las langostas reducen su resistencia a infecciones microbianas (Fisher et al., 1978).

Entre las enfermedades de langosta más comunes se encuentran las relacionadas con la erosión del caparazón causadas por bacterias quitinolíticas entre las que destacan los géneros *Vibrio* y *Pseudomonas*. Las bacterias pueden penetrar a los tejidos blandos destruyendo el exoesqueleto y aunque no provocan una enfermedad fatal inmediata, proveen un puente de entrada a patógenos más peligrosos (Getchell, 1989; Estrella, 1990; Sindermann, 1990). Además, desde el punto de vista comercial langostas con lesiones en la quitina del caparazón pierden su valor.

En virtud de lo anterior los crustáceos requieren de un mecanismo de defensa interno bien equipado para controlar todo tipo de agentes invasores.

1.2 MECANISMO DE DEFENSA INTERNA DE CRUSTACEOS.

El sistema inmunológico en vertebrados tiene dos divisiones funcionales: el sistema innato que provee respuestas no específicas y el sistema adquirido que provee respuestas específicas. El sistema innato actúa como una primera línea de defensa contra agentes infecciosos y depende de la respuesta del huésped al primer contacto con el patógeno (Roitt *et al.*, 1989; Sindermann, 1990). Si el huésped sobrevive a este primer contacto, se activa el sistema adquirido, esto es, el organismo adquiere resistencia (inmunidad) y produce una reacción específica a cada agente infeccioso que puede persistir por períodos variados una vez que se ha desarrollado (Roitt *et al.*, 1989).

En los crustáceos, el mecanismo de defensa interna, sea innato o adquirido al igual que en vertebrados es de dos tipos: **CELULAR** y **HUMORAL**. El primero está constituido por células sanguíneas o hemocitos. En langostas se clasificaron en cuatro tipos: prohialocitos, hialocitos, granulocitos eosinófilos y granulocitos cromofóbicos (Cornick y Stewart, 1978) y cumplen diversas funciones como fagocitosis, coagulación de la hemolinfa, reparación de heridas, encapsulación, etc. (Bauchau, 1981). La fagocitosis es el proceso por medio del cual las células pueden ingerir material extraño y envolverlo en vacuolas dentro del citoplasma para

luego digerirlo con la ayuda de enzimas hidrolíticas (Roit et al., 1989). Este mecanismo, se considera, como la principal defensa celular auxiliada por los factores humorales de la hemolinfa. La velocidad y efectividad de acción fagocítica en algunos crustáceos, posiblemente mediada por factores humorales, determina la sobrevivencia (Sindermann, 1990). Cada tipo de hemocito tiene la capacidad de fagocitar, aunque los prohialocitos y hialocitos son más activos que los granulocitos (Bauchau, 1981; Söderhäll y Cerenius, 1992).

El reconocimiento de partículas extrañas por crustáceos involucra la cuantificación *in vitro* de la actividad fagocítica y del grado de asociación entre las células de la hemolinfa y las partículas de prueba donde generalmente se utilizan bacterias o eritrocitos de borrego (Paterson y Stewart, 1974; Smith y Ratcliffe, 1978; Söderhäll et al., 1986). En la medición del grado de asociación se incluyen todas aquellas partículas adheridas a los hemocitos, extracelular e intracelularmente (Smith y Ratcliffe, 1978).

El mecanismo de defensa humoral en crustáceos se constituye por una serie de sustancias disueltas en la hemolinfa (también llamadas factores humorales) como aglutininas, precipitinas y bactericidinas que le confieren actividad lítica y aglutinante al organismo contra agentes invasores (Sindermann, 1990).

Ambos mecanismos, el celular y humoral, trabajan como un sistema totalmente integrado para disminuir los efectos y eliminar agentes extraños (Sindermann, 1990).

1.3 ACTIVACION *in vitro* DEL MECANISMO DE DEFENSA INTERNA DE CRUSTACEOS.

Se ha descubierto que los mecanismos de defensa internos de crustáceos tanto humoral como celular, pueden, en condiciones experimentales, ser activados por ciertas substancias. Se han probado endotoxinas microbianas, bacterias vivas o muertas, glucanos (polisacáridos complejos algunos de cadena muy larga o ramificados) y lipopolisacáridos (carbohidratos de estructura compleja con cadenas de ácidos grasos que le confieren caracter lipídico) (McKay y Jenkin, 1970 a,b; Söderhäll, 1983; Söderhäll y Häll, 1984; Goldenberg *et al.*, 1984):

En estudios con cangrejos de río (*Parachaeraps bicarinatus*) donde se les inyectó bacterias muertas y endotoxinas, se observó un aumento en el número de hemocitos (McKay y Jenkin, 1970a). Posteriormente Goldenberg *et al.*, 1984, postularon la hipótesis de que los hemocitos de crustáceos, al igual que los fagocitos de mamíferos, podrían ser activados. Estos investigadores encontraron que los hemocitos circulantes de langosta fueron estimulados *in vitro*

por lipopolisacáridos (LPS) para la fagocitosis de eritrocitos.

En cuanto al mecanismo celular de defensa de crustáceos, se ha encontrado que estos pueden ser activados por glucanos con enlaces β -1,3. En 1977 Unestam y Söderhäll reportaron que el laminarán (glucano con enlaces β -1,3 extraído del alga *Laminaria hyperborea*) estimula la actividad de la fenoloxidasa, enzima que se localiza en los hemocitos de crustáceos e interviene en el proceso de coagulación de la hemolinfa. Posteriormente, en trabajos con cangrejos de río (*Astacus*) se descubrió que los glucanos β -1,3 promovían la síntesis de proteínas a partir de la activación de la fenoloxidasa y que también participan en la coagulación (Söderhäll *et al.*, 1979). En estudios con *Limulus sp.* se encontró que el grado de coagulación de la hemolinfa dependía de la concentración de los glucanos que activan la transformación de coagulógeno a coagulina. Con estos resultados los investigadores proponen un mecanismo de cascada para la coagulación de la hemolinfa (Kakinuma *et al.*, 1981; Morita *et al.*, 1981).

Experimentos *in vitro* con cangrejos de río (*Astacus astacus*) y marinos (*Carcinus maenas*) revelaron que el laminarán aumenta la fagocitosis de bacterias por los hemocitos (Smith y Söderhäll, 1983). En posteriores investigaciones sobre la activación de la fenoloxidasa en crustáceos por glucanos se

propone que este sistema enzimático de cascada constituye un mecanismo de reconocimiento de agentes extraños (Söderhäll, 1983; Söderhäll y Häll, 1984).

Otras investigaciones confirman que el laminarán interviene en el mecanismo celular de defensa por activación *in vitro* de la fagocitosis de bacterias mediada por la enzima fenoloxidasa y proponen un mecanismo de cooperación celular (Söderhäll *et al.*, 1986). Recientemente, esta investigación propone un mecanismo bioquímico para la activación de la fenoloxidasa por glucanos con enlaces β -1,3 (Söderhäll, 1992).

Otros glucanos marinos (específicamente polisacáridos sulfatados del tipo de los carragenanos) presentan también actividad biológica. Su actividad biológica aparentemente está relacionada con el grado de sulfatación de la molécula (Ehresmann *et al.*, 1979). Existen estudios donde se midió la respuesta inmunológica innata de vertebrados utilizando varios tipos de carragenano. En dicho estudio se demostró que a mayor grado de sulfatación de la molécula se estimula más eficientemente la adhesión celular (Chong y Parish, 1985). El carragenano, es extraído de la pared celular de las algas marinas y está constituido por unidades alternantes de D-galactopiranosas unidas por enlaces α -1,3 y β -1,4 (Painter, 1983).

Existen varios tipos de carragenanos, que se clasifican de acuerdo al número de grupos sulfatos de la molécula, de los cuales el lambda carragenano es el más sulfatado (Figura 1).

En virtud de la similitud estructural entre el carragenano y los glucanos que estimulan los mecanismos de defensa interna de crustáceos, en este trabajo se pretende probar que el carragenano activa de manera similar al mecanismo de defensa celular de crustáceos. La activación del mecanismo celular se detectará de la siguiente manera: conteo total de hemocitos (CTH); conteo diferencial de hemocitos (CDH). Esto último, ya que como los hemocitos tienen diferentes funciones se quiere probar que el carragenano actúa en forma diferencial. Por último, se estimará el grado de asociación relacionandolo con la actividad fagocítica de los hemocitos. Se probará en la langosta roja *Panulirus interruptus*, con el objeto de brindarle una mayor resistencia durante su transporte en vivo. De esta manera podrá contrarrestar el efecto del estrés, combatir la acción de microorganismos patógenos y oportunistas que pueden causarle debilidad, pérdida de valor comercial o muerte.

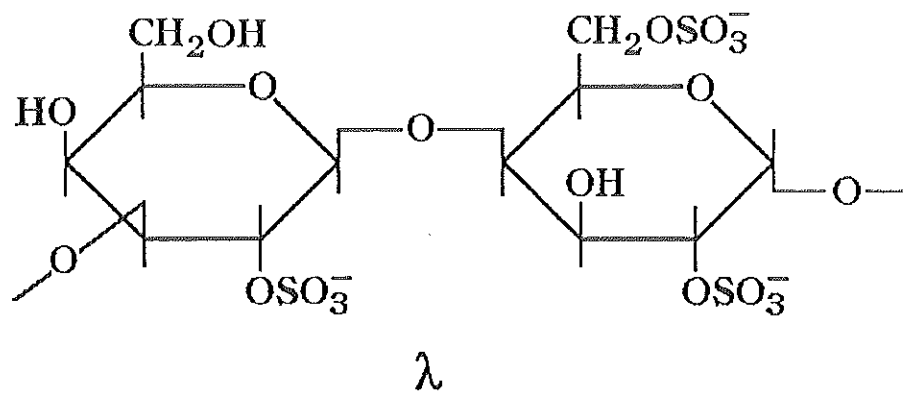


Figura 1. Fórmula estructural del lambda carragenano (Tomado de McHugh, 1987).

2.0 OBJETIVOS.

- A. Evaluar el efecto del carragenano *in vivo* mediante el conteo total y diferencial de hemocitos de la langosta *Panulirus interruptus*.

- B. Cuantificar el grado de asociación *in vitro* entre los hemocitos de la langosta *P. interruptus* y las bacterias *Vibrio parahaemolyticus* y *Escherichi coli* en presencia de carragenano.

3.0 MATERIALES Y METODOS.

3.1 CONDICIONES PRELIMINARES A LA EXPERIMENTACION.

3.1.1 DETERMINACION DE LAS CARACTERISTICAS BIOMETRICAS Y MANTENIMIENTO DEL CULTIVO.

Las langostas (*Panulirus interruptus*) se transportaron en avión desde Bahía Tortugas, B.C.S. hasta el laboratorio de moluscos perteneciente al Instituto de Investigaciones Oceanológicas en Ensenada, B.C. En total se manejaron tres tanques. Un tanque de experimentación con un área de 1.704 m² y una capacidad de 681.6 l, en el cual se colocaron 10 langostas. Dos tanques con un área de 0.667 m² y 166.75 l de capacidad, donde se mantuvieron de 10 a 15 langostas como suministro.

Se tuvieron durante un periodo de tres semanas para aclimatación de los organismo, tiempo en el que se registró el comportamiento y condiciones experimentales. Se separaron todas aquellas langostas con daños corporales o signos de enfermedad. Luego, se registró peso y longitud total (desde el rostrum hasta la punta del telson), se sexaron, marcaron y se colocaron trozos de tubo negro de ABS de 20 cm de largo por 15 cm de diámetro como refugio.

Se alimentaron a las langostas con trozos de pescado fresco (almacenado a $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$) de dos a cuatro veces por semana, de acuerdo a sus requerimientos (ausencia o presencia de restos). El alimento se removió después de 24 h. Antes y después de cada experimento se alternó este alimento con trozos de hígado de res, con el objeto de enriquecer la dieta (Stewart *et al.*, 1983).

Se registró la temperatura del agua, máxima, media y mínima (en el momento de la alimentación), para asegurar la buena calidad del agua, se limpiaron los tanques cuando menos dos veces por semana. Se registró el oxígeno, el pH, la salinidad y el flujo de agua cada dos semanas a lo largo del período de cultivo.

Durante toda la experimentación se observaron las condiciones fisiológicas normales de las langostas mediante la observación directa de su comportamiento, lesiones, enfermedades y registro de mudas.

Determinación del estado de muda.

El estado de desarrollo se determinó con el objeto de seleccionar a los grupos experimentales, ya que, en langostas durante la ecdysis existen cambios metabólicos muy pronunciados (Aiken, 1980). En camarones Penaeidos el número de células por volumen varía en función del ciclo de A a D₄ (Tsing *et al.*, 1989). Para esto, se hizo un pequeño corte en la

punta del telson de la langosta y se observó el grado de retracción de la cutícula en microscopio estereoscópico, comparando los resultados con los diagramas establecidos (Aiken, 1980).

3.1.2. SELECCION DE LAS CONDICIONES PARA EL MANEJO DE LOS HEMOCITOS DE LANGOSTA.

Se probaron varios medios fisiológicos para tratar de reproducir la composición iónica de la hemolinfa, entre ellos, la solución de Ringer para crustáceos (Cohen y Nemhauser, 1985), el buffer citrato/EDTA (Cohen y Nemhauser, 1985) y el medio para hemocitos de langosta (MHL) (Paterson y Stewart, 1974). Con estos medios salinos se probaron anticoagulantes clásicos en hematología como EDTA (10 mM), cisteína (0.3 M) (Lynch *et al.*, 1972) y un anticoagulante comercial de citrato disódico ACD (Sherwood Medical, TM).

Además se probaron las soluciones fijadoras de formol al 10 % en agua de mar sintética (FOR) y glutaraldeído al 1 % en MHL. En cada caso se seleccionó la solución que mostró mejores resultados.

PRUEBA DE VIABILIDAD DE HEMOCITOS.

La viabilidad de los hemocitos se observó en los medios salinos y en los experimentos del grado de asociación. La prueba se realizó de acuerdo al método de exclusión de azul

tripano de Phillips (1973) utilizado también por LaPeyre y Chu (1990) en crustáceos. El ensayo consistió en separar una alícuota de una muestra de hemolinfa, se mezcló con una cantidad igual de colorante azul tripano al 0.4% (en medio salino), esto se dejó reposar durante diez minutos y se observó al microscopio de luz. Teóricamente las células viables no deben teñirse mientras que las no viables se colorean de azul (Phillips, 1973).

3.2 REGISTRO DE LA VARIACION TEMPORAL DE HEMOCITOS: CONTEO TOTAL Y CLASIFICACION.

Se llevó un registro mensual de hemocitos para determinar los valores normales y la variabilidad con respecto al tiempo. Se tomaron muestras de hemolinfa, con una jeringa estéril de 1 ml (aguja No. 27) conteniendo formol al 10%. La muestra se extrajo de una sección lateral de la parte inferior del primer segmento abdominal. El volumen de hemolinfa osciló entre 0.2 y 0.3 ml, a partir de estas muestras se obtuvo el conteo total de hemocitos (CTH) con la ayuda de una cámara de Neubauer en microscopio de luz brillante (Baush & Lomb) y se reportaron como número de células ml^{-1} .

La clasificación de los hemocitos se realizó por las características morfológicas y de tamaño, de acuerdo a Cornick

y Stewart (1978). La morfología se observó en muestras frescas de hemolinfa, fijadas en formol y en frotis teñidos con las tinciones de Wright, Giemsa y Eosina-Policromo (Lynch *et al.*, 1972). Las mediciones se hicieron a cada tipo de hemocito (clasificados en cuatro) mediante un ocular con escala en micras previamente calibrado y a un aumento de 600X. También se llevó un registro del organismo y fecha de extracción de hemolinfa para evitar muestrear a la misma langosta.

Una vez definidos perfectamente cada tipo de hemocito en el momento de registrar el CTH, se obtuvo también el conteo de cada tipo de célula (conteo diferencial de hemocitos, CDH) que se reportó como porcentaje.

PREPARACION DE SOLUCIONES DE PRUEBA Y CONDICIONES EXPERIMENTALES.

