

Caracterización hemocitaria del Camarón de Río *Cryphiops caementarius* Molina, 1872 (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae) del río Lacramarca (Provincia del Santa, Departamento de Ancash, Perú)

Carlos Alberto Azañero Díaz¹, Walter Eduardo Reyes Avalos¹, Henry Lujan Monja², Rosa Rodríguez Oviedo², Fabiola Saucedo Sabalú²

¹ Departamento de Biología, Microbiología y Biotecnología. Universidad Nacional del Santa (Perú)

² Asociación Acuicultura y Desarrollo (AQUADES) (Perú)

Resumen

Se caracterizaron los hemocitos del Camarón de Río *Cryphiops caementarius* según el tipo, forma y tamaño; así como, el número total (NTH) y diferencial (NDH) de hemocitos. Se emplearon 20 camarones hembras de 1.33 ± 0.69 g de peso y de 3.89 ± 0.33 cm de longitud total y en estado de muda C, capturados del río Lacramarca (Provincia del Santa, Departamento de Ancash). La hemolinfa fue extraída del seno pericárdico. Se realizaron extensiones coloreadas con la técnica de Giemsa y preparaciones en fresco con solución de Alsever modificado a 4°C. Las observaciones se realizaron con microscopio de campo luminoso provisto de contraste de fases. El tamaño de los hemocitos fue determinado empleando un ocular micrométrico. En el Camarón de río *C. caementarius* se determinaron tres tipos de hemocitos, los hemocitos hialinos (H), los hemocitos semigranulosos (SG), y los hemocitos granulosos (G). La forma de los tres tipos de hemocitos generalmente es redonda. El tamaño de los hemocitos granulosos, semigranulosos y hialinos fueron de 13.28 ± 1.77 μm ; 12.83 ± 1.58 μm y 12.08 ± 2.46 μm respectivamente. El NTH promedio fue de $25.72 \pm 16.49 \times 10^5$ cél/ml. El NDH promedio de semigranulocitos, granulocitos hialinocitos fueron de $13.71 \pm 9.77 \times 10^5$ cél/ml (53.8%), $10.54 \pm 7.51 \times 10^5$ cél/ml (41.3%) y $1.25 \pm 0.91 \times 10^5$ cél/ml (4.9%) respectivamente.

Summary

Haemocytes characterization of River Prawn *Cryphiops caementarius* Molina, 1872 (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae) of the river Lacramarca (Province of Santa, Department of Ancash, Perú)

The haemocytes of the was characterized River Prawn *Cryphiops caementarius* according to the type, forms and size; as well as, the one numbers total (NTH) and differential (NDH) of haemocytes. It was used 20 shrimps females of 1.33 ± 0.69 g of weight and of 3.89 ± 0.33 cm of total length and in moult state C, captured of the river Lacramarca (County of the Santa, Department of Ancash). The hemolymph was extracted of the pericardic sinus. They were carried out colored extensions with the technique of Giemsa and preparations in fresh of with solution of Alsever modified at 4°C, which were analyzed using a microscope of conventional light of provided luminous field of contrast of phases. The size of the haemocytes was determined using a micrometric ocular mounted in a microscope of conventional light of luminous field. In the River shrimp *Cryphiops caementarius* three haemocytes types were determined, the hyaline haemocytes (H), the semigranulose haemocytes (SG), and the granular haemocytes (G). The form of the three types of haemocytes generally is round. The size of the granular, semigranulocyte and hyaline haemocytes were of 13.28 ± 1.77 μm ; 12.83 ± 1.58 μm and 12.08 ± 2.46 μm respectively. The NTH average was of $25.72 \pm 16.49 \times 10^5$ cells/ml; and, the NDH semigranulocyte average, granulocyte and hyaline were of $13.71 \pm 9.77 \times 10^5$ cells/ml (53.8%), $10.54 \pm 7.51 \times 10^5$ cells/ml (41.3%) and $1.25 \pm 0.91 \times 10^5$ cells/ml (4.9%) respectively.

Introducción

Cryphiops caementarius, es un crustáceo ampliamente distribuido en los ríos costeros de Perú (1) de gran capacidad reproductiva, rusticidad y alto valor comercial por su agradable sabor. Esta especie vive en aguas con temperaturas entre 10 y 25°C, pH entre 6 a 8 y con 3 ppm de oxígeno disuelto (2).

