

Hemocitos y oxihemocianina en hembras de *Cryphiops caementarius* Molina 1782 (Crustacea: Palaemonidae) criadas a diferentes salinidades.

Orlinda Villanueva Valverde[†], Walter Reyes Avalos¹, Sorayda Mendoza Espinoza¹, Carmen Yzásiga Barrera¹

[†] En Homenaje Póstumo a la primera Doctora del Departamento Académico de Biología, Microbiología y Biotecnología. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional del Santa, Nuevo Chimbote, Ancash, Perú.

¹ Departamento Académico de Biología, Microbiología y Biotecnología. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional del Santa. Av. Universitaria s/n Urb. Bellamar. Nuevo Chimbote, Ancash, Perú.

Email: wreyes_avalos@hotmail.com

Resumen

Las hembras de *Cryphiops caementarius* se concentran en la desembocadura de los ríos para reproducirse y soporta variaciones de salinidad, entre otros factores. El objetivo fue determinar la variación de los hemocitos totales y de la concentración de oxihemocianina de la hemolinfa en hembras de *C. caementarius* criadas en diferentes salinidades. Los camarones de 5,63 g y 5,72 cm fueron distribuidos en ocho acuarios y mantenidos durante 30 días en agua con salinidades de 0, 6, 12 y 18‰, alimentados con balanceado dos veces al día con el 2% de la biomasa. Los análisis se realizaron de la hemolinfa, extraída del seno pericárdico. El número total de hemocitos y la concentración de oxihemocianina fueron significativamente ($P < 0,05$) mayores en las hembras criadas a 12‰ de salinidad ($207,50 \times 10^5 \pm 38,89 \times 10^5$ células mL^{-1} ; $5,619 \pm 4,735$ mmol L^{-1}) en relación con las criadas en 6‰ ($106,00 \times 10^5 \pm 64,12 \times 10^5$ células mL^{-1} ; $0,518 \pm 0,159$ mmol L^{-1}) y a 0‰ ($73,75 \times 10^5 \pm 25,37 \times 10^5$ células mL^{-1} ; $0,228 \pm 0,237$ mmol L^{-1}). En salinidad de 18‰ todos los camarones murieron a los 8 días; en cambio la supervivencia en 12‰ fue de 25%, y en 6‰ y 0‰ fue de 66,7% y 58,3%, respectivamente. El incremento de la salinidad del agua inducen a un incremento del número total de hemocito y de la concentración de oxihemocianina; sin embargo, en alta salinidad la supervivencia fue baja y esto indica situaciones de estrés.

Palabras Clave: Camarón *Cryphiops*, hemocitos, oxihemocianina, salinidad.

Summary

Hemocytes and oxyhemocyanin in females *Cryphiops caementarius* Molina 1782 (Crustacea: Palaemonidae) reared at different salinities.

The females of *Cryphiops caementarius* concentrated at the mouth of the rivers to spawn and support salinity variations, among other factors. The aim was to determine the variation of total hemocytes and oxyhemocyanin concentration in females *C. caementarius* at different salinities. The prawn of 5,63 g and 5,72 cm were divided into eight tanks and held in water with salinities of 0, 6, 12 and 18‰, and were fed at the rate of 2% of the biomass, with a balanced diet, twice on a day for 30 days. Analyses were performed in hemolymph, extracted from the pericardial sinus. The total number of hemocytes and oxyhemocyanin concentrations were significantly ($p < 0.05$) higher in females reared at 12‰ salinity ($207,50 \times 10^5 \pm 38,89 \times 10^5$ cells mL^{-1} , $5,619 \pm 4,735$ mmol L^{-1}) in relation to those reared in 6‰ ($106,00 \times 10^5 \pm 64,12 \times 10^5$ cells mL^{-1} , $0,518 \pm 0,159$ mmol L^{-1}) and 0‰ ($73,75 \times 10^5 \pm 25,37 \times 10^5$ cells mL^{-1} , $0,228 \pm 0,237$ mmol L^{-1}). At 18‰ salinity all prawns died within eight days, whereas in 12‰ survival was 25%, and 6‰ and 0‰ it was 66,7% and 58,3%, respectively. Increased salinity induces an increase of total number hemocytes and oxyhemocyanin concentration; however, at high salinity survival was low and this indicates stress.

Key words: Prawn *Cryphiops*, hemocytes, oxyhemocyanin, salinities

Introducción

La acuicultura de crustáceos constituye una actividad económica muy importante pero al mismo tiempo está limitada por enfermedades infecciosas provocadas, entre otros, por virus, bacterias y hongos, a esto se suma el incremento de la resistencia de éstos patógenos creada por el uso de antibióticos (Bachère, 2000). El sistema de defensa de los crustáceos está basado en efectores celulares y humorales, los cuales se conjugan para eliminar microorganismos potencialmente infecciosos.