En todos los experimentos la solución fisiológica que se utilizó, medio para hemocitos de langosta estéril, (MHL) se preparó de acuerdo a Paterson y Stewart (1974). La solución de prueba, lambda carragenano, se preparó a partir de una solución al 1 % de lambda carragenano en MHL con el que se hizo un estándar al 0.1 % (Smith y Söderhäll, 1983).

De la misma manera, para todos los experimentos, al grupo CONTROL siempre se le administró MHL y al grupo de TRATAMIENTO se le administró carragenano en MHL. Considerando

que el 20 % del peso total de las langostas corresponde a la hemolinfa (Phillips *et al.*, 1980) se realizaron los cálculos para que cada langosta recibiera 0.2 mg de carragenano por ml de hemolinfa (Smith y Söderhäll, 1983). En todos los casos la administración de la solución, así como la extracción de muestras se hicieron en una sección lateral de la parte inferior del primer segmento abdominal de la langosta, previo a la limpieza de la zona con MHL estéril. Únicamente se seleccionaron langostas sanas y en los estadios entre C y D (de acuerdo al diagrama de Aiken) para los experimentos (Anexo, Tabla VI).

3.3 EXPERIMENTO CON LANGOSTAS LIBRES Y CONFINADAS.

LANGOSTAS LIBRES.

Las langostas se seleccionaron al azar y se formaron dos grupos, el grupo I, con cuatro langostas como control, con pesos entre 390 y 789 g. El grupo II, con cuatro langostas como tratamiento, con pesos de 517 a 564 g.

Después de que se inyectaron a las langostas de ambos grupos (ver punto 3.2), se extrajeron muestras de hemolinfa en formol a 4°C en los siguientes intervalos de tiempo: 1, 3, 6, 12, 24, 36 y 48 h. Temperatura a la que siempre se mantuvieron y se analizaron lo más pronto posible. A partir de cada muestra se tomó una alícuota que se diluyó en formol para facilitar el

conteo. Se determinó para cada langosta y para cada tiempo muestreado el CTH con la ayuda de una cámara de Neubauer en microscopio compuesto de luz brillante (Baush & Lomb).

El análisis estadístico consistió en una prueba "t" de Student entre el grupo control y el tratamiento de los incrementos $(T_{n+1} - T_n)^1$ para cada tiempo a un $\alpha=5\%$ (Steel y Torrie, 1989).

LANGOSTAS CONFINADAS.

A diferencia del experimento con langostas libres, aquí se procedió a trabajar con las langostas confinadas en jaulas para observar alguna posible diferencia provocada por el encierro. Para esto, se construyeron jaulas de 25 X 30 X 40 cm con tela de malla gruesa (0.5 X 0.5 cm) facilitando la manipulación de los organismos. En este experimento, las langostas fueron pesadas y medidas para ajustar la cantidad de solución requerida. Se colocó una langosta por jaula marcada, 24 h antes del inicio del experimento en un tanque separado. De la misma manera que el primer experimento, se consideraron dos grupos seleccionados aleatoriamente, el grupo I con cuatro langostas como control, que pesaron entre 382 y 435 g, y el grupo II, con seis langostas como tratamiento con pesos de 522 a 800 g, con un total de 10 jaulas en el tanque.

Se tomó una muestra de hemolinfa a cada langosta, en

¹ - T_{n+1} es el número de células ml^{-1} en el tiempo $n+1$ y T_n es el número de células ml^{-1} en el tiempo n .

fomol al 10% a 4°C, antes de la inyección de las soluciones, que se consideró como el tiempo cero. Después de las inyecciones se tomaron muestras a las 0.5, 3, 6, 12, 24, 36, 48 y 72 h. De igual manera que en el primer experimento, se realizó el CTH y además el CDH a las muestras de cada langosta para cada tiempo.

El procedimiento estadístico para el CDH se aplicó al control y al tratamiento ($\alpha = 5\%$) y consistió en:

1. un análisis exploratorio de datos
2. una prueba "t" para cada tiempo y tipo de hemocito.
3. una prueba "t" de los incrementos ($T_{n+1} - T_n$).
4. Un análisis de correlación de todas las combinaciones posibles entre los tipos de hemocitos
5. Una prueba "t" entre los tratamientos del experimento con langostas libres y con langostas confinadas y una prueba "t" entre los controles de los mismos experimentos (Steel y Torrie, 1989).

3.4 EXPERIMENTO UTILIZANDO COMO CONTROL Y

TRATAMIENTO AL MISMO GRUPO DE LANGOSTAS.

En este experimento se realizó un análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados (Steel y Torrie, 1989) entre el peso (g) y el CTH de 48 langostas para descartar un factor de error debido la diferencia en pesos entre controles

y tratamientos.

Se pesaron y midieron todas las langostas y se hicieron los cálculos necesarios, el intervalo de pesos fue entre 390 y 610 g. A diferencia de los otros experimentos, éste se dividió en dos etapas. En la Etapa I se seleccionaron aleatoriamente diez langostas colocando una en cada jaula, 24 h antes de la experimentación. A este grupo que se le consideró CONTROL, se les inyectó MHL estéril únicamente. Un total de 10 jaulas en el tanque fueron mantenidas. Antes de la administración de MHL se tomó la muestra para el tiempo cero. Posterior a esto, se tomaron muestras a las 1, 3, 6, 12, 24, 36, 48 y 72 h y se siguió el mismo procedimiento que el experimento 2 en la obtención del CTH y CDH.

Las langostas permanecieron en un periodo de recuperación de dos semanas después de terminado el experimento, luego se tomaron muestras de tres langostas y se determinó el CTH para saber si los niveles de hemocitos se encontraban dentro de un valor aceptable.

Posteriormente se procedió a la Etapa II, donde, inicialmente, a las mismas langostas, se les tomó la muestra para el tiempo cero y después se inyectó el carragenano en MHL. Estos organismos fueron el TRATAMIENTO. Siguiendo el procedimiento antes descrito se extrajeron muestras de hemolinfa en los mismos intervalos de tiempo considerados en la

Etapa I y se realizó el CTH y el CDH para todas las muestras.

Todos los análisis estadísticos se realizaron con los datos de incremento ($T_{n+1} - T_n$) en el número de células del control y tratamiento ($\alpha = 5\%$). En el CTH y el CDH para cada tiempo, la estadística se dividió en cinco partes:

1. un análisis exploratorio de datos
2. una prueba F de homogeneidad de varianzas
3. una prueba "t" para cada tiempo.
4. una prueba "t" para cada tipo de hemocito.
5. Un análisis de correlación de todas las combinaciones posibles entre los tipos de hemocitos (Steel y Torrie, 1989).

3.5 ENSAYO DEL GRADO DE ASOCIACION *in vitro*.

Los ensayos de asociación se realizaron con las bacterias *Escherichia coli* y *Vibrio parahaemolyticus*. La densidad bacteriana se realizó únicamente para *E. coli* obtenida del laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias (UABC). La densidad (cel ml^{-1}) de esta bacteria en un medio de cultivo se puede determinar espectrofotométricamente previa a una curva de calibración (Post, 1983). Para esto, se hizo crecer *E. coli* (cepa pura) en un caldo nutritivo (BBL), se prepararon 10 diluciones (1:10) por triplicado y se anotó la absorbencia a una longitud de onda de 640 nm. Posteriormente se

volvieron a diluir las muestras (1:10) por triplicado y se inoculó cada una sobre placas de agar nutritivo. Las placas se incubaron a 37°C durante 24 h con agitación. Después se contaron las colonias en un contador de colonias Quebec y por último se realizó una regresión lineal por mínimos cuadrados entre el número de colonias y la absorbencia de acuerdo al método aplicado por Post (1983).

3.5.1 PREPARACION DE LOS CULTIVOS DE BACTERIAS.

Una cepa pura de *E. coli* se incubó durante 48 h en caldo nutritivo (BBL) a 20°C, luego se lavaron las bacterias por centrifugación con una solución amortiguadora de fosfatos salino estéril (BFS) a pH 7.0 y se suspendieron en este amortiguador. La densidad bacteriana se calculó mediante la absorbencia a una longitud de onda de 640, previa curva de calibración. Se diluyó la suspensión hasta llegar a la concentración requerida de 2.0×10^7 cel ml⁻¹ (Smith y Söderhäll, 1983).

Otra cepa pura de *V. parahaemolyticus* (obtenida del Departamento de Microbiología de CICESE) se incubó durante 48 h en peptona salina a 15°C (De Santiago-Fierro et al., 1976), luego las bacterias se lavaron por centrifugación utilizando agua de mar estéril a una dilución del 75 % y se suspendieron en MHL estéril. La densidad bacteriana se determinó experimentalmente de acuerdo a los resultados de seis ensayos del grado de asociación.

3.5.2 INCUBACION DE BACTERIAS, PREPARACION DE MONOCAPAS Y ENSAYO DE ASOCIACION.

Para la elaboración del suero se utilizaron de tres a cuatro langostas (para obtener de cinco a seis ml de hemolinfa). Suero que se preparó de acuerdo a Smith y Ratcliffe (1978), previo a cada experimento de asociación.

Una vez obtenida la densidad bacteriana, se procedió a dividir el ensayo en dos partes: una parte que se le llamó SINC y consistió en diluir *E. coli* y *V. parahaemolyticus* en proporción 1:10 en BFS y MHL respectivamente. La otra parte denominada INC consistió en diluir ambas bacterias en proporción 1:10 en suero fresco de langosta.

Ambos tratamientos (SINC e INC) se incubaron durante 1 h a una temperatura constante de 15 ± 0.5 °C con agitación ligera (MultiMixer Mistral, Lab-Line, Instr. Inc.).

En la preparación de las monocapas, primero se extrajo la hemolinfa en MHL con cisteína (40 mg/ml) como anticoagulante, se suspendieron las células en MHL suplementado con vitaminas y aminoácidos (Paterson y Stewart, 1974). Después se realizaron CTH's en una cámara de Neubauer para alcanzar la densidad de $1.5-2.0 \times 10^5$ cel ml⁻¹ (Paterson y Stewart, 1974). Se realizó también a diferentes tiempos la prueba de viabilidad de azul tripano descrita en la sección 3.1.2 para asegurar la viabilidad de células en las condiciones experimentales.

Posteriormente, se prepararon las monocapas de

hemocitos de acuerdo a Smith y Söderhäll (1983). Para este experimento se consideraron tres grupos, el grupo I, CONTROLES (monocapas inoculadas con BFS o MHL de acuerdo a la bacteria). El grupo II, TRATAMIENTOS SINC, se mezclaron partes iguales de la suspensión de bacterias que no se incubaron en suero (SINC) con 0.05, 0.1 y 0.5 % de carragenano en MHL y el grupo III, TRATAMIENTOS INC, se mezclaron partes iguales de la suspensión de bacterias incubadas en suero (INC) con las mismas concentraciones de carragenano.

Todas las monocapas se incubaron durante 1 h a una temperatura constante de $15 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ con agitación constante (MultiMixer Mistral, Lab-Line, Instr. Inc.). Después se fijaron las monocapas en glutaraldeído al 2.5 % y se examinaron bajo el microscopio de contraste de fases (American Optical). Para cuantificar el grado de asociación entre las bacterias y los hemocitos, se registraron todas las bacterias adheridas, tanto en el interior como en el exterior de los hemocitos, y se reportó en porcentaje de asociación en relación al número total de hemocitos observados, de acuerdo a la técnica descrita por Foley y Cheng (1975) y Smith y Ratcliffe (1978).

4.0 RESULTADOS.

4.1 REGISTRO DE LA VARIACION TEMPORAL DE HEMOCITOS: CONTEO TOTAL.

Las variaciones de las características fisicoquímicas del agua durante la experimentación se muestran en la Tabla V (Anexos).

La Figura 2 representa el monitoreo de hemocitos que se llevó a cabo en forma mensual a lo largo del año de 1992. La temperatura más alta fue en agosto (24.15 °C) y la más baja en enero (17.16 °C), donde el coeficiente de variación correspondiente fue de 11.14 %.

En cuanto al conteo total de hemocitos (CTH) se observan fluctuaciones (Figura 2) con un coeficiente de variación mayor (15.66 %), con un mínimo de 9.359×10^6 cel ml⁻¹ en marzo y un máximo de 16.101×10^6 cel ml⁻¹ en julio.

La curva que muestra el número de hemocitos en la Figura 2 varía de manera semejante a la curva de la temperatura, sin embargo, una correlación lineal entre ambas variables demuestra que no existe ningún grado de asociación ($r = 0.279$).

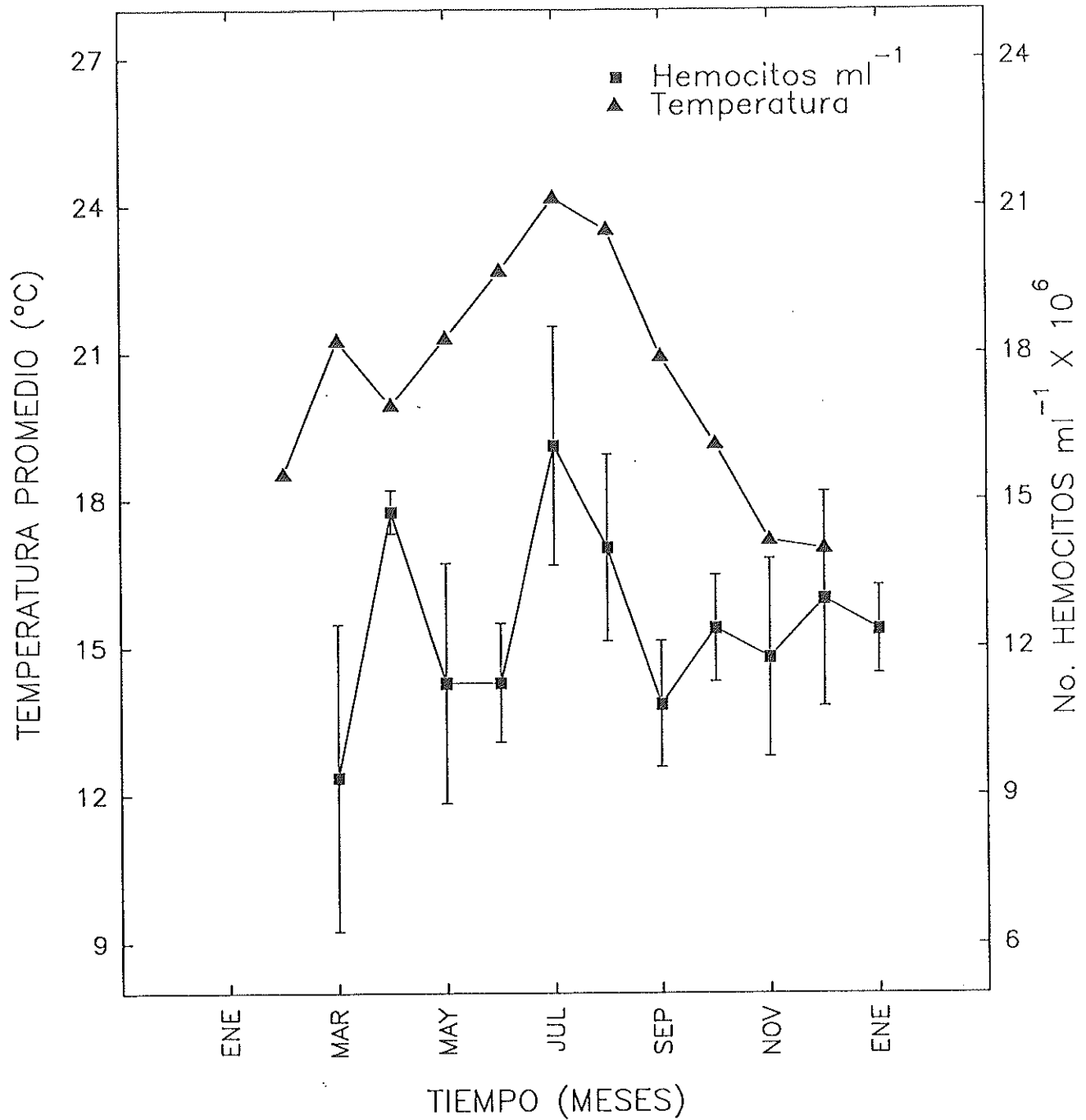


Figura 2. Registro mensual de temperatura y hemocitos de *P. interruptus*. Los cuadros indican el promedio de hemocitos $\text{ml}^{-1} \times 10^6$ (CTH), las barras el error estándar y los triángulos la temperatura promedio del agua.

