

**Número total de hemocitos en camarones progenitores de San Blas, Nayarit, contabilizados con cámara Neubauer y con citometría de flujo en diferente fase lunar**

**Total number of hemocytes in progenitor shrimp from San Blas, Nayarit, counted with a Neubauer chamber and with flow cytometry in a different lunar phase**

Bautista-Covarrubias, Juan Carlos<sup>1</sup>, Peraza Gómez, Viridiana<sup>1</sup>, Apreza Burgos, Elizabeth<sup>2</sup>, Zamora Ibarra, Patricia Anely<sup>2</sup>, Jaime Carrillo, Ildefonso<sup>3</sup>.

<sup>1</sup>Unidad Académica de Escuela Nacional de Ingeniería Pesquera, <sup>2</sup>Unidad Académica de Agricultura, Licenciatura en Biología. <sup>3</sup>Laboratorio de larvas de camarón Acuicultura Integral S.A. de C.V.

Recibido: 06 de mayo de 2019

Aceptado: 17 de junio de 2019

**RESUMEN**

Se contabilizaron los hemocitos de camarones progenitores de un laboratorio de producción de larvas en San Blas, Nayarit, diez muestreos de hemolinfa fueron realizados durante las fases lunares de cuarto creciente, luna llena, cuarto menguante y luna nueva. El tiempo de coagulación de hemolinfa fue determinado, el conteo total y diferencia de hemocitos (CTH y CDH) con cámara Neubauer y por citometría de flujo. Los resultados demuestran que el tiempo de coagulación fue mayor en la hemolinfa colectada en luna llena, mientras que la mayor presencia de hemocitos determinados con los dos métodos, coincidieron en la hemolinfa de progenitores de la muestra en luna llena. Los hemocitos semigranulosos (SG) y granuloso (G) en muestras de hemolinfa en cuarto menguante fueron significativamente diferentes ( $P < 0.05$ ) a los valores promedios encontrados en la hemolinfa colectada en las diferentes fases de luna analizadas. Respecto a los hemocitos hialinos (H), el mayor porcentaje se presentó en la hemolinfa colectada de progenitores en la fase de luna nueva. Finalmente, se puede concluir que en las fases lunares el com-

portamiento de hemocitos fue variable, y la variabilidad no puede ser atribuible a condiciones de estrés ambiental.

**Palabras clave:** hemocitos, fases lunares, camarón, Neubauer, citometria

**ABSTRACT**

The hemocytes of progenitor shrimps from a larvae production laboratory in San Blas Nayarit were counted, ten hemolymph samples were taken during the lunar phases of waxing crescent, full moon, quarter waning and new moon. The coagulation time of hemolymph was determined, the total count and difference of hemocytes (CTH and CDH) with Neubauer chamber and by flow cytometry. The results show that the coagulation time was longer in the hemolymph collected at full moon, while the greater presence of hemocytes determined with the two methods coincided in the hemolymph of progenitors of the full moon sample. Semi-granular (SG) and granular hemocytes (G) in waning quarter hemolymph samples were significantly different ( $P < 0.05$ ) from the average values found in the haemolymph collected in the different phases of the moon analyzed. Regarding hyalines hemocytes (H), the highest percentage occurred in the hemolymph collected from progenitor shrimps in the new moon phase. Finally, it can be concluded that in the lunar phases influenced the variability of hemocytes and the variability can not be attributed to conditions of environmental stress.

**Key words:** hemocytes, lunar phases, shrimp, Neubauer, cytometry

**INTRODUCCIÓN**

Uno de los cultivos de la acuicultura de mayor demanda es el camarón y México es un país notable en cuanto a la producción de este crustáceo, la especie más cultivada es el camarón blanco *Penaeus vannamei* (Ponce *et al.*, 2006). El cultivo a gran escala en México inició durante la década de los años 80, basado en el cultivo del camarón azul del Pacífico (*Litopenaeus stylirostris*), pero en 1998 las granjas se vieron gravemente afectadas por el síndrome del virus de taura (TSV), por lo cual la industria sustituyó la especie de camarón

azul por el camarón blanco (*Penaeus vannamei*), por ser más tolerante a microorganismos patógenos (SAGARPA, 2009). Además de las infecciones por bacterias y virus (Bachère, 2000) estos crustáceos en condiciones de cultivo también tienen que enfrentar la contaminación causada por plaguicidas y metales pesados, pues muchos de los sistemas en los que se cultivan son abastecidos de agua por ríos y estuarios, que contienen residuos de sustancias químicas derivadas de diversas actividades antropogénicas (Sabu y Gopal, 2016; García Hernández *et al.*, 2018).