La circulación en los crustáceos es abierta y la hemolinfa realiza varias funciones fisiológicas siendo una de estas funciones el transporte de proteína respiratoria llamada hemocianina el cual constituye el 65% del total de proteínas de la hemolinfa en *Macrobrachium rosenbergii* (Cheng y cols., 2003c), seguida por la proteína de coagulación y otros componentes humorales (Rodríguez & Le Moullac, 2000). Además en la hemolinfa se encuentran los elementos celulares llamados hemocitos.

Los hemocitos de los crustáceos son las células que pueden ser cuantificadas como hemocitos totales y hemocitos diferenciales, siendo estos últimos conformada por diversos tipos de células que tienen un rol crucial en reacciones inmunitarias específicas, siendo los hemocitos granulocitos y semigranulocitos los que almacenan las enzimas que constituyen el sistema profenoloxidasa y con la que proveen una respuesta inmune rápida de los organismos a la invasión bacteriana (Rodríguez & Le Moullac, 2000; Vargas-Albores & Yepiz-Plascencia, 2000; Terwilliger, 2007), además, poseen capacidad de fagocitosis, encapsulación, formación de nódulos y de citotoxicidad (Vásquez y cols., 1998; Rendón & Balcázar, 2003).

En los crustáceos, los hemocitos, la fenoloxidasa y la hemocianina son algunos de los parámetros inmunológicos ampliamente estudiados (Sung y cols., 1996; Le Moullac y cols., 1998; Bachère, 2000; Terwilliger, 2007). Cambios en los factores ambientales inducen alteraciones en la respuesta inmune en términos de número de hemocitos, actividad de fagocitosis, actividad fenoloxidasa (Le Moullac & Haffner 2000) y del anión superóxido (Verghese y cols., 2007). Así, en el langostino *Litopenaeus vannamei* el amonio afecta la actividad fagocítica y de la fenoloxidasa (Liu & Chen 2004). En el camarón de agua dulce *M. rosenbergii*, el pH produce una disminución de la actividad fagocítica (Cheng y cols., 2003a), el oxígeno del agua afecta el sistema inmune y la susceptibilidad a patógenos (Cheng y cols., 2002) y el insecticida triclorfón disminuye la actividad fenoloxidasa a concentraciones superiores a 0,2 mg L⁻¹ (Yeh y cols., 2005).

Cambios en el sistema inmune de crustáceos también son provocados por desbalance hormonal (Fingerman, 1997), por hipoxia (Le Moullac y cols., 1998; Cheng y cols., 2003c), temperatura (Sánchez y cols., 2001), infecciones virales, uso de inmunoestimulantes (Henning y cols., 1998), ayuno (Pascual y cols., 2006), calidad de la dieta (Rodríguez y cols., 2000; Pascual y cols., 2004; Goimier y cols., 2006; Yaemsooksawat y cols., 2009; Villanueva, 2011) y salinidad (Perazzolo y cols., 2002).

El langostino *L. vannamei* es más susceptible a *Vibrio alginolyticus* dentro de las 24 horas de ser expuesto a salinidades entre 5‰ y 15‰ (Wang & Chen 2005). En *M. rosenbergii*, las salinidades entre 5‰ y 10‰ produce incremento de la actividad fagocítica (Cheng y cols., 2003b), además hay un incremento del número total de hemocitos cuando es criado en 15‰ (Cheng & Chen, 2000).

El camarón de río *Cryphiops caementarius* Molina 1782, es la especie de importancia en el Perú porque soporta intensa pesquería que en el 2012 alcanzó las 729 TM (Produce, 2013) y porque tiene amplia distribución latitudinal en la vertiente occidental de los andes, desde el río Taymí (Cuenca del río Chancay-Lambayeque) en el norte del Perú (06°32' S, Amaya & Guerra, 1976) hasta el río Maipo en el norte de Chile (33°26' S, Jara, 1997),

pero abunda en los ríos de Arequipa-Perú (16°23'S) desde el nivel del mar hasta los 1400 msnm, contribuyendo con el 80% del recurso existente en la costa peruana (Zacarías & Yépez, 2008). Es por ello que se reportan diversos estudios de cultivo de la especie (Morales, 1997; Meruane *y cols.*, 2006; Reyes *y cols.*, 2006; Reyes, 2012; Mogollón, 2013).

Los tipos de hemocitos granulados, semigranulosos y hialinos de *C. caementarius* fueron caracterizados por Azañero *y cols.* (2006) y se ha determinado que la levadura en la dieta incrementa el número total de hemocitos (Cornejo & Pérez, 2013). El efecto de la salinidad sobre el número total de hemocitos en hembras de *C. caementarius* no se conoce, sin embargo por el hecho de que ellas se concentran en la desembocadura de los ríos para reproducirse (Viacava *y cols.*, 1978) deben soportar amplias variaciones de salinidad, entre otros factores ambientales, pues en otros crustáceos se ha reportado que el número de hemocitos circulantes es un indicador de estrés, que varía de acuerdo a las condiciones ambientales (Le Moullac & Haffner, 2000). Por consiguiente, el objetivo fue determinar la variación de los hemocitos totales y de la concentración de oxihemocianina en hembras del camarón de río *C. caementarius*, criadas en diferentes salinidades.