4.2 CLASIFICACION Y CONTEO DIFERENCIAL DE HEMOCITOS (CDH).

Los hemocitos de langosta se clasificaron dependiendo de sus dimensiones y características de los gránulos (naturaleza refráctil, tamaño y número) en cuatro tipos básicos, de acuerdo a Cornick y Stewart (1978) (resumidos en la Tabla I).

Se observó que las medidas oscilaron entre las 12 y 22 μm . El tipo I (Prohialocitos) fue el que mostró mayor homogeneidad en el tamaño, con un error estándar de 0.065. Los demás tipos mostraron desviaciones similares entre sí. La tinción eosina-policromo fue la que dio mejores resultados. Es evidente en la Tabla I que no existe gran diferencia entre los tipos de hemocitos en muestras coloreadas. Las características más notables con la tinción radicaron en la intensidad del color, la condensación del núcleo y de los gránulos. El citoplasma no ayudó en la clasificación. En muestras húmedas fijadas, las diferencias fueron muy notables, de tal manera que en el tipo III (Granulocitos) se pudo distinguir otro subtipo (Tabla I).

Tabla I. Principales características de los cuatro tipos de hemocitos encontrados en la langosta roja *Panulirus interruptus*.²⁹

Tipo de hemocito Nombre ¹	% ² ± E.E.	Medida (μm) ³ ± E.E.	Características en muestras húmedas fijadas	Características con la tinción de eosina- policromo
1 PROHIALOCITO	2.262 0.074	12.721 0.065	Células esféricas, no refráctiles y sin gránulos en el citoplasma.	Núcleo muy condensado, se tiñe de azul marino; citoplasma sin teñir
2 HIALOCITO	80.729 0.288	17.49 0.154	La mayoría de las células ovoides, también en forma de huso; no refráctiles. Cuando se presentan gránulos en el citoplasma, estos son muy pocos y pequeños	El núcleo no tan condensado se tiñe de azul, el citoplasma de azul claro
3 GRANULOCITO	15.366 0.290	22.235 0.167	Los hemocitos pueden dividirse en dos: a) en forma de huso y alargados, refráctiles con pocos gránulos pequeños en el citoplasma. Poco abundantes. b) Formas diversas, la mayoría ovoides, refráctiles con numerosos gránulos grandes, más abundantes	Subtipo a) ¹ el citoplasma se tiñe de rosa, núcleo no muy condensado, de azul. Subtipo b) núcleo muy condensado se tiñe de azul marino, gránulos de azul, y citoplasma de azul claro
4 GRANULOCITOS DE GRANULOS GRANDES	1.830 0.072	19.800 0.132	La mayoría ovoide, células completamente empacadas de gránulos grandes; refráctiles. El núcleo a veces no se observa perfectamente	El núcleo, cuando es evidente, muy condensado y se tiñe de azul marino; el citoplasma de rosa o no se tiñe

¹ - De acuerdo a Cornick y Stewart (1978).

² - Porcentaje promedio de 580 determinaciones a partir de 32 langostas, ± error estándar.

³ - Promedio de 182, 367, 372 y 280 mediciones para los hemocitos 1, 2, 3 y 4 respectivamente, de 20 langostas. Las medidas se tomaron del eje longitudinal de cada hemocito en muestras de hemolinfa fijadas en formol.

El porcentaje promedio de los cuatro tipos de hemocitos de la langosta *Panulirus interruptus* de la Tabla I denota las diferencias entre los tipos de células; el tipo 1 y 4 representan los porcentajes menores (2.26 y 1.83 %, respectivamente) y el tipo 2 contiene más del 50 % del total (80.73 %). Los errores estándares obtenidos durante el análisis de 32 langostas resultaron bajos entre 0.072 y 0.290.

En la Figura 3 se presentan los esquemas de los cuatro tipos básicos de hemocitos elaborados a partir de muestras de hemolinfa fijadas en formol al 10 %, observados en un microscopio compuesto de luz brillante (Baush & Lomb).

Puede observarse en esta Figura que existe similitud morfológica entre los cuatro tipos de células con diferencias notables en cuanto al tamaño de la célula, número y dimensión de los gránulos. En base a estas características se determinó el conteo diferencial de hemocitos (CDH) que se reportó como porcentaje en la Tabla I.

Durante todos los experimentos siguientes el ciclo de muda fluctuó entre B y M (ver anexo, Tabla VI).

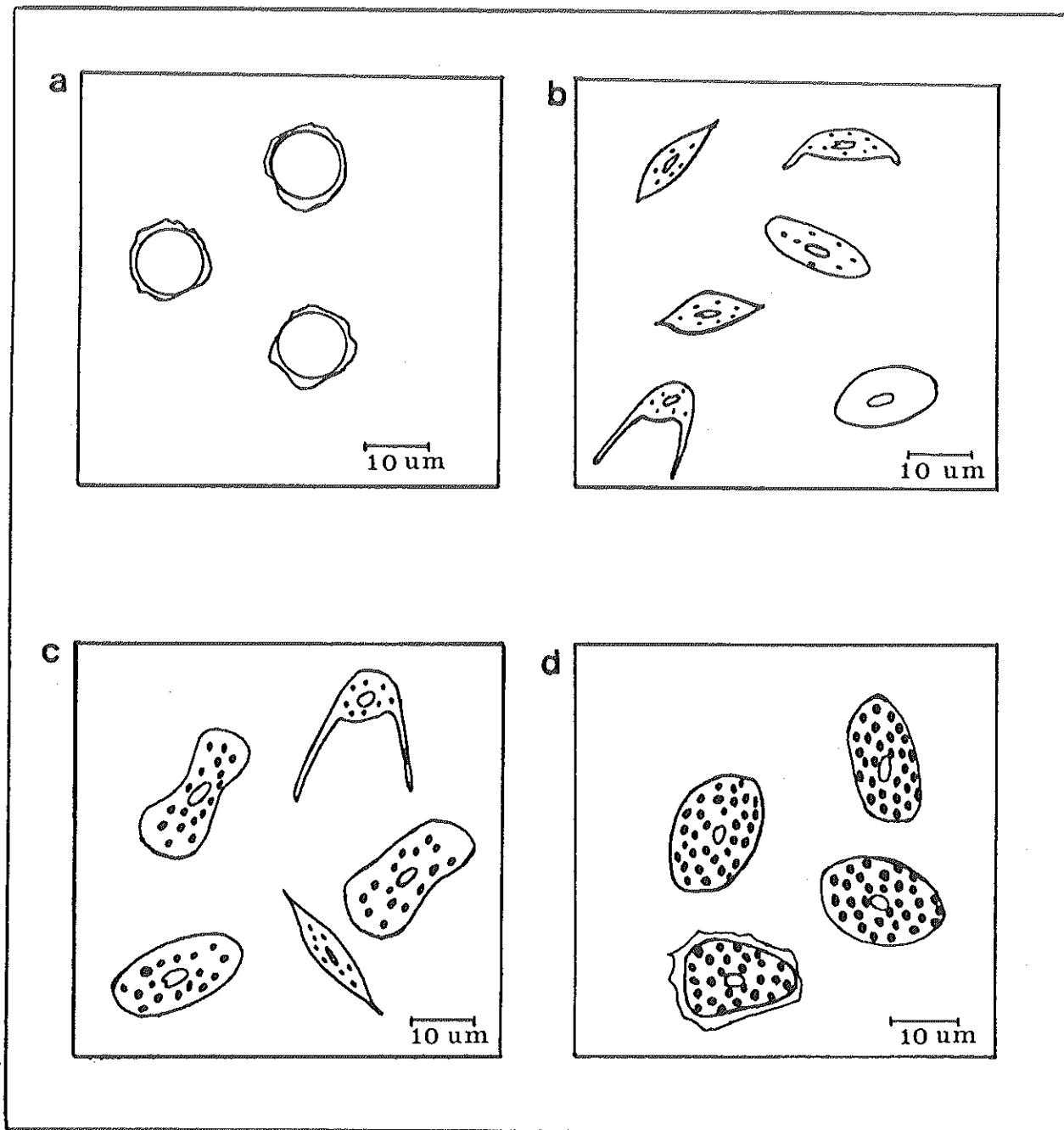


Figura 3. Esquema de los cuatro tipos de hemocitos encontrados en *Panulirus interruptus*. a, prohialocitos; b, hialocitos; c, granulocitos y d, granulocitos de gránulos grandes.

4.3 EXPERIMENTO CON LANGOSTAS LIBRES Y CONFINADAS.

4.3.1 LANGOSTAS LIBRES.

CONTEO TOTAL DE HEMOCITOS (CTH).

En virtud de que se registraron diferencias en el CTH desde el tiempo cero tanto de controles como en tratamientos, se transformaron los datos a valores de incrementos ($T_{n+1} - T_n$). Esto es, iniciando con el tiempo cero y restando el CTH del tiempo $n+1$ al valor correspondiente en el tiempo n . Esta transformación se aplicó a los tres ensayos con carragenano.

La Tabla II muestra los resultados obtenidos durante el experimento langostas libres y confinadas.

En cuanto al CTH (número hemocitos $\text{ml}^{-1} \times 10^6$), la diferencia entre el valor máximo y mínimo para el control fue de 16.953 que representa el doble de la diferencia en el tratamiento (8.771).

La diferencia en el CTH final-inicial de ambos grupos, no son tan grandes (7.358 para el control y 5.253 unidades para el tratamiento, (Tabla II). Un comportamiento similar se observa en los incrementos de la Tabla II para los máximos y mínimos. Sin embargo, el control posee un decremento (valor final e inicial) de casi el doble (-13.609) comparado con el tratamiento (-8.043).

Tabla II. Conteo total de hemocitos (CTH) e incrementos del CTH para el control y tratamiento en cada tiempo del experimento con langostas (*P. interruptus*) libres.

Tiempo n (h)	CONTROL		TRATAMIENTO	
	N = 4 CTH \pm E.E. ¹	INCREMENTO T _{n+1} - T _n ²	N = 4 CTH \pm E.E. ¹	INCREMENTO T _{n+1} - T _n ²
0	11.28 \pm 1.208		11.28 \pm 1.208	
1	28.233 \pm 2.23	0.0	19.877 \pm 3.53	0.0
3	24.488 \pm 3.50	-20.698	14.461 \pm 0.80	-14.013
6	23.615 \pm 4.12	-17.826	20.051 \pm 3.20	-3.007
12	15.300 \pm 2.4	-25.268	17.814 \pm 1.70	-10.833
24	11.763 \pm 1.53	-20.268	13.422 \pm 1.94	-12.989
36	15.294 \pm 0.92	-13.421	15.979 \pm 2.16	-6.040
48	18.638 \pm 2.50	-13.609	16.533 \pm 1.88	-8.043
MAX-MIN	16.953	25.268	8.771	14.013
FIN-INI	7.358	-13.609	5.253	-8.043

N= Número de langostas utilizadas.

En la Figura 4 están graficados los incrementos en el número de hemocitos del experimento con langostas libres, en

¹ - Valores promedio del número de hemocitos ml⁻¹ X 10⁶ \pm error estándar.

² - T_{n+1} es el número de hemocitos ml⁻¹ en el tiempo n+1 y T_n es el número de hemocitos ml⁻¹ en el tiempo n.

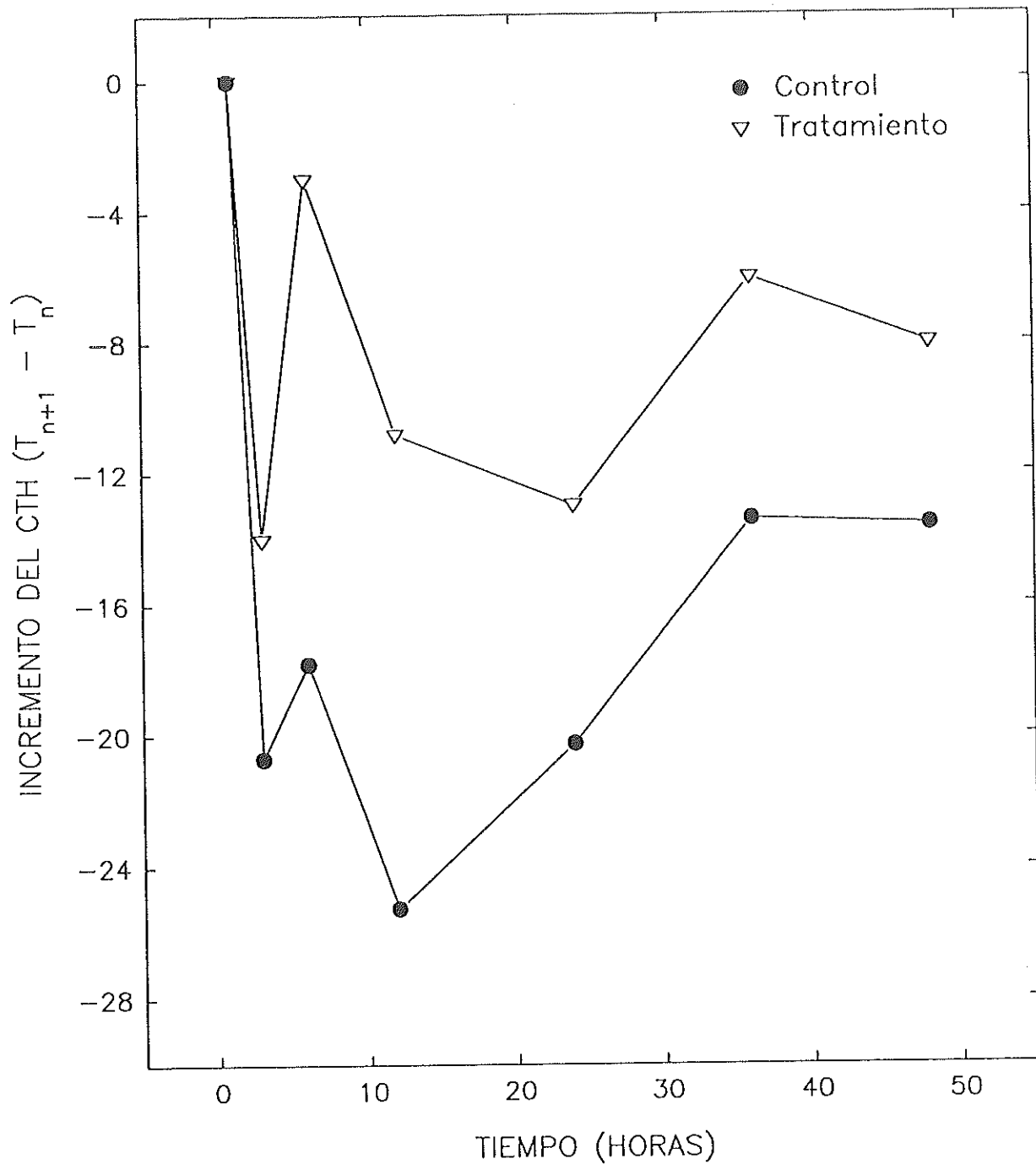


Figura 4. Incremento del conteo total de hemocitos (CTH) para el grupo control y tratamiento del experimento con langostas libres. Las curvas se construyeron con los incrementos de la Tabla II.

ambas curvas, control y tratamiento, se distinguen tres puntos críticos. Primero, una disminución muy fuerte en el número de hemocitos; segundo, un incremento y tercero, una recuperación celular.

En el primer punto crítico de la Figura 4, la disminución es mayor para el control (-20.698, Tabla II) con respecto al tratamiento (-14.013) y en general, los decrementos para el tratamiento siempre son menores.

ANALISIS ESTADISTICO.

La prueba "t" de Student para cada incremento ($T_{n+1} - T_n$) entre el grupo control y el tratamiento indica que no existen diferencias significativas a un $\alpha = 5\%$ en ningún incremento.

4.3.2 LANGOSTAS CONFINADAS.

CONTEO TOTAL DE HEMOCITOS (CTH).

La Tabla III muestra el CTH así como los incrementos en el CTH para cada intervalo de tiempo. La diferencia entre el máximo y el mínimo valor en el CTH es más del doble en el control (13.30, Tabla III) comparado con el tratamiento (5.31).