Los crustáceos como el resto de los invertebrados, cuentan con un sistema inmune innato, en el que la primera barrera de defensa es el exoesqueleto, que sirve para hacer frente a todos los microorganismos y agentes patógenos (Söderhäll y Cerenius, 1992). Los componentes celulares, como los hemocitos se encargan de eliminar materiales exógenos mediante fagocitosis, encapsulación y formación de nódulos (Rendón y Balcazar, 2003; Qiu *et al.*, 2011) y los componentes humorales son todas aquellas sustancias que se encuentran reservadas dentro de estas células, como proteínas anticoagulantes, péptidos antimicrobianos, inhibidores y enzimas entre las que se encuentra la fenoloxidasa (Holmblad y Söderhäll, 1999; Jiravanichpaisal *et al.*, 2006).

Los diferentes tipos de hemocitos de los crustáceos se caracterizan bajo ciertos criterios, una de las clasificaciones más comunes es proporcionada en base a su morfología debido a la presencia o ausencia de gránulos dispersos en el citoplasma así como por el tamaño de la célula, bajo esta clasificación se reconocen tres tipos de hemocitos; los hialinos, semigranulosos y granulosos (Johansson *et al.*, 2000; Battison *et al.*, 2003, Kakoolaki *et al.*, 2010; Xian *et al.*, 2017).

Las reacciones celulares de los hemocitos hacen parte del mecanismo de defensa, y son las responsables de un amplio número de reacciones. Por tanto, su concentración cambia con el estado de salud y depende de la exposición a distintos patógenos y sustancias químicas. Su función incluye una variedad de procesos (transporte, sín-

tesis de pigmentos, coagulación, reparación de heridas, reposición de la cutícula y protección a infecciones ocasionadas por bacterias), y dado que cada uno de estos procesos requiere de hemocitos, una disminución de su número total y de la consiguiente liberación de fenoloxidasa puede afectar el mecanismo de defensa celular.

Existen referencias de la influencia de los ciclos lunares en los procesos fisiológicos en el camarón, Araujo (2000) realizó un estudio en camarones de lagunas de producción, analizando la textura del exoesqueleto durante cada fase lunar para determinar la retención de sulfitos. Molina *et al.* (2000) relacionaron el proceso de ecdisis con las fases lunares, encontrando que el 80% de los organismos sincronizan la muda con la fase de luna nueva, además hay evidencias de que en periodos cercanos a la ecdisis estos organismos pueden disminuir o cesar el consumo de alimento (O'Halloran y O'Dor, 1988; Shin y Chin, 1994; Cadena, 2000). Robertson *et al.* (1987) señalan la importancia que hay en determinar la periodicidad de ciertos procesos fisiológicos como la muda, para dar un mejor manejo al cultivo de camarón.

En el conteo tradicional con cámara Neubauer se reporta una amplia variabilidad sobre el número total de hemocitos para diferentes especies, entre los  $3-6 \times 10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$  en *Litopenaeus vannamei* del grupo control (Bautista-Covarrubias *et al.*, 2015) a  $11 \times 10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$  reportadas para *Penaeus californiensis* (Martin y Graves, 1985), hasta un valor máximo de  $5.3 \times 10^9$  células  $\text{mL}^{-1}$  registrado en *Fenneropenaeus indicus* por Kakoolaki *et al.* (2010).

En los crustáceos, el número de hemocitos refleja el estado de salud, y cambios en su concentración reflejan una variación de la susceptibilidad a enfermedades causada por factores estresantes (Rendón y Balcázar, 2003). Por otra parte, las variaciones en el número de hemocitos pueden ser debidas al tipo y a la concentración del contaminante utilizado, al tiempo de exposición y a la especie de organismo utilizada (Yeh *et al.*, 2004).

Actualmente la citometría de flujo ha sido reconocida como un método sensitivo y eficiente para cuantificar el número de hemocitos y evaluar la respuesta en invertebrados cuando se estimula una respuesta inmunológica (Cárdenas *et al.*, 2000). También con citometría de flujo se puede identificar morfología celular, fagocitosis, estallido respiratorio y actividad mitocondrial (Sun *et al.*, 2010). Sin embargo, el método tradicional para contabilizar el número total de hemocitos ha sido la cámara de Neubauer y el uso de microscopio, además con el uso de cámara Neubauer se ha demostrado que el número de células de *P. japonicus* es variable en función del sexo del organismo y del estadio de muda donde se encuentre (Sequeira *et al.*, 1995).