Materiales y métodos

Material biológico y diseño experimental: Se emplearon 48 camarones hembras en diferentes estados de maduración del ovario de la especie *C. caementarius*, capturados en el río Lacramarca (09°07'70"S y 78°34'20"W) (Provincia del Santa, Departamento de Ancash, Perú) de $5,63 \pm 2,53$ g y $5,72 \pm 0,75$ cm. Los camarones fueron aclimatados una semana en agua dulce y luego transferidos hacia acuarios (0,60 m de largo, 0,31 m de ancho y 0,35 m de alto, con área de $0,186$ m² y volumen efectivo de 55 L) conteniendo 30 L de agua con las salinidades de 0, 6, 12 y 18‰ en donde fueron mantenidos durante 30 días. Dos acuarios fueron aleatoriamente asignados para cada uno de los cuatro tratamientos, sembrándose seis camarones por acuario (32 camarones m⁻²). Las salinidades del agua fueron preparadas con mezcla de agua de mar (Playa El Dorado) y agua potable previamente declarada por aireación.

Mantenimiento de camarones: Los camarones fueron alimentados diariamente (0800 y 1800 h) con balanceado comercial para camarón de mar (40% de proteína total), considerando el 2% de la biomasa durante el tiempo de la experiencia. Las heces así como los restos de alimento no consumido se extrajeron mediante sifoneo dos veces al día, reponiéndose el agua en aproximadamente 5%. El agua de los acuarios fue aireada (2 L min⁻¹) mediante un blower de 1 HP. Refugios de tubos PVC (1" Ø) fue utilizado para evitar muertes por canibalismo, dado la agresividad de la especie en cautiverio.

Calidad del agua: La salinidad del agua fue determinada con un refractómetro Atago S-28E (± 1 ‰) y fue controlada adicionando agua potable declarada. El oxígeno y la temperatura fueron registrados con Oxímetro YSI 55 ($\pm 0,01$ mg L⁻¹; $\pm 0,1$ °C).

Extracción de la hemolinfa: Después de 30 días de exposición de los camarones a cada salinidad de prueba y seleccionando solo camarones en estados de muda C, según los criterios descritos por Reyes y Luján (2003), la hemolinfa (aproximadamente 100-150 µL por camarón) fue extraída del seno pericárdico utilizando jeringas descartables de 1 mL conteniendo solución Alsever como anticoagulante (Van de Braak, 2002).

Conteo de hemocitos: Para determinar el Número Total de Hemocitos (NTH), se midió 20 µL de hemolinfa y se adicionó a un microtubo (Eppendorf) conteniendo 80 µL de solución Alsever (Van de Brack, 2002). El conteo de hemocitos se hizo utilizando una cámara de Neubauer y un microscopio Leica DM LS2 de luz convencional de campo

luminoso provisto de contraste de fases. Para determinar el número de los hemocitos se utilizó la fórmula de Jussila (1997).

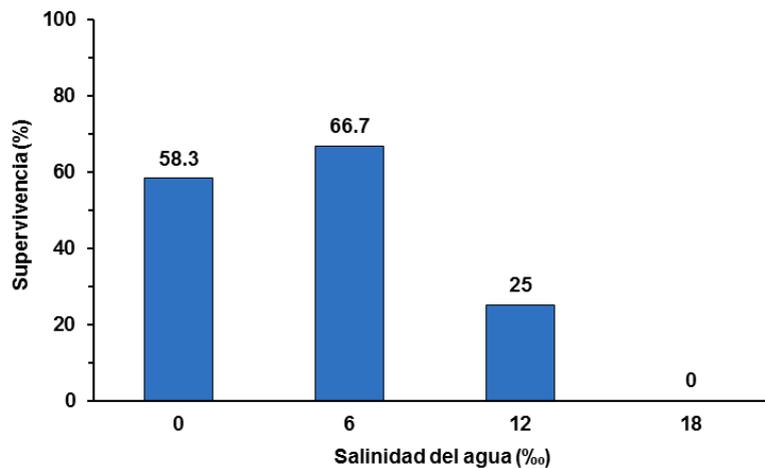
Concentración de oxihemocianina: Se empleó 20 μL de hemolinfa diluida en 80 μL de solución Alsever, cuya absorbancia fue medida a 335 nm (Espectrofotómetro Genesis 20) característico de la oxihemocianina (Cheng *y cols.*, 2001) y la concentración fue calculada usando un coeficiente de extinción de $\epsilon = 17,26$ calculada sobre la base de la subunidad funcional de 74 000 Da (Chen & Cheng, 1993).