Por otro lado, la diferencia entre el CTH final e inicial es similar para ambos grupos (2.63 y 2.05).

Tabla III. Conteo total de hemocitos (CTH) e incrementos del CTH para el control y tratamiento en cada tiempo del experimento con langostas (*P. interruptus*) confinadas.

Tiempo n (h)	CONTROL		TRATAMIENTO	
	N = 4 CTH \pm E.E. ¹	INCREMENTO T _{n+1} - T _n ²	N = 6 CTH \pm E.E. ¹	INCREMENTO T _{n+1} - T _n ²
0	17.37 \pm 2.37		9.80 \pm 0.83	
0.5	26.08 \pm 3.62	0.00	13.56 \pm 0.77	0.00
3	23.49 \pm 6.56	-11.31	14.48 \pm 1.27	-2.38
6	19.67 \pm 3.56	-12.52	15.11 \pm 1.42	-3.12
12	17.190 \pm 1.12	-11.19	13.21 \pm 1.79	-5.64
24	15.52 \pm 2.01	-10.38	13.93 \pm 2.16	-3.08
36	12.78 \pm 1.71	-11.45	13.60 \pm 1.68	-4.08
48	15.71 \pm 2.57	-5.78	11.28 \pm 1.57	-6.07
72	20.00 \pm 1.26	-4.42	11.85 \pm 1.46	-3.18
MAX-MIN	13.30	12.52	5.31	6.07
FIN-INI	2.63	-4.42	2.05	-3.18

N = Número de langostas utilizadas

El comportamiento general de las curvas de la Figura 5 muestra tres puntos críticos. El primero, una drástica

¹ - Valores promedio del número de hemocitos ml⁻¹ X 10⁶ \pm error estándar.

² - T_{n+1} es el número de hemocitos ml⁻¹ en el tiempo n+1 y T_n es el número de hemocitos ml⁻¹ en el tiempo n.

EXPERIMENTO CON LANGOSTAS CONFINADAS

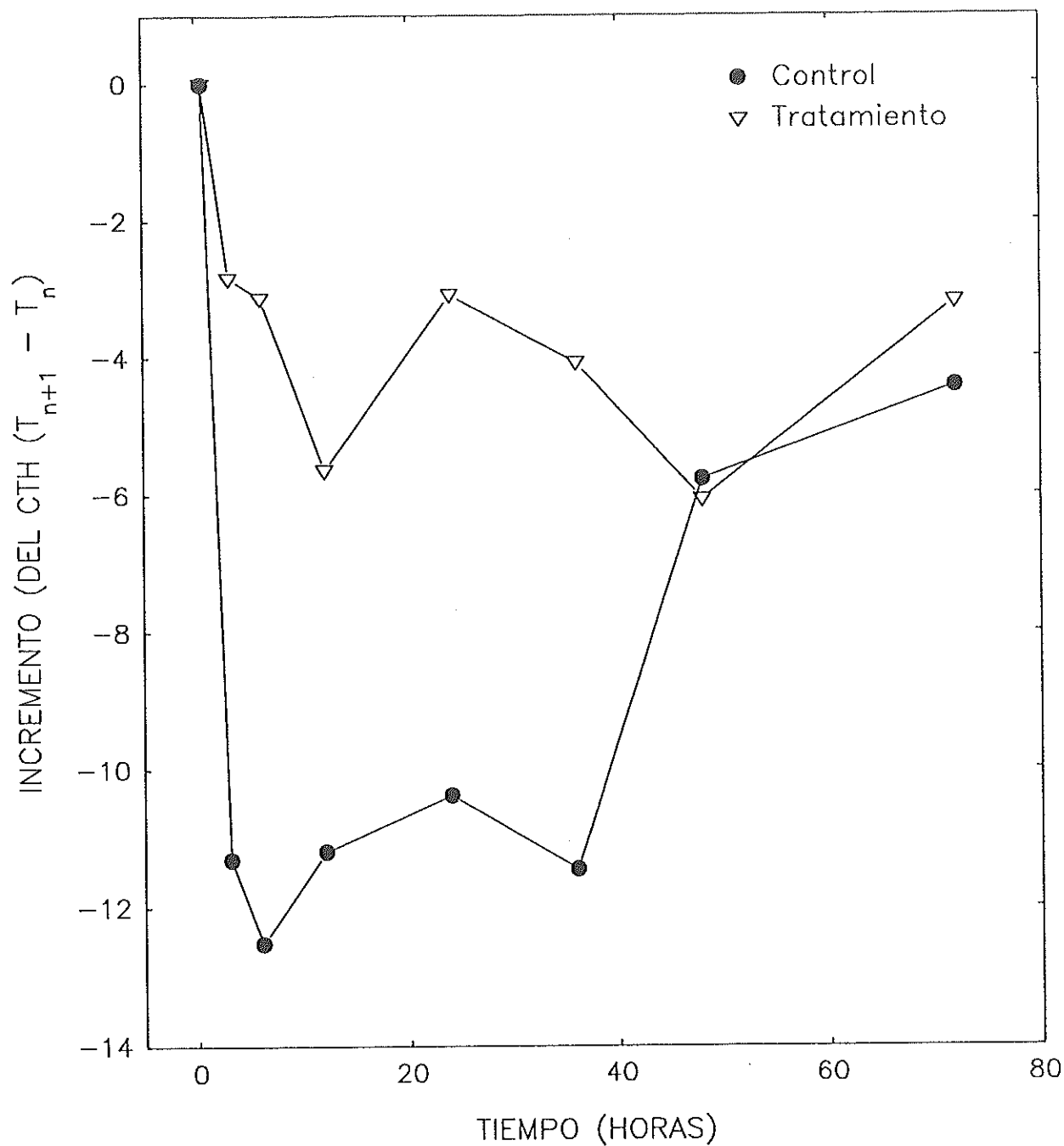


Figura 5. Incremento del conteo total de hemocitos (CTH) para el grupo control y tratamiento del experimento con langostas confinadas. Las curvas se construyeron con los incrementos de la Tabla III.

disminución en el CTH, sobre todo para el control; segundo, un incremento en el CTH de ambos grupos y tercero, un periodo de recuperación del nivel celular. En el intervalo de las 0 a las 36 h el tratamiento presentó incrementos mayores al control (Figura 5).

CONTEO DIFERENCIAL DE HEMOCITOS (CDH).

En la Figura 6 está representado el CDH por tiempos para cada tipo de hemocito del experimento con langostas confinadas. Los tipos 1 y 4 muestran diferencias menores de porcentaje a lo largo del ensayo, mientras que los tipos 2 y 3 presentan rasgos más pronunciados. En ambos, las máximas diferencias se encontraron entre las 12 y 48 h. Además, en estos tipos de hemocitos, las curvas del control y tratamiento se comportaron inversamente como se aprecia en las gráficas b y c de la Figura 6.

ANALISIS ESTADISTICO.

El análisis de box-plot para el CDH tanto de controles como de tratamientos muestra intervalos grandes de distribución de los datos.

Los resultados de la prueba "t" de Student entre el control y el tratamiento para cada tiempo se muestran a continuación:

EXPERIMENTO CON LANGOSTAS CONFINADAS

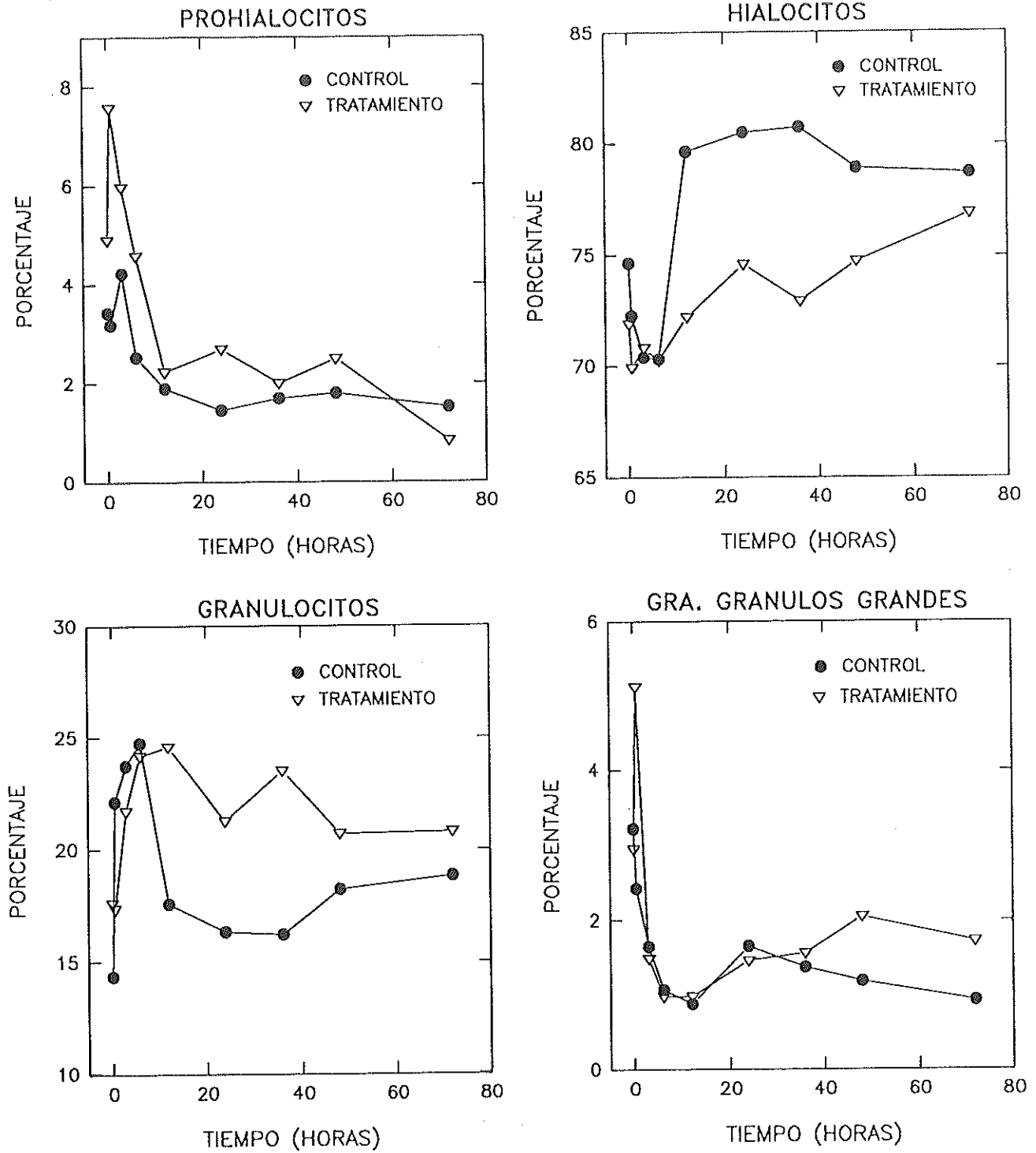


Figura 6. Porcentaje promedio del conteo diferencial de hemocitos por tiempos del experimento con langostas confinadas.

TIEMPO (h)	TIPO DE HEMOCITO			
	PRO	HIA	GRA	GGG
0.5	*		*	*
3.0			*	
6.0	*			
12.0		*	*	
24.0	*	*	*	
36.0		*	*	
48.0				
72.0	*		*	*

* = significativo ($p < 0.05$)
 PRO= prohialocitos
 HIA= hialocitos
 GRA= granulocitos
 GGG= granulocitos de gránulos grandes

La prueba "t" de los intervalos ($T_{n+1} - T_n$) para cada tiempo indica que existe significancia a los siguientes tiempos:

	TIEMPO (h)							
	0.5	3	6	12	24	36	48	72
p			*	*	*			

* = significativo ($p < 0.05$)

La comparación entre los grupos del control (prueba "t") para cada intervalo ($T_{n+1} - T_n$) entre el experimento con langostas libres y langostas confinadas muestra que no hay significancia. De la misma manera se compararon los tratamientos de ambos ensayos indicando que tampoco hay significancia.

Los coeficientes de correlación lineal entre los tipos de hemocitos indican que no existe correlación entre ninguno para controles y tratamientos. (No se rechaza H_0 a un $\alpha = 5\%$, $r_{teórica}$ del tratamiento es igual a $r_{0.025,5} = 0.82$; $r_{teórica}$ del control es $r_{0.025,3} = 0.92$). A continuación se muestra cada r (N indica el número de langostas):

MATRIZ DE CORRELACION DEL TRATAMIENTO N= 6

TIPO DE HEMOCITO	TIPO DE HEMOCITO			
	PRO	HIA	GRA	GGG
PRO	1.0			
HIA	0.193	1.0		
GRA	-0.724	-0.802	1.0	
GGG	0.414	-0.564	0.053	1.0

PRO= prohialocitos
 HIA= hialocitos
 GRA= granulocitos
 GGG= granulocitos de gránulos grandes

MATRIZ DE CORRELACION DEL CONTROL N= 4

TIPO DE HEMOCITO	TIPO DE HEMOCITO			
	PRO	HIA	GRA	GGG
PRO	1.0			
HIA	-0.293	1.0		
GRA	-0.256	-0.847	1.0	
GGG	0.524	-0.629	0.306	1.0

4.4 EXPERIMENTO UTILIZANDO COMO CONTROL Y TRATAMIENTO AL MISMO GRUPO DE LANGOSTAS.

Para este experimento el coeficiente de correlación lineal entre el peso (g) y el número de células ml^{-1} fue de $r = 0.048$ en 48 langostas analizadas.

CONTEO TOTAL DE HEMOCITOS.

La Tabla IV muestra el CTH e incrementos del CTH del experimento con el mismo grupo de langostas. El CTH máximo-mínimo fue para el control con un valor de (8.94) comparado con el tratamiento (5.61).

Como se observa en la Figura 7, existe en ambas curvas cuatro puntos críticos, primero, una disminución en el CTH; segundo, un aumento; tercero, otra disminución y cuarto, un aumento.

Tabla IV. Conteo total de hemocitos (CTH) e incrementos del CTH para el control y tratamiento en cada tiempo del experimento utilizando como control y tratamiento al mismo grupo de langostas (*P. interruptus*).

Tiempo n (h)	CONTROL		TRATAMIENTO	
	N = 10 CTH \pm E.E. ¹	INCREMENTO T _{n+1} - T _n ²	N = 10 CTH \pm E.E. ¹	INCREMENTO T _{n+1} - T _n ²
0	10.18 \pm 1.57		11.62 \pm 1.02	
1	14.02 \pm 1.61	0.00	14.02 \pm 1.82	0.00
3	19.128 \pm 1.38	-2.39	13.48 \pm 2.59	-5.70
6	17.235 \pm 1.57	-7.13	13.551 \pm 1.94	-3.17
12	15.49 \pm 1.37	-6.98	15.29 \pm 1.06	-5.33
24	11.36 \pm 0.71	-9.39	14.79 \pm 1.11	-4.97
36	12.36 \pm 0.71	-4.22	14.15 \pm 0.86	-5.11
48	10.65 \pm 0.89	-6.95	10.54 \pm 1.72	-8.08
72	10.70 \pm 0.01	-5.19	9.68 \pm 1.70	-5.33
MAX-MIN	8.94	9.52	5.61	8.08
FIN-INI	0.52	-5.19	-1.90	-5.33

N = Número de langostas utilizadas.

¹ - Valores promedio del número de hemocitos ml⁻¹ X 10⁶ \pm error estándar.

² - T_{n+1} es el número de hemocitos ml⁻¹ en el tiempo n+1 y T_n es el número de hemocitos ml⁻¹ en el tiempo n.