Morfológicamente, como en todo crustáceo, se distingue un cefalotórax y un abdomen segmentado. Los órganos, tales como branquias, estómago, hepatopáncreas, gónadas y corazón están localizados en el cefalotórax, mientras que el intestino en el abdomen. El sistema circulatorio es abierto y la sangre y las células sanguíneas se les denominan hemolinfa y hemocitos, respectivamente. Los hemocitos son producidos en el tejido hematopoyético que está disperso en el cefalotórax, alrededor del estómago y en el inicio de los maxilípedos (3).

La función del sistema inmune es mantener la individualidad biológica, por ello, su principal actividad es diferenciar y eliminar todo material extraño de los tejidos. El sistema inmune de los invertebrados se diferencia del sistema inmune de los vertebrados, principalmente por la ausencia de moléculas del tipo inmunoglobulina y células linfoides (4).

Los mecanismos de defensa innata de los crustáceos están basados en componentes celulares y humorales del sistema circulatorio, lo que está interrelacionado con la detección y eliminación de patógenos extraños, microorganismos y parásitos que evidencian un peligro potencial para el hospedero. Los hemocitos son análogos a los glóbulos blancos de los vertebrados (5). Estas células son cruciales en estas reacciones inmunitarias siendo capaz de fagocitar, encapsular, formar nódulos y producir citotoxicidad. Ellos constituyen la fracción celular de la hemolinfa (3, 6, 7).

Teniendo en cuenta que no se conocen aspectos relacionados con la respuesta del sistema inmune, en especial de la caracterización hemocitaria en el camarón de río *Cryphiops caementarius*, el hemograma podría constituir un marcador del estado fisiológico e inmunitario de los camarones, estableciendo de esta forma un sistema de control inmune que permite la detección de inmunodeficiencias y el control de la calidad ambiental. Por lo tanto, los objetivos del presente trabajo fueron determinar la forma, tamaño y tipos; así como, el número total y diferencial de los hemocitos del camarón de río *Cryphiops caementarius*.

Material y métodos

El estudio se realizó entre julio y diciembre de 2005. Los camarones hembras adultas de *C. caementarius*, fueron procedentes del río Lacramarca (Provincia del Santa, Departamento de Ancash) y capturados mensualmente.

Se emplearon un total de 20 camarones hembras de 1.33 ± 0.69 g de peso y de 3.89 ± 0.33 cm de longitud total (escotadura postorbital hasta extremo posterior del telson) y en estado de muda C (8).

Fueron acondicionados en sistemas de acuarios conteniendo agua potable decolorada con aireación constante durante 72 h antes de su uso. Doce horas antes de la toma de muestra de la hemolinfa se suspendió la alimentación y una vez transcurrido ese lapso se colocaron 5 camarones por 5 min en recipientes plásticos de 4 l con agua dulce decolorada, preaireada y a temperatura ambiente (9).

Los camarones fueron alimentados *ad libitum* utilizando alimento fresco conformado por carne de almeja (*Semele solida*) y pescado seco salado (*Trachurus symmetricus murphyi*).

La limpieza de los acuarios se realizó diariamente por sifoneo de los desechos metabólicos sólidos y de los restos de alimento no consumido. Durante cada muestreo, se realizaron controles de la temperatura, pH y oxígeno del agua según Fukushima *et al.* (10).

La hemolinfa fue extraída del seno pericárdico de los animales vivos (Figura 1) usando una jeringa de 1 ml (Insulin Syringe 26 G ½) según Jussila *et al.* (11). Se realizaron extensiones en láminas portaobjetos y se colorearon según la técnica de Giemsa (12); así mismo se realizaron preparaciones en fresco de la hemolinfa con solución de Alsever modificado a 4°C (13, 3).

Las extensiones coloreadas y preparaciones en fresco fueron analizadas usando un microscopio LEICA DM LS2 de luz convencional de campo luminoso provisto de contraste de fases, para determinar las características morfológicas y clasificación de los hemocitos (12). El tamaño de los hemocitos fue medido empleando un ocular micrométrico montado en un microscopio Nikon de luz convencional de campo luminoso.