Análisis estadístico: Los resultados de cada parámetro medido fueron analizados mediante análisis de varianza de una vía y con la prueba de Tukey, con un nivel de significancia del 5%, para lo cual se utilizó el programa SPSS 18 para Windows.

Resultados

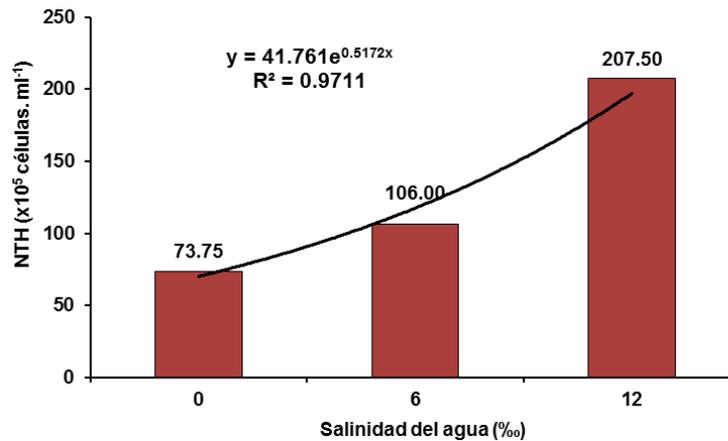
Supervivencia: Todas las hembras de camarón criadas en 18‰ de salinidad murieron después de ocho días de iniciado el experimento. La mayor supervivencia fueron obtenidas en salinidades de 6‰ ($66,7 \pm 23,6\%$) y en 0‰ ($58,3 \pm 11,8\%$) si diferencias significativas ($p > 0,05$), pero ambas fueron significativamente ($p < 0,05$) mayores que aquellas criadas en 12‰ de salinidad ($25,0 \pm 11,8\%$) (Fig. 1). Algunos camarones criados en 6‰ y 12‰ de salinidad presentaron el cuerpo de una coloración ligeramente rojiza.

Figura 1. Supervivencia de hembras de *C. caementarius* criadas en diferentes salinidades.



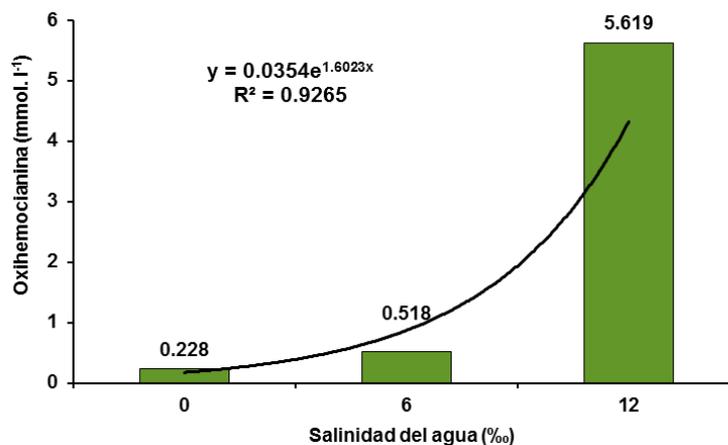
Número total de hemocitos: El NTH fue significativamente ($p < 0,05$) más alto en los camarones criados con 12‰ de salinidad ($207,50 \times 10^5 \pm 38,89 \times 10^5$ células mL^{-1}), en cambio con 6‰ ($106,00 \times 10^5 \pm 64,12 \times 10^5$ células mL^{-1}) y 0‰ ($73,75 \times 10^5 \pm 25,37 \times 10^5$ células mL^{-1}) no hubo diferencias significativas ($p > 0,05$). Además, el incremento del NTH en relación con el incremento de la salinidad fue exponencial con un R^2 de 0,9711 (Fig. 2).

Figura 2. Número total de hemocitos (NTH) en hembras de *C. caementarius* criadas en diferentes salinidades.



Concentración de oxihemocianina: La oxihemocianina fue significativamente más alta en las hembras criadas a 12‰ ($5,619 \pm 4,735$ mmol L⁻¹), en cambio con 6‰ ($0,518 \pm 0,159$ mmol L⁻¹) y 0‰ ($0,228 \pm 0,237$ mmol L⁻¹) fueron bajas y no hubo diferencias significativas ($p > 0,05$) entre ellas. Además, el incremento de la concentración de oxihemocianina en relación con el incremento de la salinidad fue exponencial con un R^2 de 0,9265 (Fig. 3).

Figura 3. Concentración de oxihemocianina en hembras de *C. caementarius* criadas en diferentes salinidades.



Calidad del agua: La temperatura del agua varió uniformemente en todos los tratamientos, en cambio el oxígeno disuelto del agua tuvo una tendencia a disminuir con el incremento de salinidad (Tabla 1).

Tabla 1. Temperatura y oxígeno disuelto del agua de crianza de hembras de *Cryphiops caementarius* a diferentes salinidades. Entre paréntesis desviación estándar.