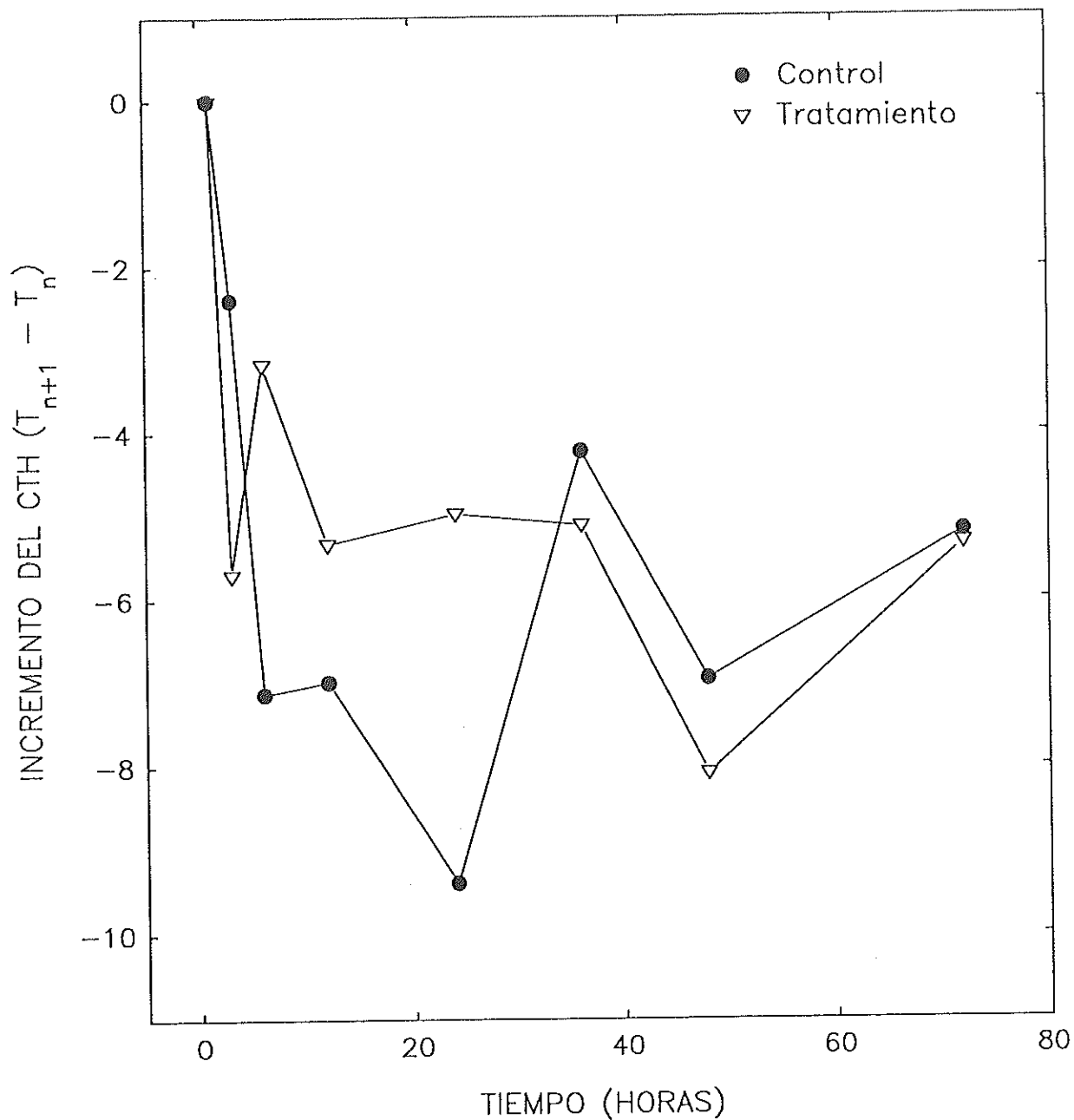
EXPERIMENTO UTILIZANDO COMO CONTROL Y TRATAMIENTO
AL MISMO GRUPO DE LANGOSTAS

Figura 7. Incrementos del conteo total de hemocitos para el control y tratamiento del experimento utilizando como control y tratamiento al mismo grupo de langostas. Las curvas se construyeron con los datos de incremento de la Tabla IV.

CONTEO DIFERENCIAL DE HEMOCITOS.

El conteo diferencial de hemocitos (CDH) por tiempos para cada tipo, del experimento donde el mismo grupo de langostas se utilizó como control y tratamiento se muestra en la Figura 8. En el CDH de los PRO y GGG no se observó un patrón definido. Se observaron mayores diferencias entre el control y tratamiento de los HIA y GRA, además de que su comportamiento es inverso.

ANALISIS ESTADISTICO.

En cuanto a los incrementos del CTH, el análisis de box-plot mostró dispersión en los datos, sin embargo las varianzas son homogéneas de acuerdo a la prueba F.

La comparación entre los incrementos del control y el tratamiento (prueba "t") para cada tiempo indica lo siguiente:

	TIEMPO (h)							
	1	3	6	12	24	36	48	72
p			*	*	*	*		*

* = significativo (p < 0.05)

La prueba "t" entre control y tratamiento para los incrementos de cada tipo de hemocito muestra lo siguiente:

EXPERIMENTO UTILIZANDO COMO CONTROL Y TRATAMIENTO 46
AL MISMO GRUPO DE LANGOSTAS

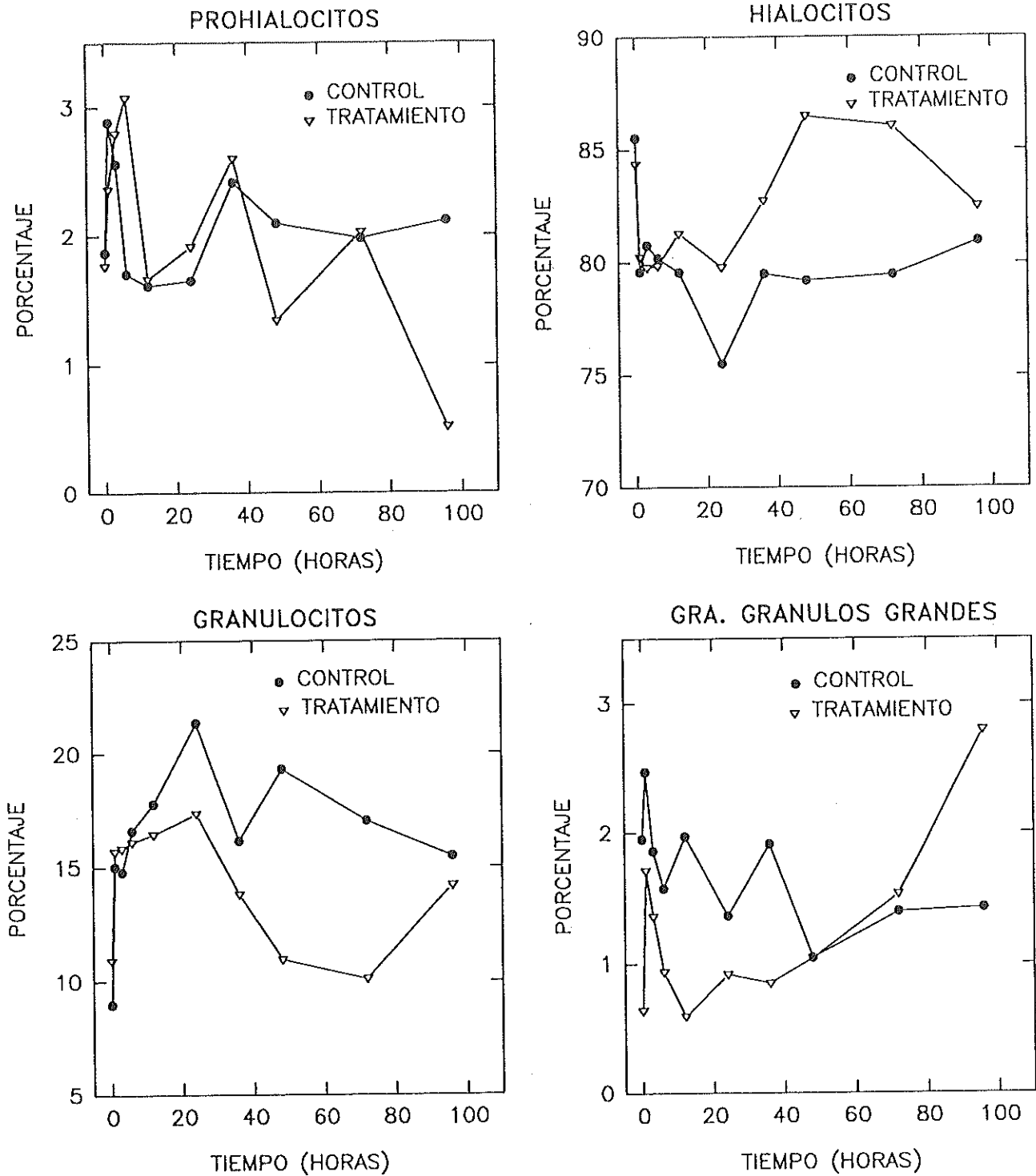


Figura 8. Porcentaje promedio del conteo diferencial de hemocitos por tiempos del experimento utilizando como control y tratamiento al mismo grupo de langostas.

TIEMPO (h)	TIPO DE HEMOCITO			
	PRO	HIA	GRA	GGG
1				
3		*		
6	*			
12	*	*	*	*
24		*	*	*
36			*	
48	*	*	*	*
72				

* = significativo ($p < 0.05$)

PRO= prohialocitos

HIA= hialocitos

GRA= granulocitos

GGG= granulocitos de gránulos grandes

El coeficiente de correlación lineal con todas las combinaciones entre los tipos de hemocitos indica que únicamente hay correlación entre los hialocitos y granulocitos del control y del tratamiento (se rechaza H_0 a un $\alpha = 1\%$, la $r_{teórica}$ es de $r_{.005,9} = 0.749$) y se muestran a continuación (N es el número de langostas):

MATRIZ DE CORRELACION DEL TRATAMIENTO N=10

TIPO DE HEMOCITO	TIPO DE HEMOCITO			
	PRO	HIA	GRA	GGG
PRO	1.0			
HIA	-0.189	1.0		
GRA	-0.050	-0.959**	1.0	
GGG	0.045	0.152	-0.314	1.0

** = Altamente significativo ($p < 0.001$)

La ecuación de regresión entre los hialocitos (Y) y los granulocitos (X) fue la siguiente:

$$Y = 95.537 - 0.917X$$

MATRIZ DE CORRELACION DEL CONTROL N=10

TIPO DE HEMOCITO	TIPO DE HEMOCITO			
	PRO	HIA	GRA	GGG
PRO	1.0			
HIA	-0.515	1.0		
GRA	0.168	-0.898**	1.0	
GGG	0.205	-0.209	-0.040	1.0

** = altamente significativo ($p < 0.001$)

PRO= prohialocitos

HIA= hialocitos

GRA= granulocitos

GGG= granulocitos de gránulos grandes

La ecuación de regresión entre los hialocitos (Y) y los granulocitos (X) fue la siguiente:

$$Y = 97.649 - 1.068X$$

Durante los tres experimentos la administración de carragenano no fue fatal para las langostas. Algunos organismos se mostraron letárgicos, y la hemolinfa del grupo tratamiento tendió a coagularse más rápidamente.

4.5 ENSAYO DEL GRADO DE ASOCIACION.

En la determinación de la densidad de *E. coli*, se corrió una curva de calibración cuya ecuación de regresión fue:

$$Y = -6.019 + 0.778 X, \text{ donde:}$$

Y: es la absorbencia

X: es el Log del número cel ml⁻¹

el coeficiente de determinación correspondiente fue de :

$$R^2 = 79.8 \%$$

Los resultados del experimento del grado de asociación con carragenano utilizando las bacterias *Vibrio parahaemolyticus* y *Escherichia coli* se presentan en la Figura 9.

En el ensayo con *V. parahaemolyticus* y también con *E. coli* se observaron bacterias aglutinadas en aquellas muestras que se incubaron con suero de langosta. El control en *Vibrio* posee un porcentaje mayor de asociación con respecto al porcentaje en *E. coli* (Figura 9). En el ensayo con *E. coli* todas las muestras (tanto control como los diferentes porcentajes de carragenano) que se incubaron con suero de langosta presentan porcentajes de asociación mayores (Figura 9).

En la Figura 10 se observa, bajo micorscopio de contraste de fases, un hemocito sin bacterias adheridas. Se

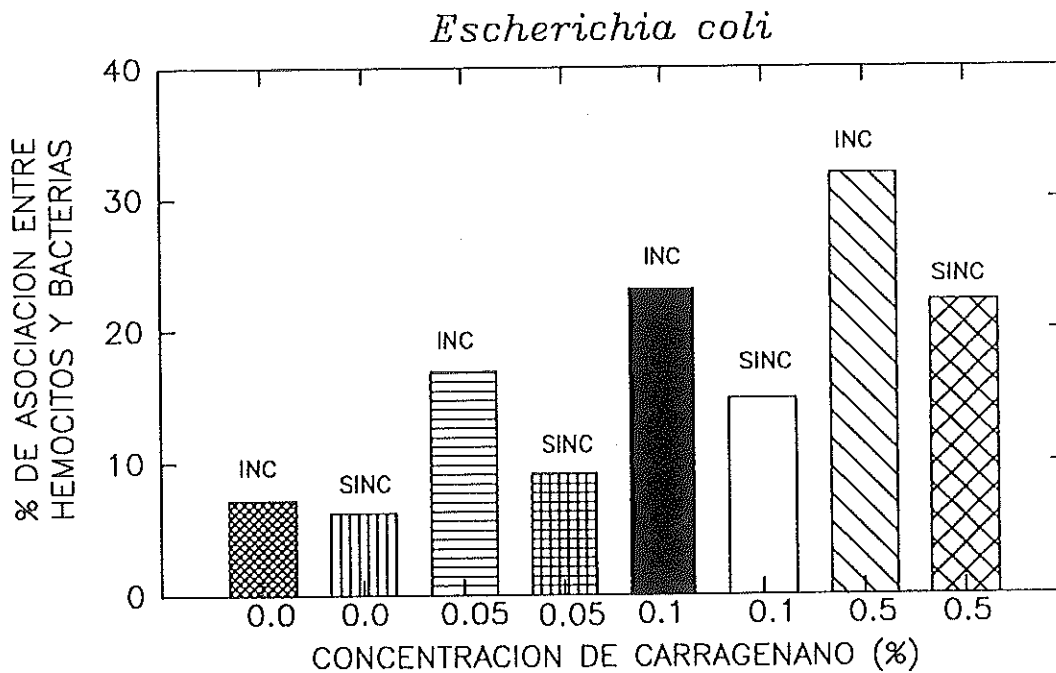
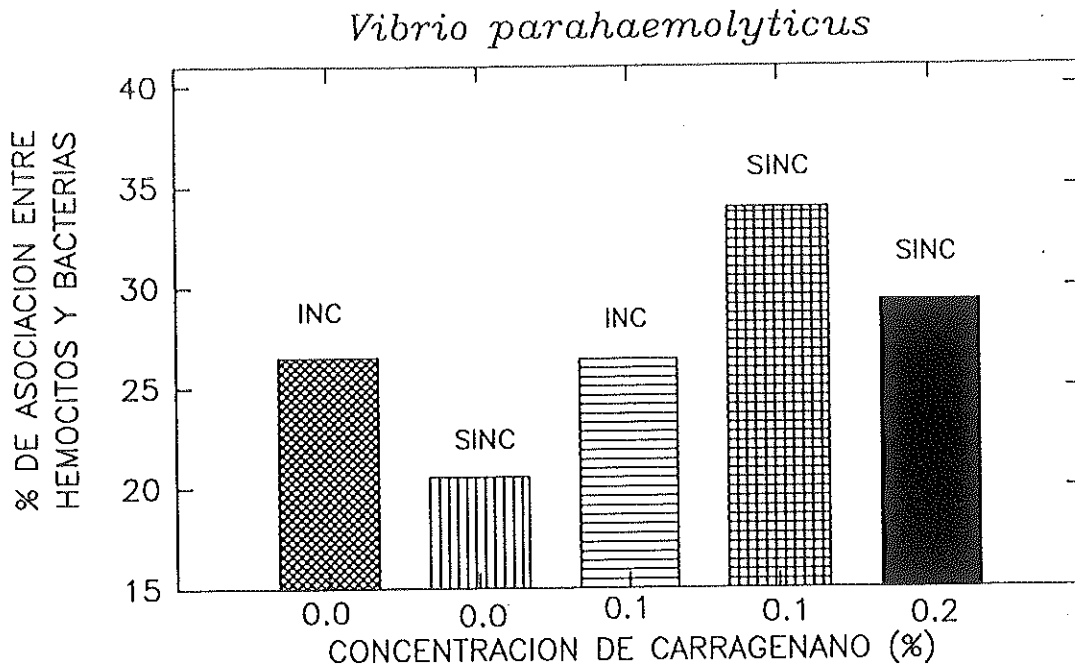


Figura 9. Grado de asociación entre hemocitos de *Panulirus interruptus* y bacterias a diferentes concentraciones de carragenano en muestras incubadas en suero de langosta (INC) e incubadas en medio para hemolinfa de langosta (SINC).