Figura 1

Toma de muestra de hemolinfa del seno pericárdico de *C. caementarius*.



Para la determinación del número total (NTH) y diferencial (NDH) de los hemocitos, se midieron 20 μ l de hemolinfa extraída y se adicionó a un microtubo (Eppendorf) conteniendo 80 μ l de solución de la solución de Alsever modificado a 4°C, según Rodríguez *et al.* (13) y Van de Braak (3).

Se utilizó una cámara de Neubauer y un microscopio Leica DM LS2 de luz convencional de campo luminoso provisto de contraste de fases. El NTH y NDH fue expresado en 10^5 células/ml, teniendo en cuenta la fórmula de Jussila (14).

Los resultados del número total (NTH) y diferencial (NDH) de hemocitos fueron sometidos a modelo descriptivo de tendencia central (media) y de dispersión (desviación estándar).

Resultados

Caracterización hemocitaria

Los hemocitos del camarón de río *C. caementarius* fueron caracterizados en tres tipos (Tabla I) teniendo en cuenta su afinidad por la tinción Giemsa (Figuras 2 y 3) y por su poder refringente observados en microscopía de luz convencional de contraste de fases (Figura 4).

Tabla I

Características de los tipos de hemocitos granulados, semigranulosos y hialinos (μ m) de *C. caementarius*.

| Tipo de hemocito | Forma celular | Forma y color del núcleo | Color del citoplasma | Gránulos citoplasmáticos | Refringencia |
|------------------|---------------|--------------------------|----------------------|--------------------------|--------------|
| Granulocito | Redondo | Redondo y violáceo | Rojo-violáceo oscuro | Abundante | Grande |
| Semigranulocito | Redondo | Redondo y violáceo | Rojo-violáceo claro | Regular | Moderada |
| Hialino | Redondo | Redondo y violáceo | Azul claro | Poco o ausente | Sin |

Figura 2

Hemocitos en frotis de hemolinfa de *C. caementarius*. Hemocitos granuloso (a), semigranulosos (b) y hialinos (c). Coloración Giemsa. 100x Barra de escala = aprox. 8 μ m.

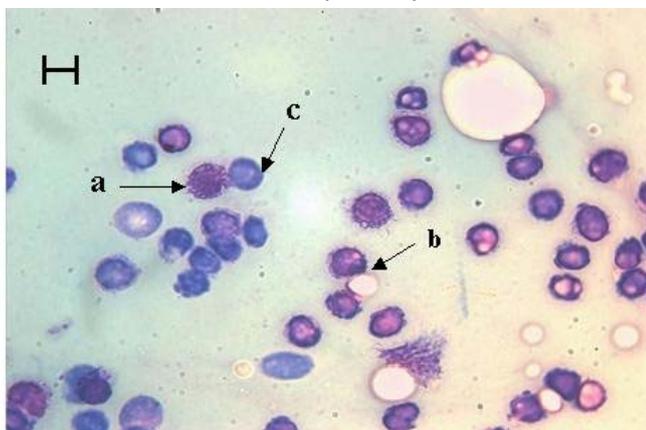


Figura 3

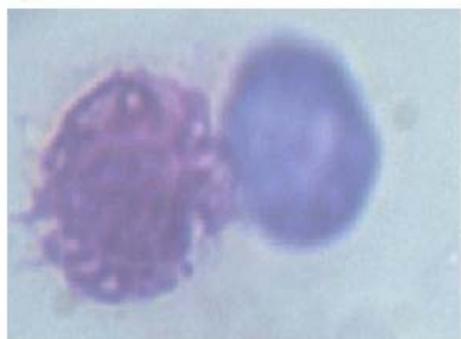
Hemocitos en frotis de hemolinfa de *C. caementarius*. A: Hemocito granuloso (izquierda). Hemocito semigranuloso (derecha), B: Hemocito granuloso (izquierda). Hemocito hialino (derecha), C: Hemocito hialino (izquierda). Hemocito semigranuloso (derecha). Coloración Giemsa. 100x. Barra de escala = aprox. 4 μ m.