	Salinidad		
	0‰	6‰	12‰
Temperatura (°C)	21,43 ^a (± 0,40)	21,53 ^a (± 0,31)	21,33 ^a (± 0,31)
Oxígeno disuelto (mg L ⁻¹)	8,49 ^a (± 0,26)	8,02 ^a (± 0,21)	7,98 ^b (± 0,16)

Datos con letras en superíndices iguales en una misma fila indica que no hay diferencia estadística significativa ($p > 0,05$).

Discusión

El NTH de las hembras *C. caementarius* criadas en agua dulce fue de $73,75 \times 10^5$ células mL^{-1} la cual fue superior al reportado en la misma especie por Villanueva (2011) en ejemplares de 5 g ($39,70 \times 10^5$ células mL^{-1}), así como por Azañero *y cols.* (2006) pero con ejemplares pequeños de 1,33 g de peso ($25,50 \times 10^5$ células mL^{-1}), lo que sugiere que el tamaño de los ejemplares tendría alguna influencia en los valores obtenidos.

Sin embargo, el NTH de las hembras de *C. caementarius* criadas en la salinidad 12‰ ($207,50 \times 10^5$ células mL^{-1}) corresponde a dos veces el obtenido a 6‰ (106×10^5 células mL^{-1}) y casi tres veces el obtenido en agua dulce ($73,75 \times 10^5$ células mL^{-1}), lo cual sugiere que la salinidad tendría un profundo efecto sobre la proliferación de hemocitos de la especie y es probable que se relacione con el incremento de la inmunidad como sucede en otros crustáceos. En *M. rosenbergii* se ha observado un incremento significativo del NTH de 70×10^5 células mL^{-1} en individuos criados a 0‰ de salinidad, hasta 130×10^5 células mL^{-1} a 15‰ (Cheng & Chen, 2000) y además, se reporta elevada actividad fagocítica a salinidades entre 5‰ y 10‰, con respecto a aquellos criados en 0‰ y 15‰ (Cheng *y cols.*, 2003b). Terwilliger (2007) determina que la acumulación de hemocitos en las branquias de *Carcinus maenas* es una característica específica de la respuesta inmune ante partículas y patógenos. Le Moullac *y cols.* (1998) encuentran que el incremento del NTH en *Penaeus stylirostris* lleva a una resistencia a las enfermedades.

Además, este incremento exponencial del NTH en relación al incremento de la salinidad del agua sería indicador no solo de la tolerancia de la especie a esa condición ambiental sino de una respuesta de las hembras a la preparación para enfrentar un inminente estrés osmótico dado a su comportamiento de buscar las partes bajas de los ríos para reproducirse. Aunque no se conoce el punto isosmótico de *C. caementarius*, pero considerando a una especie cercana como *M. rosenbergii* cuyo punto isosmótico es de 424 mOsm kg^{-1} que equivale a 14‰ (Cheng *y cols.*, 2003a), las hembras de *C. caementarius* criadas en la salinidad de 12‰ gastarían menos energía en osmorregulación y por consiguiente estarían derivando energía para la producción de hemocitos.

Las hembras de *C. caementarius* criadas en agua dulce (Control) tuvieron una concentración de oxihemocianina de $0,228 \text{ mmol L}^{-1}$, cercano a lo reportado por Villanueva (2011) para hembras de la misma especie ($0,297 \text{ mmol L}^{-1}$), evaluadas en estado C del ciclo de muda y en similares condiciones de crianza, lo que sugiere que estos valores serían propios de la especie siendo bajos en relación con otras especies de crustáceos. Así, en hembras de *M. rosenbergii* la oxihemocianina es de $1,82 \text{ mmol L}^{-1}$ en estados de muda C y Do y de $2,01 \text{ mmol L}^{-1}$ en D₁ (Cheng *y cols.*, 2001). En *Scylla serrata* la oxihemocianina es de $0,66$ y $0,69 \text{ mmol L}^{-1}$ en hembras y machos, respectivamente (Chen & Chia, 1997).

En la salinidad de 12‰ la concentración de oxihemocianina ($5,619 \text{ mmol L}^{-1}$) de las hembras de *C. caementarius* fue diez veces mayor que a 6‰ ($0,518 \text{ mmol L}^{-1}$) y veinticinco veces más alto que a 0‰ ($0,228 \text{ mmol L}^{-1}$). Desde que las condiciones de alimentación y del ciclo de muda (estado C) de las hembras fueron las mismas en todos los tratamientos, no se puede atribuir la variación de la oxihemocianina a esas condiciones como es sugerido por Cheng *y cols.* (2001). Por consiguiente, el incremento exponencial de oxihemocianina en la hemolinfa en relación con el incremento de la salinidad observado en nuestros resultados, indicarían que las hembras al no gastar energía para osmorregular la utilizarían también para formar