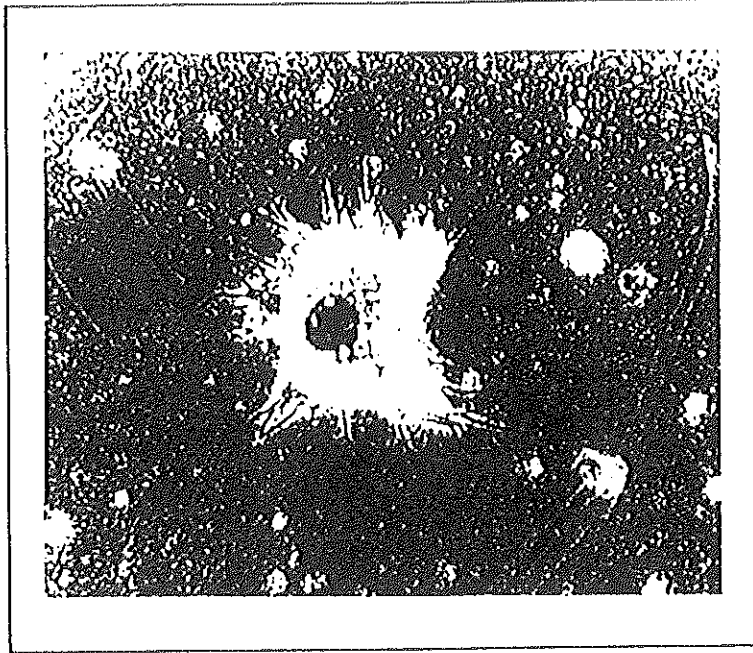


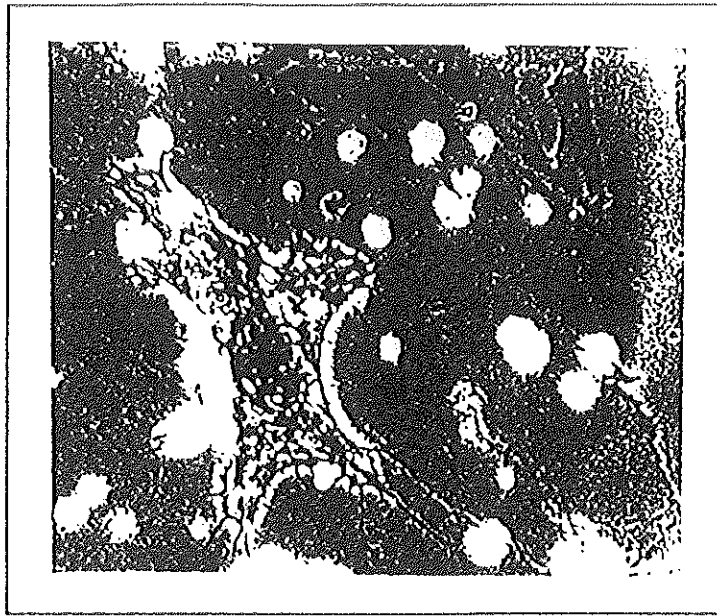
Figura 10. Granulocito refráctil de gránulos grandes de *P. interruptus* sin bacterias adheridas (CONTROL) (X 2500).

observan los pseudópodos extendidos y la refráctilidad de la célula.

Un hemocito no refráctil con gránulos pequeños y *E. coli* adherida se encuentra en la Figura 11a. La Figura 11b muestra hemocitos refráctiles con numerosa bacterias (*E. coli*) y agregación de éstas.

En todas las monocapas de *E. coli* y *V. parahaemolyticus* que fueron incubadas con suero de langosta se observaron aglomeraciones de bacterias.

a



b

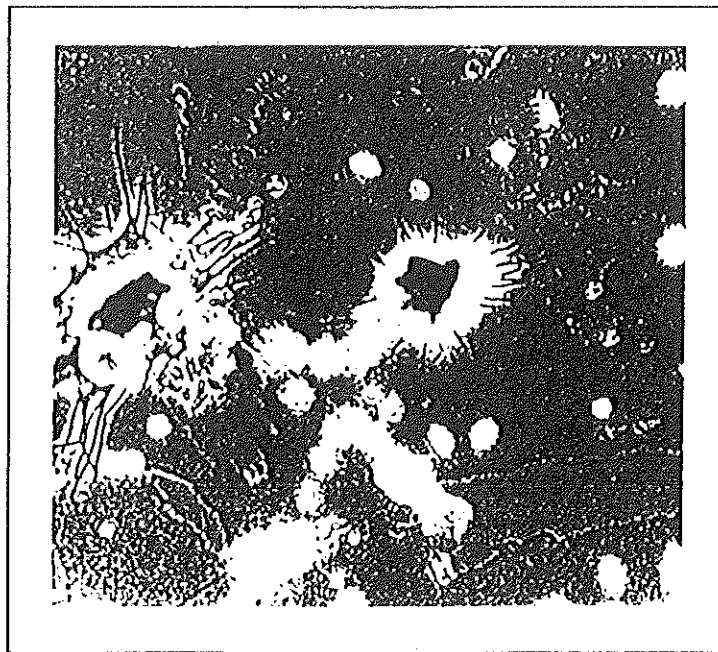


Figura 11. Hemocitos de la langosta *P. interruptus*. a, granulocito de gránulos pequeños no refráctil con *E. coli* adherida; b, granulocitos refráctiles con *E. coli* adherida y aglomeración de esta bacteria (X 2500).

5.0 DISCUSIONES.

5.1 REGISTRO DE LA VARIACION TEMPORAL DE HEMOCITOS.

Las variaciones observadas en el CTH de la langosta *Panulirus interruptus* durante el experimento (Figura 2) muestran que no están asociadas a la variación térmica experimental. Stewart *et al.*, (1967) en su estudio con la langosta *Homarus americanus* señalan que no está bien definido el efecto de la temperatura sobre el número de hemocitos. En este trabajo, la temperatura mostró un comportamiento típico de la zona templada, mientras que las fluctuaciones en el CTH pueden obedecer a otros factores relacionados con las condiciones fisiológicas de la langosta, tales como la inanición, madurez sexual y ciclo de muda.

Existen estudios con langostas donde se ha encontrado que la inanición provocó una inmediata y rápida disminución en el número de hemocitos, también detectó una especie de inanición inducida, debido a la monotonía de la misma dieta. Resultados similares se han observado en cangrejos (Bauchau y Plaquet, 1973; Williams y Lutz, 1975; Bauchau, 1981). Bauchau y Plaquet (1973) demostraron que el número de hemocitos varía de acuerdo a la actividad sexual de los cangrejos *Eriocheir sinensis*. Bauchau (1981) confirma lo anterior y además relaciona directamente el CTH con el ciclo de muda del organismo. Tsing *et al.* (1989), en camarones *Peneidos*,

encontraron el CTH más alto en los estados de intermuda A-B1 y D3-D4 (Tabla VI, Anexos). En relación a este estudio, la alimentación como condición fisiológica responsable de las fluctuaciones en el CTH queda descartada ya que se monitoreó constantemente; mas bien las variaciones podrían atribuirse al ciclo de muda, pues las langostas se encontraron entre el estado B y M (ver Tabla VI de anexos), y posiblemente a la maduración gonadal aunque no se comprobó, ya que durante el periodo de la experimentación se detectaron varias hembras ovígeras (aunque nunca se utilizaron en los ensayos).

En cuanto al CTH, existen pocos estudios que reportan el número de hemocitos por unidad de volumen; mas bien, reportan los porcentajes de cada tipo de hemocito. Para este trabajo se encontró que en *P. interruptus* el intervalo del CTH fue aproximadamente de 9 a 16×10^6 cel ml^{-1} . Trabajos con la langosta americana (*H. americanus*) encuentran intervalos diferentes aún cuando se trata de la misma especie. Esto significa que existen factores externos que afectan el número de células. Así, Stewart *et al.* (1967) reportaron un intervalo en el CTH entre 17 a 22×10^6 ; Cornick y Stewart (1978), un intervalo de 13 a 28×10^6 cel ml^{-1} y Stewart *et al.* (1983), de 20 a 25×10^6 cel ml^{-1} . Aunque los valores anteriores del CTH son mayores que los del presente estudio hay que considerar además de las condiciones fisiológicas mencionas anteriormente, el hecho de que es una especie de langosta diferente.

5.2 CLASIFICACION Y CONTEO DIFERENCIAL DE HEMOCITOS (CDH).

La mayoría de los sistemas de clasificación de hemocitos de crustáceos son confusos porque utilizan criterios citológicos en cuanto al tamaño, características de los gránulos, refractilidad, de las células, etc. Sobre todo, existe una dificultad inherente en distinguir los tipos de hemocitos intermedios por lo que la nomenclatura se vuelve arbitraria.

Bauchau, en 1981, realizó una intensa revisión acerca de las diferentes nomenclaturas utilizadas en las células sanguíneas de crustáceos y reportó una tabla de los sinónimos mencionando, además que el tamaño de las células varía con las especies. En términos generales, cuando menos existen tres tipos de hemocitos en la langosta roja *P. interruptus*: hialocitos, granulocitos y granulocitos de gránulos grandes, aún cuando generalmente son aceptadas dos amplias clases: hemocitos hialinos y granulares. En este estudio, la diferenciación entre los tipos de células granulares fue difícil, sobre todo en las muestras teñidas. En ocasiones se presentaron formas intermedias: granulocitos con gránulos que no ocupaban todo el citoplasma (Tabla I). Lo mismo sucedió entre prohialocitos y hialocitos, en cambio entre estos últimos y los granulocitos existió una gran diferencia. Por esta razón la tinción de Giemsa se auxilió con la de eosina-policromo que fue la que dio mejores resultados.

Las investigaciones sobre la clasificación de las células de la hemolinfa de crustáceos han cubierto varios aspectos. Por ejemplo, Wood y Visentin (1967) realizaron un estudio histológico del cangrejo de río *Orconectes virilis* y encontraron tres tipos de células: hialinas (7-10 μm), granulocitos pequeños (9-18 μm) y granulocitos grandes (18-35 μm), cuyas dimensiones son muy semejantes a los hemocitos de *P. interruptus* reportados en este trabajo (Tabla I).

Entre los pocos estudios acerca de la clasificación de hemocitos de langostas se encuentra el de Cornick y Stewart (1978). Estos autores en muestras de hemolinfa (de *H. americanus*) frescas y fijadas, auxiliados con técnicas de tinción, observaron cuatro tipos de células: prohialocitos ($8.4 \pm 0.1 \mu\text{m}$), hialocitos ($20.9 \pm 0.6 \mu\text{m}$), granulocitos eosinófilos ($24.8 \pm 0.7 \mu\text{m}$) y granulocitos cromofóbicos ($20.0 \pm 0.6 \mu\text{m}$). Resultados semejantes a los de *P. interruptus* del presente trabajo (Tabla I). Recientemente, Hose et al. (1990) utilizando las mismas técnicas anteriores en la clasificación reportaron para *Panulirus interruptus* células hialinas ($14.2 \pm 0.5 \mu\text{m}$), células de gránulos pequeños ($19.7 \pm 0.9 \mu\text{m}$) y células de gránulos grandes ($22.6 \pm 1.3 \mu\text{m}$).

En el presente trabajo, se tomaron cuatro tipos diferentes: prohialocitos (PRO), hialocitos (HIA), granulocitos

(GRA) y granulocitos de gránulos grandes (GGG) (Figura 3). Los resultados del CDH (Tabla I) muestran claramente una gran diferencia en los porcentajes de cada tipo de célula, siendo el más importante numéricamente los HIA con un $80.729 \pm 0.288 \%$. Un estudio con microscopía electrónica podría completar el trabajo de elucidar y diferenciar mejor cada tipo de célula. Hose *et al.* (1990) en *P. interruptus* también encontraron que las células hialinas comprendieron el mayor porcentaje ($61.0 \pm 3.4 \%$, en microscopía de luz).

De acuerdo a los estudios con hemocitos de crustáceos, se sabe que la proporción relativa de células hialinas (PRO y HIA) a células granulares (GRA) determinada por el CDH varía con la especie (Söderhäll, 1992). Así, en este trabajo, se observó una proporción de aproximadamente cinco; en langostas (*P. interruptus*) una proporción de 1.5 veces (Hose *et al.*, 1990); Cornick y Stewart (1978) reportan el doble de hialinas con respecto a las granulares. En cangrejos braquiuros se ha reportado más de tres veces células hialinas a granulares (Bauchau y Plaquet, 1973). Martin y Graves (1985) encuentran una proporción de cuatro en camarones Peneidos y La Peyre y Chu (1990) una razón de cuatro en el cangrejo azul. Estas variaciones pueden deberse a los diversos métodos de clasificación aplicados así como a la diferencia en especie.

5.3 EXPERIMENTOS *in vivo* CON CARRAGENANO.

CONTEO TOTAL DE HEMOCITOS.

El experimento con langostas libres fue metodológicamente igual al de langostas confinadas, a excepción de que en este último se alargó el periodo de exposición hasta las 72 h y además las langostas permanecieron en jaulas individuales para probar que disminuiría el estrés debido a la manipulación. Sin embargo, aunque estadísticamente son iguales, la no significancia puede deberse a las desviaciones estándares tan grandes del experimento con langostas libres. De hecho, los incrementos negativos más grandes se presentaron en este experimento, lo que confirma el efecto de mayor manipulación de los organismos durante la prueba. Todos los incrementos de los ensayos fueron negativos porque se estandarizaron los incrementos a cero para tener una mejor visualización de las gráficas.

Las curvas del control y del tratamiento de los tres experimentos (Figura 4, 5 y 7) tienen un comportamiento muy similar, sólo que hay un desfazamiento con respecto al tiempo entre los ensayos. En términos generales, puede resumirse de la siguiente manera: primero, una disminución muy notable del nivel celular, seguido por un aumento, luego un segundo decaimiento en el número de células pero menos notable y por último, una recuperación que debería terminar con un periodo de

estabilización. Este comportamiento demuestra una clara respuesta hemocítica de la langosta. Probablemente el carragenano actúa como un antígeno -cualquier sustancia que puede disparar una respuesta inmunológica porque el organismo la reconoce como extraña-, ya que, después de la administración del carragenano, existe inicialmente, una marcada disminución celular. Podría decirse que los hemocitos se están utilizando para eliminar el agente extraño. Luego, hay una recuperación celular. En esta etapa, es probable que el organismo fabrique más células o que se liberen los hemocitos fijos para contrarestar el material extraño. Posterior a las 48 h, la debilidad y el estrés de los organismos provocado, probablemente, porque se alimentaron poco, y por la extracción constante de hemolinfa conjuntamente repercutieron en la segunda disminución celular. La última recuperación de hemocitos se observó después de las 72 h, es probable que el carragenano haya sido removido del organismo y este utilice sus reservas energéticas para aumentar los niveles celulares. En el periodo siguiente, la langosta reestablece entonces su mecanismo celular de defensa.

Es evidente que aunque en los tres experimentos se administró a las langostas la misma concentración de carragenano (0.2 mg ml^{-1} de hemolinfa), el grupo control presentó sistemáticamente los incrementos más negativos. Esto significa que los controles mostraron cambios más drásticos en

el CTH comparados con los tratamientos, y podría decirse que la reducción en el nivel celular se debió propiamente al estrés, pues a este grupo sólo se le administró una solución salina estéril. En consecuencia, también es de esperarse que en los tratamiento se observe una marcada disminución en el número de hemocitos por estrés. Por lo tanto, si se toman los valores absolutos y se restan los incrementos del control a los del tratamiento, quedaría únicamente, el efecto del carragenano, que actuó durante 24 h para el experimento con langostas confinadas y por 72 h en el experimento con el mismo grupo de langostas. En base a este razonamiento, puede afirmarse entonces, que el carragenano posee un efecto amortiguador evitando un mayor decaimiento en el CTH.