A



C



B

- **Hemocito granuloso o granulocito** (Figura 2a y 3 A, B).

Son células grandes de forma redonda, de color rojo-violáceo, con prolongaciones citoplasmáticas, a manera de espículas. Su núcleo no se distingue claramente; sin embargo, aparenta ser de forma esférica. El citoplasma es eosinofílico u oscuro de aspecto granular. En microscopía de contraste de fases se observa que tienen mucha refringencia (Figura 4A).

- **Hemocito semigranuloso o semigranulocito** (Figura 2b y 3 A, C).

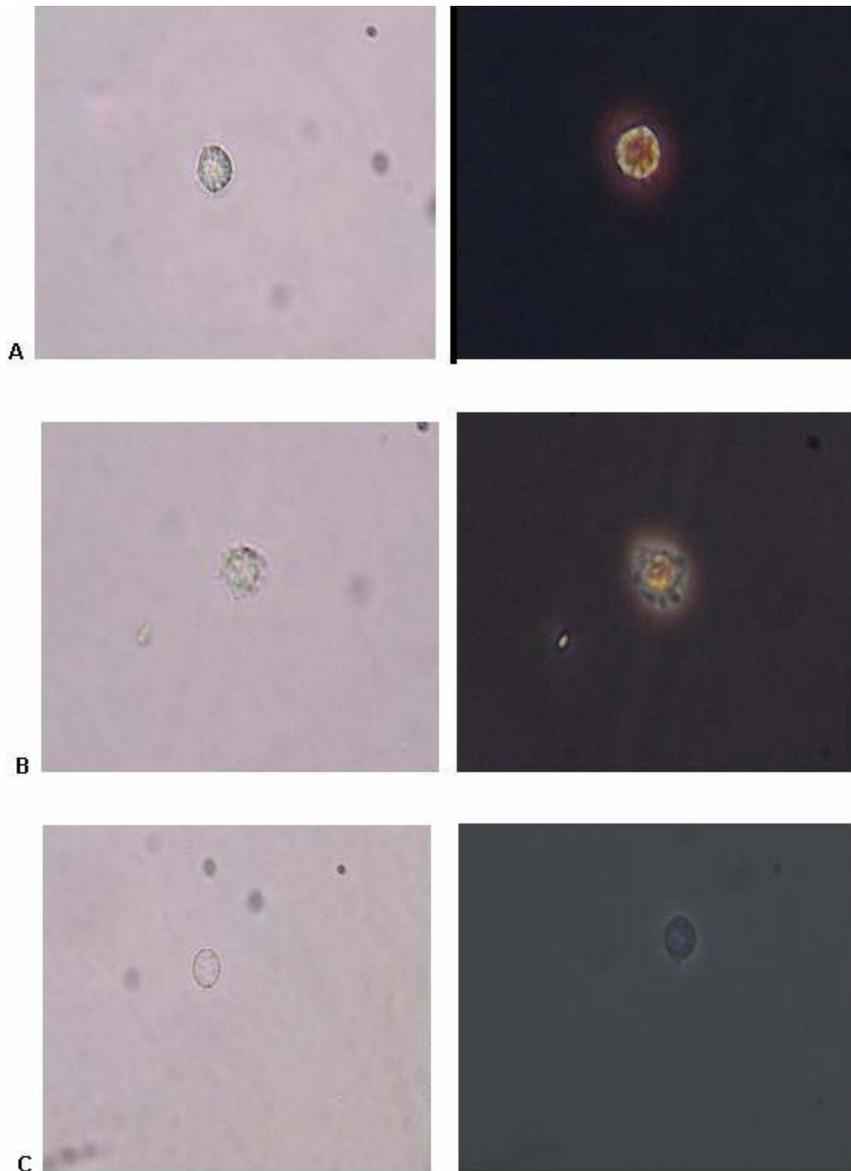
Son células de mediano tamaño de forma redonda, de color rojo violáceo moderado. Su núcleo es de forma esférica u ovalado. El citoplasma es medianamente eosinofílico y de aspecto granular. En microscopia de contraste de fases se observa moderada refringencia (Figura 4B).

- **Hemocito hialino o hialinocito** (Figura 2c y 3 B, C).