pigmentos respiratorios, lo cual además probablemente esté relacionado con la disminución del oxígeno del agua en salinidad alta y la dificultad de las branquias para captar oxígeno. En *M. rosenbergii* la condición de hipoxia ocasiona una significativa elevación de la oxihemocianina (Chen & Kou, 1998) y hay hiperventilación para facilitar la captación de oxígeno e incrementar la capacidad de conducir oxígeno (Cheng y cols., 2003c). Además de ello, las hembras evaluadas al final del experimento, estuvieron en proceso de maduración y en ésta condición es probable que haya formación de una hemocianina específica de hembras relacionada con el proceso reproductivo como lo reportado en hembras de *S. olivacea* (Chen y cols., 2007). Estas observaciones sugieren que ante una elevación de la salinidad del agua las hembras de *C. caementarius* estarían capacitadas para extraer eficientemente el oxígeno del agua.

Si bien hubo un incremento exponencial significativo del NTH y de la concentración de oxihemocianina en relación al incremento de salinidad, la supervivencia a concentraciones de 12‰ fue significativamente baja (25%), lo que indicaría que en ésta salinidad ya se observan alteraciones fisiológicas, pues en salinidad de 18‰ todas las hembras murieron después de ocho días de iniciado el experimento. Nuestros resultados difieren de los reportados por Rodríguez y cols. (1991) con el camarón de río *Atya scabra* que no tuvo problemas con los fuertes cambios a salinidades entre 5‰ y 21‰. Esto sugiere que las hembras de nuestra especie, aun cuando se concentran en las partes bajas del río para reproducirse, no resisten salinidades de 18‰ por largo período; en cambio sí toleran salinidades entre 6‰ y 12‰, pero algunas adquirieron una coloración rojiza en el cuerpo y la hemolinfa, lo que podría ser signo de debilidad y de estrés, como lo reportado en *Farfantepenaeus paulensis* cultivado en salinidades de 22‰ y 13‰ (Perazzolo y cols., 2002).

Los resultados permiten inferir que el incremento de la salinidad del agua de crianza de hembras de *C. caementarius* induce a un incremento del número total de hemocitos y de la concentración de oxihemocianina; sin embargo, elevada salinidad afecta la supervivencia y esto indicaría situaciones de estrés. Es conveniente evaluar otros parámetros hemocitológicos en similares condiciones de crianza.

Bibliografía

1. Amaya J. & A. Guerra. 1976. Especies de camarones de los ríos norteños del Perú y su distribución. Ministerio de Pesquería. Dirección General Investigaciones Científicas y Tecnológicas. Lima. Perú. 29 p.
2. Azañero C.A., W.E. Reyes, H. Luján, R. Rodríguez & F. Saucedo. 2006. Caracterización hemocitaria del camarón de río *Cryphiops caementarius* Molina, 1872 (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae) del río Lacramarca (Provincia del Santa, Departamento de Ancash, Perú). Comunicación Científica en el IV Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura. CIVA 2006: 774-781. Disponible en URL: <http://www.civa2006.org>
3. Bachère E. 2000. Shrimp immunity and disease control. *Aquaculture*, 191: 3 – 11.
4. Chen J.C. & S-Y Cheng. 1993. Hemolymph PCO₂, hemocyanin, protein level and urea excretions of *Penaeus monodon* exposed to ambient ammonia. *Aquat. Toxicol.*, 27: 281-292.
5. Chen J.C. & P.G. Chia. 1997. Oxyhemocyanin, protein, osmolality and electrolyte the hemolymph of *Scylla serrata* in relation to size cycle. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 217: 93-105.
6. Chen J.C. & T.S. Kou. 1998. Hemolymph acid-base balance, oxyhemocyanin and protein levels of *Macrobrachium rosenbergii* at different concentrations of dissolved oxygen. *Journal of Crustacean Biology*, 18(3): 437-441.