Este descubrimiento puede aprovecharse y aplicarse al proceso de transporte de la langosta viva ya que, durante éste las langostas sufren de un intenso estrés provocado por la exposición al aire durante varias horas (por lo general hasta un máximo de 24 h) periodo en el cual tiene su efecto el carragenano. Si se logra amortiguar la disminución del número de hemocitos con la administración de carragenano, entonces se reforzará el mecanismo celular de defensa de las langostas. Con ésto, se busca evitar el debilitamiento, erosión del caparazón o muerte causados por microorganismos patógenos, problemas ocasionados durante el transporte en vivo.

El esquema general de comportamiento de los tres ensayos descrito anteriormente pone en evidencia una marcada respuesta celular en ambos grupos. Esta reacción de defensa se ha observado en langostas inyectadas con *Aerococcus viridians* var. *homari* donde también se observa un aumento en el número de hemocitos hasta un periodo de 14 días (Johnson et al., 1981). Un trabajo posterior a éste, utilizando las mismas condiciones muestra que de 0 a 48 h la inyección del patógeno provocó un incremento en el CTH, después del cual se observó una declinación del CTH (Stewart et al., 1983). De acuerdo a los resultados obtenidos en el experimento del grado de asociación podría ser que, para *P. interruptus*, la respuesta celular de los tratamientos está relacionada con la actividad fagocítica. Existen evidencias de que los glucanos del tipo del carragenano estimulan la capacidad fagocítica *in vitro*. De hecho, en langostas, el aumento inicial (de 0 a 48 h) del CTH cuando se les ha inyectado material extraño ya se había observado. En cangrejos de río (*Parachaeraps*) se ha observado que después de una semana de haberse inyectado endotoxinas bacterianas y bacterias muertas, hay un incremento significativo en el número de hemocitos (McKay y Jenkin, 1970a).

Un experimento similar (utilizando 0.2 mg de laminarín ml⁻¹ como glucano de prueba) se realizó en cangrejos de río (*Astacus astacus*) y marinos (*Carcinus maenas*) donde encontraron que el CTH del control permaneció

significativamente más alto que en el tratamiento durante un periodo de 24 h (Smith y Söderhäll, 1983). A diferencia del presente trabajo, aquí, tanto el control como el tratamiento siempre mostraron una recuperación significativa en el CTH hasta las 24 h.

Estas diferencias pueden deberse a que se han encontrado fluctuaciones individuales muy grandes en el número de hemocitos (Bauchau y Plaquet, 1973; Bauchau, 1981) que Smith y Söderhäll (1983) no tomaron en cuenta, pues se consideró al CTH del tiempo cero como un grupo de organismos aparte. Aquí se obtuvo el tiempo cero a partir del control y del tratamiento, además de que se calcularon y estandarizaron los incrementos para reducir el error intraespecífico. Sin embargo, a pesar de las diferencias resulta interesante observar que los trabajos con crustáceos marinos y de agua dulce concuerdan en que es posible observar una reacción de defensa celular inducida directa o indirectamente por glucanos de origen marino a pesar de la distancia evolutiva.

Existieron diferencias en el CTH del tiempo cero entre los tres experimentos y entre el grupo control y el tratamiento, muy probablemente por diferencias en el desarrollo gonadal de las langostas. Si consideramos que el tiempo en el cual se realizaron los ensayos (junio a octubre) deberían tener intensa actividad gonadal. Teóricamente *P. interruptus* deposita

sus huevos en junio, eclosionan en agosto, mudan en septiembre y enero y se aparean a mediados de enero (Aiken y Waddy, 1980). La actividad gonadal fue evidente (cuando menos se detectaron seis hembras ovígeras). En cangrejos braquiuros se ha observado que los individuos en épocas reproductivas tenían un CTH más alto que los individuos inmaduros o sexualmente inactivos (Bauchau y Plaquet, 1973). Las variaciones también pueden deberse a otras condiciones fisiológicas en las que están involucrados directamente los hemocitos, como en el proceso de muda, mantenimiento de la regulación osmótica, transporte y síntesis de carbohidratos, etc. (Bauchau, 1981).

Con respecto al CTH, el experimento con langostas libres mostró las curvas del control y tratamiento muy similares (Figura 4) y los incrementos negativos más grandes con respecto a los otros experimentos. Los incrementos negativos del control quedaron muy por debajo comparados con los del tratamiento. Puede decirse que para este caso, la respuesta celular fue más drástica. En este experimento no hubo significancia en los tiempos analizados. Las probabilidades fueron muy altas ($p > 0.5$) al igual que la variabilidad, provocada por el pequeño número de muestras (cuatro) y las fluctuaciones individuales de los organismos; causadas posiblemente por el estrés que sufrieron las langostas en el momento del manejo. Aquí aceptamos la hipótesis nula (H_0) y sin embargo es evidente en la Figura 4 que existen diferencias

entre el control y tratamiento, por lo que se está cometiendo el error de tipo β (cuando se acepta una hipótesis nula que es falsa). Existen pruebas estadísticas especiales para la interpretación de este tipo de resultados, esto es, cuando no son significantes. La Potencia de Prueba ($1 - \beta$) es una de ellas. Mediante ésta, podemos conocer la probabilidad de no cometer el error de tipo β . En resumen, todos los experimentos en donde se aceptó H_0 , no significan que no haya una diferencia real, debemos tener una potencia de prueba muy baja. De hecho, lo que debe concluirse en estos casos es que no tenemos evidencias para rechazar la hipótesis alterna (H_a) y calcular la potencia de prueba.

Para el experimento con langostas confinadas, los incrementos no fueron tan grandes (Figura 5), pero si las diferencias entre el control y tratamiento que resultaron en significancia hasta las 24 h. Esto quiere decir que el confinamiento redujo en buena parte el estrés, demostrado por los errores estándares menores (Tabla III) y que podría confirmarse mediante el análisis de potencia de prueba. Para esta prueba, la diferencia entre control y tratamiento fue menos notable.

En el caso del experimento utilizando como control y tratamiento al mismo grupo de langostas, las diferencias del

CTH e incrementos entre el control y el tratamiento no fueron tan drásticas (Figura 7), como era de esperarse. La variabilidad individual se disminuyó considerablemente cuando se utilizaron al mismo grupo de langostas como control y tratamiento. Esto también puede deberse a que los niveles de hemocitos del tratamiento fueron altos al inicio de la segunda etapa, probablemente porque no fue suficiente el tiempo de recuperación y en el momento de la segunda etapa no se alcanzó a estabilizar el nivel celular, esto es, la reacción hemocítica todavía estaba presente.

CONTEO DIFERENCIAL DE HEMOCITOS.

En el CDH para cada tiempo del experimento con langostas confinadas (Figura 6) existió significancia sólo en algunos tiempos, sin embargo es evidente la diferencia entre el control y el tratamiento para cada tipo de hemocito. También es notable que los HIA del tratamiento se comportan inversamente comparados con los GRA. Los PRO y GGG de ambos grupos muestran un comportamiento similar. El CDH del experimento donde se utilizaron las mismas langostas como control y tratamiento (Figura 8) denota que, de nuevo, los HIA y GRA del control y tratamiento poseen un comportamiento inverso. Sin embargo, este comportamiento también es inverso con respecto al experimento con langostas confinadas. Con estos resultados, por lo tanto, no es posible concluir que el carragenano produce una patrón definido en la respuesta celular diferencial, sin embargo es

claro que se presentó como lo demuestran las curvas de los HIA y GRA de ambos experimentos. Los datos obtenidos pueden servir para una segunda investigación dirigida únicamente hacia la respuesta diferencial. Esta afirmación se ve apoyada por los resultados de correlación entre cada tipo de hemocito. De acuerdo al experimento con langostas confinadas, no existe correlación entre los hemocitos ($p < 0.05$), sin embargo, debe concluirse que no hay evidencias para rechazar H_a (H_a : existe correlación) y que debemos tener una baja potencia de prueba. Para el experimento donde se utilizó el mismo grupo de langostas como control y tratamiento, la asociación en el control y en el tratamiento quedó confirmada como una relación negativa (se aceptó H_a a una $p < 0.001$). Esto indica que el carragenano (grupo de tratamiento) no es el agente causal de la relación entre HIA y GRA. Lo que si puede afirmarse y es importante, es que se demostró que existe dependencia entre HIA y GRA en la langosta *P. interruptus* que concuerda con resultados en otros crustáceos (Cornick y Stewart, 1978; Mix y Sparks, 1980).

Cornick y Stewart (1978) observaron varias similitudes entre los HIA y GRA de langostas. Mix y Sparks (1980) también encontraron una relación inversa entre los HIA y los granulocitos eosinófilos en hemocitos de cangrejos, lo que confirma la hipótesis de que los hemocitos de crustáceos decápodos aparentemente forman una serie continua de

diferenciación con muchas formas intermedias, lo cual ha sido apoyado por varios trabajos (Wood y Visentin, 1967; Cornick y Stewart, 1978; Mix y Sparks, 1980; Johnson *et al.*, 1981; Bauchau, 1981; Cohen y Nemhauser, 1985; Hose *et al.*, 1987; Tsing *et al.*, 1989).

La respuesta diferencial ya se había observado en langostas inoculadas con bacterias (Johnson *et al.*, 1981). Así mismo, Stewart *et al.* (1983) examinaron el patrón de hemocitos de langosta durante la infección con varios patógenos, encontrando que los PRO (tipo 1) y los basófilos (tipo 4) declinaban más rápidamente, los eosinófilos (tipo 3) permanecieron relativamente constantes y los HIA (tipo 2) aumentaron. Ellos entonces concluyeron, que los eosinófilos pueden ser más importantes en incrementar la capacidad fagocítica de la langosta.

Los resultados del presente estudio sugieren que cada tipo de hemocito juega un papel diferente durante el transcurso del experimento, esto es, existe la posibilidad de que el carragenano actúe diferencialmente aunque no puede concluirse categóricamente. Sin embargo, este trabajo puede sentar las bases para una posterior investigación que se enfoque exclusivamente a comprobar lo anterior. Aún cuando no se puede hablar de una respuesta inmunológica bien elaborada, es indicativo de un mecanismo de defensa no tan primitivo como

anteriormente se pensaba para los crustáceos.

Se ha demostrado que los hemocitos de crustáceos cumplen diversas funciones fisiológicas (Bauchau, 1981), el CTH y el CDH pueden ser muy útiles como una herramienta potencial en el monitoreo del estado fisiológico y procesos patológicos de estos crustáceos.

5.4 ENSAYO DEL GRADO DE ASOCIACION.

A partir de los resultados de este experimento (Figura 9) es evidente que los hemocitos de *P. interruptus* se comportaron diferencialmente con respecto a las dos bacterias probadas. Los mayores porcentajes de asociación en *Vibrio* denotan que existe, aparentemente, una afinidad más alta por esta bacteria.

Resultados similares en cuanto a afinidad y porcentajes Smith y Ratcliffe (1978) revelaron en *Carcinus maenas*, tasas de asociación más altas en *Moraxella* sp. (bacteria Gram-negativa) de 24.99 ± 5.59 % comparadas con *B. cereus*, bacteria Gram-positiva, (13.97 ± 6.63) adjudicando estos resultados a que la respuesta hemocítica puede estar relacionada a las variaciones en tamaño y configuración de la superficie de diferentes especies bacterianas. En este estudio, todas las muestras que se incubaron en suero de langosta

presentaron, invariablemente, agregaciones de bacterias y mayor contacto entre los hemocitos. Además, las muestras de *E. coli* incubadas con suero de langosta tuvieron un mayor porcentaje de asociación que las muestras sin incubación; esto indica que el suero contiene sustancias que estimulan o activan la capacidad de asociación de partículas por los hemocitos.

Estas sustancias probablemente son factores humorales (aglutininas, precipitinas y bactericidinas) que son parte del mecanismo de defensa humoral y que también funcionan como opsoninas -sustancias que facilitan el proceso de la fagocitosis-. En langostas se han purificado y caracterizado algunos factores (Fuller y Doolittle, 1971; Cornick y Stewart, 1973; Hall y Rowlands, 1974). Goldenberg y Greenberg (1983) aislaron una opsonina de la hemolifa de la langosta *Homarus americanus* que además de aumentar la fagocitosis posee la propiedad de enlazarse a ciertos carbohidratos. Anteriormente se sugirió que los crustáceos poseían proteínas del suero que actuaban en el proceso de reconocimiento de material extraño (McKay y Jenkin, 1970a,b). Paterson y Stewart (1974) descubrieron que eritrocitos tratados con suero mostraron un 80% de adsorción a hemocitos de *H. americanus* comparado con un 30% de muestras no tratadas. Un segundo trabajo con langostas reveló que el porcentaje de fagocitosis *in vivo* aumentó más del doble cuando se incubaron los eritrocitos en suero de langosta (Paterson et al., 1976);

otro estudio posterior descubrió que las opsoninas del suero incrementaron significativamente el reconocimiento y fagocitosis de eritrocitos por hemocitos de langostas.

En cuanto al efecto del carragenano, los resultados demuestran que hay una relación directa entre el porcentaje de asociación y la concentración de carragenano para ambas bacterias probadas, aunque es más notoria la diferencia con *E. coli*. Esto indica que el carragenano exhibe cierto grado de activación en la capacidad fagocítica. En mamíferos, se ha encontrado que el carragenano puede estimular a los macrófagos -células encargadas de fagocitar e involucrados en la iniciación de la respuesta inmunológica- (Neveu y Perdoux, 1984). Otro glucano similar al carragenano -laminarán- también tiene la capacidad de estimular macrófagos de mamíferos (Seljelid et al., 1981). En invertebrados, desde hace tiempo se sabe que los glucanos con enlaces β -1,3 tienen ciertas propiedades para activar a los hemocitos (Unestam y Söderhäll, 1977; Söderhäll et al., 1979; Morita et al., 1981; Kakinuma et al., 1981). Smith y Söderhäll (1983) observaron que en cangrejos la fagocitosis de la bacteria *Moraxella* sp. fue incrementada por la adición de laminarán. Ellos atribuyeron este resultado a que el glucano con enlaces β -1,3 activó específicamente a la enzima profenoloxidasa que se encuentra en los hemocitos y que está involucrada en el proceso de coagulación de la hemolinfa entre otras funciones (Söderhäll,

1992). Aunque mediante este trabajo no es posible comprobar lo anterior, se observó que en las langostas tratadas con carragenano el tiempo de coagulación disminuyó, por lo que puede especularse que se debió a la activación de la profenoloxidasa. Se ha propuesto que este sistema enzimático en cascada se localiza en células granulares y semigranulares en crustáceos (Söderhäll et al., 1986; Hose et al., 1987; Tsing et al., 1989; Hose y Martín, 1989; Söderhäll y Cerenius, 1992). Se sabe que los glucanos β -1,3 pueden inducir a la exocitosis de células semigranulares y granulares los cuales liberan el sistema de profenoloxidasa al plasma, y aquí se inicia un proceso de cooperación celular entre los hemocitos de manera que el sistema se convierte en un mecanismo de reconocimiento de agentes extraños y un mediador importante en la inmunología del crustáceo (Söderhäll, et al., 1986; Söderhäll, 1992; Soderhall y Cerenius, 1992).

6.0 CONCLUSIONES.

1. Se observó una variación temporal en el conteo total de hemocitos (CTH) durante la experimentación, con un intervalo entre 9 y 16×10^6 cel ml^{-1} .
2. De los cuatro tipos básicos de hemocitos observados en *P. interruptus* los HIA representan más del 50 % de la población total de hemocitos.
3. Los experimentos *in vivo* con langostas confinadas demostraron que el carragenano actúa por un periodo de 24 h, mientras que el experimento utilizando como control y tratamiento al mismo grupo de langostas durante 72 h. y que a una dosis de 0.2 mg ml^{-1} posee un efecto de amortiguamiento evitando un decaimiento en el CTH.
4. Se observó una relación inversa entre los HIA y GRA independiente de la administración de carragenano.
5. Los hemocitos poseen una mayor afinidad por *Vibrio* sp. con respecto a *E. coli*. Las muestras de *E. coli* incubadas en suero de langosta tuvieron mayores porcentajes de asociación.