Son células de menor tamaño de forma redonda, de color azul claro. Su núcleo es de forma esférica y ocupa la mayor parte de la célula. El citoplasma es delgado. No tiene aspecto granular. En microscopia de contraste de fases no son refringentes (Figura 4C).

Figura 4

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



Tamaño

En la Tabla II se muestra el diámetro de los tipos de hemocitos, siendo los de mayor diámetro, los granulocitos; de mediano diámetro, los semigranulocitos y de menor diámetro los hialinocitos.

Tabla II

Diámetro de los tipos de hemocitos granulosos, semigranulosos y hialinos (μm) de *Cryphiops caementarius*.

| Tipos de hemocitos | Diámetro (μm) |
|--------------------|------------------------------------|
| Granulocito | 13.28 ± 1.77 (12.0 - 16.5; 20) |
| Semigranulocito | 12.83 ± 1.58 (10.5 - 15.0; 20) |
| Hialino | 12.08 ± 2.46 (9.0 - 16.5; 20) |

Promedio \pm desviación estándar (rango; número de mediciones).

Número total (NTH) y diferencial (NDH) de hemocitos

El NTH y NDH se muestran en la Tabla III. El NTH promedio fue de $25.72 \times 10^5 \pm 16.49 \times 10^5$ células/ml. En lo que respecta al NDH, el promedio de semigranulocitos, granulocitos y hialinocitos fueron de $13.71 \times 10^5 \pm 9.77 \times 10^5$ células/ml (53.8%), $10.54 \times 10^5 \pm 7.51 \times 10^5$ células/ml (41.3%) y $1.25 \times 10^5 \pm 0.91 \times 10^5$ células/ml (4.9%) respectivamente.

Tabla III

Número total (NTH) y diferencial (NDH) de hemocitos de *C. caementarius*.

| Nº total de hemocitos (NTH) $\times 10^5$ cel/ml | Nº diferencial de hemocitos (NDH) $\times 10^5$ cel/ml | | |
|--|--|--------------------------------------|------------------------------------|
| | Granulocitos | Semigranulocitos | Hialinocitos |
| 25.50 ± 16.49 (6.1 - 62.4; 20) | 10.54 ± 7.51 (0.5 - 24.0; 20) | 13.71 ± 9.77 (1.6 - 36.1; 20) | 1.25 ± 0.91 (0.3 - 3.7; 20) |

Promedio \pm desviación estándar (rango; número de mediciones).

Los parámetros de calidad del agua medidos durante la experiencia mostraron rangos de variación aceptables, siendo la temperatura de 19.8 a 24.5°C, el pH de 7.0 a 7.2 y el oxígeno disuelto de 4.5 a 5.2 mg/l.

Discusión

La identificación y clasificación de los hemocitos de *C. caementarius* según el criterio morfológico y la capacidad de refringencia (Tabla I, Figuras 2 y 3) guardan relación con los descritos con Rendón y Balcázar (7) en *Penaeus vannamei*, quienes determinaron tres tipos de hemocitos, los hemocitos hialinos (H), que no poseen gránulos y sin refringencia, los hemocitos semigranulosos (SG), con regular cantidad de gránulos y moderada refringencia, y los hemocitos granulosos (G), cargados de gránulos y con gran refringencia.

Así mismo, nuestros resultados concuerdan con lo descrito por Jussila, (14), en el cual describe que los hemocitos en *Astacus astacus*, *Pacifastacus leniusculus* y *Cherax tenuimanus*, son de tres tipos diferentes: los hialinocitos, granulocitos y semigranulocitos, las cuales se diferencian en morfología y función, y por Hose *et al.* (15) que examinaron los hemocitos de tres crustáceos decápodos (*Homarus americanus*, *Panulirus interruptus* y *Loxorhynchus grandis*) y propusieron una clasificación de estas células basados en su morfología, citoquímica y estudios de sus funciones. En todas las especies estudiadas fueron identificados células hialinas y granulocitos (dos subgrupos con gránulos grandes y

otros con gránulos pequeños). En el caso de las células con gránulos grandes observaron que son altamente retractiles, lo cual dificulta la observación del núcleo y comparando con nuestros resultados (Figura 4), podemos sugerir que la mayor refringencia estaría relacionada con la cantidad de gránulos.