7. Chen H.Y., S.H. Ho, T.I. Chen, K. Soong, I.M. Chen & J.H. Cheng. 2007. Identification of a Female-Specific Hemocyanin in the Mud Crab, *Scylla olivacea* (Crustacea: Portunidae). *Zoological Studies*, 46(2): 194-202.
8. Cheng W. & J.H. Chen. 2000. Effects of pH, temperature and salinity on immune parameters of the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Fish & Shellfish Immunology*, 10: 387-391.
9. Cheng W., C.H. Liu, C.H. Chen & J.C. Chen. 2001. Hemolymph oxyhemocyanin, protein, osmolality and electrolyte levels of *Macrobrachium rosenbergii* in relation to size and molt stage. *Aquaculture*, 198: 387-400.
10. Cheng W., C.H. Liu, J.P. Hsu & J.C. Chen. 2002. Effect of hypoxia on the immune response of giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* and its susceptibility to pathogen *Enterococcus*. *Fish & Shellfish Immunology*, 13: 351-365.
11. Cheng W., C.H. Liu, C.H. Cheng & J. Chen. 2003a. Osmolality and ion balance in giant river prawn *Macrobrachium rosenbergii* subjected to changes in salinity: role of sex. *Aquaculture Research*, 34: 555-560.
12. Cheng W., S.M. Cheng, F.I. Wang, P.I. Hsu, C.H. Liu & J.C. Chen. 2003b. Effect of temperature, pH, salinity and ammonia on the phagocytic activity and clearance efficiency of giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* to *Lactococcus garvieae*. *Aquaculture*, 219: 111-121.
13. Cheng W., C.H. Liu & C.M. Kuo. 2003c. Effects of dissolved oxygen on hemolymph parameters of freshwater giant prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). *Aquaculture*, 220: 843-856.
14. Cornejo, J.J.L. & L.I. Pérez. 2013. Efecto de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y sus derivados en la dieta, en la proliferación de hemocitos en adultos de camarón de río *Cryphiops caementarius* en condiciones de laboratorio. Tesis Título. Universidad Nacional del Santa, Ancash. Perú.
15. Fingerman M. 1997. Crustacean endocrinology: a retrospective, prospective and introspective analysis. *Physiol. Zool.*, 70(3): 257-269.
16. Goimier Y., C. Pascual, A. Sánchez, G. Gaxiola, A. Sánchez & C. Rosas. 2006. Relation between reproductive, physiological and immunological condition of *Litopenaeus setiferus* pre-adult males fed different dietary protein levels (Crustacea; Penaeidae). *Animal Reproduction Science*, 92: 193-208.
17. Henning O., T. Itami, M. Maeda, M. Kondo, Y. Natsukari & Y. Takahashi. 1998. Analyses of haemolymph immune-parameters in kuruma shrimp infected with penaeid rod-shaped DNA virus. *Fish Pathol.*, 33(4): 389-393.
18. Jara C.G. Antecedentes sobre el desarrollo de la carcinología en Chile. *Invest. Mar., Valparaíso*. 1997; 25: 245-254.
19. Jussila J. 1997. Physiological responses of astacid and parastacid crayfishes (Crustacea: Decapoda) to conditions of intensive culture. Doctoral dissertation. Department of Applied Zoology & Veterinary Medicine. University of Kuopio. Perth, Western Australia.
20. Le Moullac G., C. Soyez, D. Saulnier, D. Ansquer, J. Avarre, & P. Levy. 1998. Effect of hypoxia stress on the immune response and the resistance to vibriosis of the shrimp *Penaeus stylirostris*. *Fish & Shellfish Immunol.*, 8: 621-629.
21. Le Moullac G. & P. Haffner. 2000. Environmental factors affecting immune responses in Crustacea. *Aquaculture*, 192 : 121-131.
22. Liu C.H. & J.C. Chen. 2004. Effect of ammonia on the immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus*. *Fish & Shellfish Immunology*, 16: 321-334.
23. Meruane J., M. Rivera, C. Morales, C. Galleguillos & H. Hosokawa. 2006. Producción de juveniles en condiciones de laboratorio del camarón de río *Cryphiops caementarius* (Decapoda: Palaemonidae) en Coquimbo, Chile. *Guyana*. 70(2): 228-236.