7.0 BIBLIOGRAFIA.

- * AIKEN, D. E. (1980)
Molting and Growth. En: (J.S. Cobb y B.F. Phillips, eds.) The Biology and Management of Lobsters, Vol. I Physiology and Behavior. Academic Press, N.Y.

- * AIKEN, D. E. Y WADDY, S.L. (1980)
Reproductive biology . En: (J.S. Cobb y B.F. Phillips, eds.) The Biology and Management of Lobsters, Vol. I Physiology and Behavior. Academic Press, N.Y.

- * ANUARIO ESTADISTICO DE PESCA (1989)
Secretaría de Pesca. Dirección General de Informática y Registro Pesquero. México, D.F. julio de 1991.

- * AYALA-MARTINEZ, Y.; GONZALEZ-AVILES, J.G. Y ESPINOSA-CASTRO, G. (1988)
Biología y pesca de la langosta en el Pacífico mexicano. En: Los Recursos Pesqueros del País. Sec. de Pesca. Inst. Nacional de la Pesca, México.

- * BAUCHAU, A.G. Y PLAQUET, J.C. (1973)
Variation du nombres des hémocytes chez les crustacés brachyours. Crustaceana 24: 215-223.

- * BAUCHAU, A.G. (1981)
Custaceans. En: (N.A. Ratcliffe y A.F. Rowley, eds.) Invertebrate Blood Cells Vol 2 Academic Press, N.Y., p. 385-420

- * CHAPA, S.H. (1964)
Contribución al conocimiento de las langostas del Pacífico Mexicano y su Pesquería. Inst. Nal. Invest. Biol. Pesq. Sría. de Ind. Comercio. Dir. Gral. Pesc. Ind. Cxas. (6): 5-68.

- * CHONG, A.S.F. Y PARISH, C.R. (1985)
Nonimmune lymphocyte-macrophage interaction. II Evidence that interaction involves sulfated polysaccharides recognition. Cell. Immunol. 92:277-289.

- * COHEN, W. D. Y NEMHAUSER, I. (1985)
Blood Cells of Marine Invertebrates. Experimental System in Cell Biology and Comparative Physiology. MBL Lect. Biol. Vol. 6.

- * CORNICK, J.W. Y STEWART, J.E. (1973)
Partial characterization of a natural agglutinin in the hemolymph of the lobster, *Homarus americanus*. J. Invertebr. Pathol. 21: 225-263.

- * CORNICK, J.W. Y STEWART, J.E. (1978)
Lobster (*Homarus americanus*) hemocytes: classification, differential counts, and associated agglutinin activity. J. Invertebr. Pathol. 31: 194-203.

- * DE SANTIAGO-FIERRO, G.; GARCIA DE LA BANDA, I. Y MASSO, J.M. (1976)
Análisis bacteriológico en las rías de Arosa, Vigo y Pontevedra. Bol. Inst. Espa. Oceano. 205: 5-13.

- * DIARIO OFICIAL DE LA FEDERACION (1992)
México, D.F., septiembre de 1992.

- * EHRESMANN, W.; DEIG, E.F. Y HATCH, M.T. (1979)
Anti-viral properties of algal polysaccharides and related compounds. En: (H.A. Hoppe et al., eds.) Marine Algae in Pharmaceutical Science. Walter de Gruyter, Berlin.

- * ESTRELLA, B.T. (1990)
Shell disease in american lobster off the Massachusetts coast. National Shellfish Assoc. 1990 Annual Meeting, april 1-5, 1990. Williamsburg, Virginia.

- * FISHER, W.; NILSON, E.H.; STEENBERGEN, J.F. Y LIGHTNER, D.V. (1978)
Microbial diseases of cultured lobsters: a review. Aquaculture 14: 115-140.

- * FOLEY, D. A. Y CHENG, T.C. (1975)
A quantitative study of phagocytosis by hemolymph cells of the pelecypods *Crassostrea virginica* and *Mercenaria mercenaria*. J. Invertebr. Pathol. 25: 189-197.

- * FULLER, M. Y DOOLITTLE, R.F. (1971)
Studies of invertebrates fibrinogen. I. Purification and characterization of fibrinogen of the spiny lobster. Biochem. 10(8): 1305-10.

- * GETCHELL, R.G. (1989)
Bacterial shell disease in crustaceans: a review. J. Shell. Res. vol.8 (1): 1-6.

- * GOLDENBERG, A.Z. Y GREENBERG, A.H. (1983)
Functional heterogeneity of carbohydrate-binding hemolymph proteins: evidence of nonagglutinating opsonin in *Homarus americanus* J. Invertebr. Pathol. 42: 33-41.

- * GOLDEBERG, Z.; HUEBNER, E. Y GREENBERG, A.H. (1984)
Activation of lobster hemocytes for phagocytosis. J. Invertebr. Pathol. 43: 77-88.

- * HALL, J.L. Y ROWLANDS, D.T. (1974)
Heterogeneity of lobster agglutinins. I. Purification and physicochemical characterization. Biochem. 13(4): 821-32.

- * HOSE, J.E., MARTIN, G.G., NGUYEN, V.A., LUCAS, J. Y ROSENSTEIN, T. (1987)
Cytochemical features of shrimp hemocytes. Biol. Bull. 173: 178-187.

- * HOSE, J.O. Y MARTIN, G.G. (1989)
Defense functions of granulocytes in the ridgeback prawn *Sicyonia ingentis* J. Invertebr. Pathol. 53: 335-346.

- * HOSE, J.E., MARTIN, G.G. Y GERARD, A.S. (1990)
A decapod hemocyte classification scheme integrating morphology, cytochemistry, and function. Biol. Bull. 178: 33-45.

- * INDICADORES DE LA PRODUCCION PESQUERA (1991)
Dirección General de Informática y Registros Pesqueros, Sec. de Pesca, México, D.F. marzo de 1992.

- * JOHNSON, P.T. ; STEWART, E.J. Y ARIE, B. (1981)
Histopathology of *Aerococcus viridiasns* var. *homari* infection (gaffkemia) in the lobster, *Homarus americanus*,

and a comparison with histological reactions to a gram-negative species, *Pseudomonas perolens* J. Invertebr. Pathol. 38:127-148.

- * JOHNSON, P.T. (1983)
Pathogens: viral, rickettsial, bacterial, fungal. En:(A.J. Provenzano, ed.) The Biology of Crustacea Vol. 6 Pathobiology. Ac. Press, N.Y.
- * KAKINUMA, A.; ASANO, T.; TORII, H. Y SUGINO, Y. (1981)
Gelation of *Limulus* amoebocytes lysate by an antitumor (1-3)- β -D-glucan. Biochem. Biophys. Res. Commun. 101(2):434-439.
- * LAMADRID, H. Y BLANCO, W. (1986)
Handling of live lobsters in Cuba. Infofish Marketing Digest 6: 44-46.
- * LAPEYRE, J.F. Y CHU, F.L.E. (1990)
Blue crab hemocytes: a preliminary study. En: (F.O. Perkins y T.C. Cheng, eds.) Pathology in Marine Science. Academic Press, Inc. San Diego, Cal.
- * LEY FEDERAL DE PESCA (1992)
Secretaria de Pesca, México, D.F.
- * LYNCH, M.J.; RAPHAEL, S.S.; SPARE, P.D. Y INWOOD, M.J.H. (1972)
Métodos de Laboratorio. Seg. Ed. Ed. Interamericana, México.
- * MARTIN, G.G. Y GRAVES, B.L. (1985)
Fine structure and classification of shrimp hemocytes. J. Morphol. 185: 339-348.
- * MCHUGH, D. J. (Eds.) (1987)
Production and Utilization of Products from Comercial Seaweeds. FAO Fish. Tech. Pap. (288): 189 p.
- * MCKAY, D. Y JENKIN, C.R. (1970a)
Immunity in the invertebrates. The role of serum factors in phagocytosis of erythrocytes by hemocytes of the freshwater crayfish (*Parachanna bicarinatus*). Austr. J.

Exp. Biol. Med. Sci. 48: 139-150.

- * MCKAY, D. Y JENKIN, C.R. (1970b)
Immunity in the invertebrates. Correlation of the phagocytic activity of hemocytes with resistance to infection in the crayfish (*Parachaeraps bicarinatus*). Austr. J. Exp. Biol. Med. Sci. 48: 609-17.

- * MCLEESE, D.W. (1958)
Air shipment of lobsters. Can. Dept. Fish. Trade News. 10(9): 5-6.

- * MCLEESE, D.W. Y WILDER, D.G. (1964)
Lobster storage and shipment. Fish. Res. Bd. Canada. Bull. No. 147. pag. 5-6 Ottawa.

- * MCLEESE, D.W. (1965)
Survival of lobsters, *Homarus americanus*, out of water. J. Fish. Res. Bd. Canada, 22(2): 385-394.

- * MCMAHON, B.R.; BUTLER, P.J. Y TAYLOR, E.W. (1978)
Acid base changes during recovery from disturbance and during long term hypoxic exposure in the lobster *Homarus vulgaris*. J. Exp. Zool. 205: 361-370.

- * MIX, M.C. Y SPARKS, A.K. (1980)
Hemocyte classification and differential counts in the Dungeness crab, *Cancer magister*. J. Invertebr. Pathol. 35: 134-143.

- * MORITA, T.; TANAKA, S.; NAKAMURA, T. Y IWANAGA, S. (1981)
A new (1-3)- β -glucan-mediated coagulation pathway found in *Limulus* amebocytes. FEBS lett. 129 (2): 318-321.

- * NEVEU, P.J. Y PERDOUX, D (1984)
Carrageenan-mediated suppression or augmentation of mitogen-induced lymphocyte proliferation. Int. J. Immunopharmac. 6(3): 187-191.

- * PAINTER, T. J. (1983)
Algal polysaccharides. En: (G.O. Aspinall, ed.) The Polysaccharides Vol. 2 Academic Press, N.Y.

- * PATERSON, W.D. Y STEWART, J.E. (1974)
In vitro Phagocytosis by hemocytes of the american lobster (*Homarus americanus*). J. Fish. Res. Bd. Can. 31 (6): 1051-1056.

- * PATERSON, W.D., STEWART, J.E. Y ZWICKER, B.M. (1976)
Phagocytosis as a cellular immune response mechanism in the american lobster *Homarus americanus*. J. Invertebr. Pathol. 27: 95-104.

- * PHILLIPS, H.J. (1973)
Dye exclusion tests for cell viability En: (P.F. Kruse y M.K. Patterson, eds.) Tissue Culture Methods and Applications p. 406-408. Academic Press, N.Y.

- * PHILLIPS, B.F.; COBB, J.S. Y GEORGE, R.W. (1980)
General Biology. En: (J.S. Cobb y B.F. Phillips,,eds.) Biology and Management of Lobsters Vol. I Physiology and Behavior Academic Press, N.Y.

- * POST, F. K. (1983)
Laboratory Manual for Food Microbiology. Star Publ. Co. Belmont, Cal.

- * ROITT, I.M.; BROSTOFF, J. Y MALE, D.K. (1989)
Immunology. Second Ed. Gower Medical Publ. London.

- * RUIZ-DURA, M.F. (1985)
Recursos Pesqueros de las Costas de México. 2da. Edición. Ed. Limusa, México.

- * SELJELID, R., BÖGWALD, J. Y LUNDWALL, Å. (1981)
Glycan stimulation of macrophages *in vitro*. Exp. Cell Res. 131: 121-129.

- * SINDERMANN, C.J. (1990)
Principal Diseases of Marine Fish and Shellfish Vol. 2 Diseases of Marine Shellfish. Academic Press, San Diego, Cal.

- * SITUACION ACTUAL DE LAS PRINCIPALES PESQUERIAS MEXICANAS (1988)
Secretaría de Pesca, México, D.F.

- * SMITH, V.J. Y RATCLIFFE, N.A. (1978)
Host defense reactions of the shore crab, *Carcinus means* (L.), *in vitro*. J. Mar. Biol. Ass. U.K. 58: 367-379.

- * SMITH, V.J. Y SÖDERHÄLL, K. (1983)
 β -1,3 glucan activation of crustacean hemocytes *in vitro* and *in vivo*. Biol. Bull. 164: 299-314.

- * SÖDERHÄLL, K.; HÄLL, L.; UNESTAM, T. Y NYHLÉN, L. (1979)
Attachment of phenoloxidase to fungal cell walls in arthropod immunity. J. Invertebr. Pathol. 34: 285-294.

- * SÖDERHÄLL, K. (1982)
Prophenoloxidase activating system and melanization . A recognition mechanism of arthropods? A review. Comp. Developm. Immunol. 6. pp. 601-611.

- * SÖDERHÄLL, K. (1983)
 β -1,3 glucan enhancement of protease activity in crayfish hemocyte lysate. Comp. Biochem. Physiol. Vol. 74 B (2): 221-224.

- * SÖDERHÄLL, K. Y HÄLL, L. (1984)
Lipopolysaccharide-induced activation of prophenoloxidase activating system in crayfish haemocyte lysate. Biochim. Biophys. Acta 797: 99-104.

- * SÖDERHÄLL, K.; SMITH, V. J. Y JOHANSSON, M.W. (1986)
Exocytosis and uptake of bacteria by isolated haemocyte populations of two crustaceans: evidence for cellular co-operation in the defense reactions of arthropods. Cell. Tissue Res. 245:43-49.

- * SÖDERHÄLL, K. (1992)
Biochemical and molecular aspects of cellular communication in arthropods. Boll. Zool. 59: 141-151.

- * SÖDERHÄLL, K. Y CERENIUS, L. (1992)
Crustacean immunity. Annual Rev. of Fish Diseases. p. 3-23.

- * STEEL, R.D. Y TORRIE, J.H. (1989)
Bioestadística: Principios y Procedimientos. Segunda edición. Editorial McGraw-Hill, México.

- * STEWART, J.E., CORNICK, J.W. Y DINGLE, J. R. (1967)
An electronic method for counting lobster (*Homarus americanus* Milne Edwards) hemocytes and the influence of diet on hemocyte numbers and hemolymph proteins. Can. J. Zool. 45: 291-304.

- * STEWART, J. E.; ARIE, B. Y MARKS, L. (1983)
Hemocyte patterns during gaffkemia infections and induction of resistance in *Homarus americanus*. Rapp.P.-v. Réun. Cons. int. Explor. Mer. 182: 126-129.

- * TSING, A., ARCIER, J.M. Y BREHÉLIN, M. (1989)
Hemocytes of Penaeid and Palaemonid shrimps: morphology, cytochemistry, and hemograms. J. Invertebr. Pathol. 53: 64-77.

- * UNESTAM, T. Y SODERHALL, K. (1977)
Soluble fragments from fungal cell walls elicit defense reactions in crayfish. Nature 265:45-46.

- * VERMEER, G.K. (1987)
Effects of air exposure on desiccation rate, hemolymph chemistry, and escape behavior of the spiny lobster, *Panulirus argus*. Fish. Bull. 85(1): 45-51.

- * WILLIAMS, A.J. Y LUTZ, P.L. (1975)
Blood cell types in *Carcinus maenas* and their physiological role J. Mar. Biol. Ass. U. K. 55: 671-674.

- * WOOD, P.J. Y VISENTIN, L.P. (1967)
Histological and histochemical observations of the hemolymph cells in the crayfish, *Oronconectes virilis*. J. Morphology 123: 559-568.

8.0 ANEXOS.

Tabla V. Características fisicoquímicas y flujo del agua de los tanques de mantenimiento de las langostas. Valores promedio durante la experimentación.

Característica fisicoquímica	Intervalo
Salinidad (ppm)	32 - 34
pH	7.9 - 8.1
Oxígeno (mg l ⁻¹)	6.8 - 7.01
Flujo l min ⁻¹	4.8 - 5.0

Tabla VI. Equivalencia del diagrama de Aiken (1980) a los estadios mayores y subdivisiones del ciclo de muda en crustáceos.

Diagrama de Aiken	Estadios mayores	Diagrama de Aiken	Estadios mayores
A	C1-C3	J	D1'
B	C4	K	D1'-D1''
C	D0	L	D1''
D	D0	M	D1'''
E	D0	N	D1''''-D2'
F	D0	O	D2'
G	D0	P	D2''
H	D0	Q	D2'''-D3
I	D0	R	D3