Según Martin y Hose (12) en crustáceos decapados (*Sicyonia ingentis*, *Homarus americanus*, *Panukirus interruptus*, *Loxorhynchus grandis* y *Procambarus clarkii*) las células hialinas en microscopio de contraste de fases es de forma ovoide y la relación nucleocitoplasmática es alta y en frotis coloreados con Giemsa el núcleo es azul oscuro y con un fino tono rosado a nivel citoplasmático; sin embargo, los granulocitos y semigranulocitos en microscopio de contraste de fases son de forma redondo a oval y el núcleo es de posición central, en el caso de los semigranulocitos; en los granulocitos, el núcleo es excéntrico y el citoplasma es de color rojo oscuro. En frotis coloreados con Giemsa el núcleo es azul oscuro y el citoplasma es rojo pálido, Por lo tanto, lo anterior guarda concordancia con nuestros resultados (Tabla I y II; Figura 2, 3 y 4).

En relación al tamaño, y según Martin y Hose (12), en los crustáceos decapados (*S. ingentis*, *H. americanus*, *P. interruptus*, *L. grandis* y *P. clarkii*) las células hialinas son las mas pequeñas (7-11 μm de diámetro), sin embargo, los granulocitos y semigranulocitos son mas grandes que las células hialinas (10-14 μm y 8-14 μm de diámetro respectivamente). Por lo tanto, lo anterior guarda concordancia con nuestros resultados (Tabla I y II; Figura 2, 3 y 4), siendo el tamaño de los hemocitos granulosos, semigranulocitos y hialinos 13.28 ± 1.77 ; 12.83 ± 1.58 y 12.08 ± 2.46 respectivamente.

En *C. caementarius*, el NTH promedio fue de $25.50 \pm 16.49 \times 10^5$ células/ml (Tabla III), siendo menor a lo reportado en hembras de 7 a 40 g *Macrobrachium rosenbergii* por Cheng y Chen (16) que fue de $125.4 \pm 13.5 \times 10^5$ a $153.3 \pm 12.0 \times 10^5$ células/ml y mucho más bajo que en *Penaeus monodon* que fue de $50.9 \pm 17.7 \times 10^6$ células/ml (3). Esta diferencia en el NTH encontrado en nuestra especie podría deberse al tamaño de los animales pues nosotros trabajamos con ejemplares pequeños de 0.86 a 3.21 g. También es posible que la especie y su estado fisiológico afecten el NTH.

Los hemocitos semigranulosos ($13.71 \pm 9.77 \times 10^5$ células/ml; 53.8%) y los granulocitos ($10.54 \pm 7.51 \times 10^5$ células/ml; 41.3%), se encontraron en similares proporciones; en cambio los hemocitos hialinos ($1.25 \pm 0.91 \times 10^5$ células/ml; 4.9%) estuvieron en menor proporción. Estos valores difieren con lo aportado por Hose *et al.*, (15) quienes examinaron los hemocitos de crustáceos decápodos y encontraron una amplia variación en la proporción de hemocitos semigranulosos (31 a 65%), granulocitos (10 a 13%) y hemocitos hialinos (21 a 56%). Esta variación de los tipos de hemocitos podría ser consecuencia de varios factores como el ambiental, nutricional, sanitario y fisiológico. Jussila *et al.* (11), investigaron los efectos del oxígeno, manipulación e injurias sobre el recuento total y diferencial de los hemocitos en *P. cygnus*, los cuales sufrieron un incremento, relacionados con las respuestas frente a los disturbios físicos.

Teniendo en cuenta lo anterior, las conclusiones de nuestro estudio fueron:

- En *C. caementarius* se determinaron tres tipos de hemocitos, los hemocitos hialinos (H), los hemocitos semigranulosos (SG), y los hemocitos granulosos (G).
- La forma de los tres tipos de hemocitos generalmente es redonda
- El tamaño de los hemocitos granulosos, semigranulocitos y hialinos fue de $13.28 \pm 1.77 \mu\text{m}$; $12.83 \pm 1.58 \mu\text{m}$ y $12.08 \pm 2.46 \mu\text{m}$ respectivamente.
- El NTH promedio fue de $25.72 \pm 16.49 \times 10^5$ células/ml.
- El NDH promedio de semigranulocitos, granulocitos y hialinocitos fueron de $13.71 \pm 9.77 \times 10^5$ células/ml (53.8%), $10.54 \pm 7.51 \times 10^5$ células/ml (41.3%) y $1.25 \pm 0.91 \times 10^5$ células/ml (4.9%) respectivamente.