24. Mogollón A.V. 2013. Cocultivo de machos del camarón de río *Cryphiops caementarius* en recipientes individuales dentro de acuarios con machos de tilapia *Oreochromis niloticus* a diferentes densidades de siembra y sus efectos en el crecimiento y supervivencia de las especies. Tesis Bachiller. Universidad Nacional del Santa, Perú.
25. Morales M.C. 1997. Desarrollo larval del camarón de río *Cryphiops caementarius* (Molina, 1782) (Crustacea, Decapoda) en laboratorio. Tesis. Universidad Católica del Norte, Coquimbo Chile.
26. Pascual C., E. Zenteno, C. Gerard, A. Sánchez, G. Gaxiola, G.Taboada, J. Suarez, T. Maldonado & C. Rosas. 2004. *Litopenaeus vannamei* juveniles energetic balance and immunological response to dietary protein. *Aquaculture*, 236: 431-450.
27. Pascual C., A. Sánchez, E. Zenteno, G. Cuzon, G. Gaxiola, R. Brito, R. Gelabert, E. Hidalgo & C. Rosas. 2006. Biochemical, physiological and immunological changes during starvation in juveniles of *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 251: 416-429.
28. Perazzolo L., R. Gargioni, P. Ogliari & M. Barraco. 2002. Evaluation of some hematoimmunological parameters in the shrimp *Farfantepenaeus paulensis* submitted to environmental and physiological stress. *Aquaculture*, 214:19-33.
29. Produce. 2013. Anuario estadístico pesquero y acuícola 2012. Ministerio de la Producción. Perú. Disponible en: <http://www.produce.gob.pe/images/stories/Repositorio/estadistica/anuario/anuario-estadistico-pesca-2012.pdf>.
30. Rendón L. & J.L. Balcázar. 2003. Inmunología de camarones: conceptos básicos y recientes avances. *Revista AquaTIC* 19: 27-33. Disponible en URL: <http://www.revistaaquatic.com/aquatic/art.asp?t=p&c=158>.
31. Reyes W. & H. Luján. 2003. Estados y subestados del ciclo de muda del camarón de río (*Cryphiops caementarius* Molina, 1872) (Crustacea Decapoda Palaemonidae). Comunicación Científica en el II Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura. CIVA 2003: 808-817. Disponible en URL: <http://www.civa2003.org>.
32. Reyes W., S. Bacilio, M. Villavicencio & R. Mendoza. 2006. Efecto de la salinidad en el crecimiento y supervivencia de postlarvas del camarón de río *Cryphiops caementarius* Molina, 1872 (Crustacea, Decapoda, Palaemonidae), en laboratorio. Comunicación Científica en el IV Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura. CIVA 2006: 808-817. Disponible en URL: <http://www.civa2006.org>.
33. Reyes W.E. 2012. Crecimiento y supervivencia de adultos del camarón de río *Cryphiops caementarius* criados en sistema de recipientes individuales con recirculación de agua. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de Trujillo, Perú.
34. Rodríguez J., R. Cedeño, C. Molina, V. Otero, E. Valenzuela & M. Sotomayor. 2000. Efecto de la calidad de la dieta sobre la respuesta inmune del camarón *Penaeus vannamei*, In: Cruz-Suarez, L., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Olvera-Novoa, M., R. Olvera-Cerecedo (Eds). Avances en Nutrición Acuícola. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 19 - 22 noviembre, 2000- Mérida. Yucatán, México.
35. Rodríguez, J. & G. Le Moullac. 2000. State of the art of immunological tools and health control of penaeid shrimp. *Aquaculture*, 191: 109-119.
36. Rodríguez J., A. Marcano & L. Marcano. 1991. Tolerancia a la salinidad del camarón de río *Atya scabra* (Leach - 1815). *Zootec. Trop.*, 9(2): 195-205.
37. Sánchez A., C. Pascual, A. Sánchez, F. Vargas-Albores, G. Le Moullac & C. Rosas. 2001. Hemolymph metabolic variables and immune response in *Litopenaeus setiferus* adult males: the effect of acclimation. *Aquaculture*, 198: 13-28.

38. Sung H., Y. Yang & Y. Song. 1996. Enhancement of microbicid activity in the tiger shrimp *Penaeus monodon* via immunostimulation. *J. Crustacean Biology*, 16(2): 278-284.
39. Terwilliger N.B. 2007. Hemocyanin and the immune response: defense against the dark arts. *Integrative and Comparative Biology*, 47(4): 662-665.
40. Van de Braak K. 2002. Haemocytic defence in black shrimp (*Penaeus monodon*). Tesis PhD. Wageningen Institute of animal science, the Netherlands.
41. Vargas-Albores, F. & G. Yepiz-Plascencia. 2000. Beta glucan binding protein and its role in shrimp immune response. *Aquaculture*, 191: 13-21.
42. Vásquez L., C. Sierra, S. Juárez, C. Agundis, A. Zavala & E. Zenteno. 1998. Mecanismos de inmunidad en crustáceos. *Interciencia*, 23(6): 344-348.
43. Verghese B., E.V. Radhakrishnan & A. Padhi. 2007. Effect of environmental parameters on immune response of the Indian spiny lobster, *Panulirus homarus* (Linnaeus, 1758). *Fish & Shellfish Immunology*, 23: 928-936.
44. Viacava M., R. Aitken & J. Llanos. 1978. Estudio del camarón en el Perú 1975-1976. *Bol Inst. Mar del Perú*, 3(5): 161-233.
45. Villanueva O. 2011. Efecto del nivel de proteína dietaria sobre la respuesta inmunológica, ganancia en peso y supervivencia de *Cryphiops caementarius*, en condiciones de laboratorio. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de Trujillo. Perú.
46. Wang L-O. & J-C. Chen. 2005. The immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus* at different salinity levels. *Fish & Shellfish Immunology*, 18: 269-278.
47. Yaemsooksawat N., O. Jintasataporn, N. Areechon, S. Puntuma & Ch. Thongtuak. 2009. Effect of dietary protein level on growth and immunity of *Litopenaeus vannamei*, Boone 1931. *Songklanakarin J. Sci. Technol.*, 31(1): 15-20.
48. Yeh S.P., T.G. Sung, C.C. Chang, W. Cheng & C.M. Kuo. 2005. Effects of an organophosphorus insecticide, trichlorfon, on hematological parameters of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (De Man). *Aquaculture*, 243: 383-392.
49. Zacarías S. & V. Yépez. 2008. Monitoreo poblacional del camarón de río. Estimación de abundancia de adultos en ríos de la costa centro sur. Informe anual 2007. Instituto del Mar del Perú. 33 p.