Referencias

1. VIACA M, AITKEN R, LLANOS J. Estudio del camarón de río en el Perú. 1975-1976. *Bol. Inst. Mar Perú*. 1978; 3(35):161-232
2. VENTURI V. *Cultivo de camarones en estanques. Bioecología, crianza y repoblación*. Lima: Universidad Nacional Agraria la Molina, 1972
3. VAN DE BRAAK K. *Haemocytic defence in black tiger shrimp (Penaeus monodon)*. Tesis PhD. Wageningen Institute of Animal Sciences, The Netherlands. 2002
4. TONGUTHAI K.. Diseases of the Freshwater Praw, *Macrobrachium rosenbergii*. *The Aquatic Animal Health Research Institute*. 1997; 4(2)
5. MALDONADO M, RODRIGUEZ J, DE BLAS I, ECHECARRIA F. Comportamiento hemocitario en familias de *Litopenaeus vannamei* desafiadas al WSSV. En: *II Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura 2003. CIVA 2003*. 2003:891-9. Disponible en URL: <http://www.civa2003.org>
6. YOUNG LEE S. *Initiation of Innate Immune responses in the Freshwater Crayfish *Pacifastacus leniusculus**. Dissertation for the Degree of Doctor of Philosophy in Physiological. Uppsala University. 2001
7. RENDON L, BALCAZAR JL. Inmunología de camarones: Conceptos básicos y recientes avances. *Revista AquaTIC* 2003; 19:27-33. Disponible en URL: <http://www.revistaaquatic.com>
8. REYES WE, LUJÁN H. Estados y subestados del ciclo de muda del camarón de río (*Cryphiops caementarius* Molina, 1872) (Crustacea, Decapoda, Palaemonidae) en laboratorio. En: *II Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura 2003. CIVA 2003*. 2003:808-17. Disponible en URL: <http://www.civa2003.org>
9. ROSAS C, PASCUAL C, LOPEZ N, SANCHEZ A. Metabolitos sanguíneos como herramientas para evaluar el estado nutricional de camarones peneidos. En: *VI Avances en Nutrición Acuícola. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. Cancún, Quintana Roo, México. 2002
10. FUKUSHIMA M, SIFUENTES G, SALDAÑA G, CASTILLO G, REYES J, SHIMOKAWA L. *Métodos limnológicos. Dpto. Ciencias Biológicas*. Trujillo: Universidad Nacional de Trujillo, 1982
11. JUSSILA J, JAGO J, TSVETNENKO E, EVANS LH. Effects of handling or injury disturbance on total hemocyte counts in western rock lobster (*Panulirus cygnus* George). *Proceedings of International Symposium on Lobster Health Management*. 1999
12. MARTIN GG, HOSE JE. Vascular Elements and Blood (Hemolymph). Microscopic Anatomy of Invertebrates. *Decapod Crustacea* 1992; 10:117-46
13. RODRÍGUEZ J, BOULO V, MIALHE E, BACHERE E. Characterisation of shrimp haemocytes and plasma components by monoclonal antibodies. *Journal of Cell Science* 1995; 108:1043-50
14. JUSSILA J. *Physiological Responses of Astacid and Parastacid Crayfishes (Crustacea: Decapoda) to conditions of intensive culture*. Doctoral dissertation. Department of Applied Zoology & Veterinary Medicine. University of Kuopio. Perth, Western Australia. 1997
15. HOSE JE, MARTIN GG, GERARD AS. A decapod Hemocyte Classification Scheme Integrating Morphology, Cytochemistry, and Function. *Biol. Bull.* 1990; 178:33-45
16. CHENG W, CHEN JCH. Effects of intrinsic and extrinsic factors on the haemocyte profile of the prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Fish & Shellfish Immunology* 2001; 11:53-63