Es posible que las fases lunares puedan influir en la fisiología de los progenitores utilizados para la reproducción y obtención de larvas, a pesar de que se mantengan bajo condiciones favorables de alimentación, espacio y de calidad de agua, el número de hemocitos puede disminuir o aumentar en función del ciclo lunar, por lo tanto en el presente estudio, el objetivo fue el conocer el número total y diferencial de células en camarones progenitores mediante uso de cámara de Neubauer y con equipo de citometria de flujo.

## MATERIAL MÉTODOS

La hemolinfa de 40 organismos utilizados para el conteo total y diferencial de hemocitos fue donada por el propietario del Laboratorio de larvas de camarón Acuacultura Integral S.A. de C.V., localizado en el municipio de San Blas Nayarit. El muestreo de la hemolinfa se realizó durante los meses de septiembre y octubre, correspondiente a cuarto creciente, luna llena, cuarto menguante y luna nueva.

### Extracción de hemolinfa

La muestra de hemolinfa se tomó con una jeringa para insulina de 1mL que se insertó en la parte dorsal del camarón entre el cefalotórax y el primer segmento abdominal. Posteriormente se extrajo una muestra de 100  $\mu$ L de hemolinfa, que fue colocada en un trozo de papel parafilm sobre una ca-

ma de hielo a 4 °C.

### Tiempo de coagulación

De la hemolinfa colocada en cama de hielo se tomaron 20  $\mu$ L que fueron colocados en a un microtubo capilar para hematocrito de 1.55 mm de diámetro (Marca Brand SD) que se invirtió repetidamente. El tiempo de coagulación se contabilizó a partir del momento de inserción de la aguja hasta cuando la hemolinfa dejó de fluir en el microtubo (Jussila *et al.*, 2001).

### Fijación de hemocitos

El resto de la hemolinfa (80  $\mu$ L) fueron vertidos en un microtubo eppendorf (capacidad 2 mL) en el cual se mezcló con un volumen igual de anticoagulante (27 mM citrato trisódico, 385 mM cloruro de sodio, 115 mM glucosa, pH 6.6) (Huang *et al.*, 2010), de esta muestra se extrajo una submuestra de 50  $\mu$ L y se fijó con igual volumen de formalina (formalina al 37%, 0.45 M de NaCl) para el recuento total y diferencial de hemocitos.

### Conteo con cámara Neubauer

El conteo total de hemocitos (CTH) se realizó con un microscopio óptico; se mezclaron 50  $\mu$ L de hemolinfa con anticoagulante (Costa *et al.*, 2009). Los conteos se realizaron utilizando el objetivo a 400X, en una cámara Neubauer, cinco cuadrantes fueron contabilizados de acuerdo a lo establecido por Arredondo y Voltolina (2007).

Para el conteo diferencial de hemocitos (CDH) fueron utilizados 20  $\mu$ L de hemolinfa fijada y observada en cámara Neubauer a 400X. Se contabilizaron las primeras 200 células en función de su tamaño y morfología y se obtuvo el porcentaje correspondiente.

### Conteo con citómetro de flujo

El conteo por medio de citometría de flujo se realizó tomando 50  $\mu$ L de hemolinfa previamente fijada en formol; solo cinco muestras tomadas al azar por fase lunar fueron analizadas. La submuestra fue colocada en el citómetro de flujo (BD Accuri modelo C6), con base en la lectura realizada por el citómetro se realizó el cálculo correspondiente para conocer el número de células por mililitro.

### Análisis estadístico

Los valores del tiempo de coagulación y el número de hemocitos fueron analizados mediante prueba de normalidad y homocedasticidad (Kolmogorov-Smirnov y Bartlett's) y se realizaron ANOVA de una vía. Cuando los supuestos estadísticos no se cumplieron se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis, cuando se evidenciaron diferencias significativas, la prueba de comparación de Tukey fue utilizada, todas las pruebas fueron realizadas con un  $\alpha = 0.05$ .

### RESULTADOS

El tiempo promedio mayor de coagulación de la hemolinfa se presentó en progenitores del muestreo de luna llena, mientras que el valor más bajo se obtuvo en hemolinfa de progenitores del muestreo de cuarto menguante, lo que representó 1.7 veces menor que el tiempo de los camarones obtenidos en luna llena. El análisis estadístico realizado (ANOVA una vía) determinó diferencias significativas ( $P=0.04$ ) entre los valores de tiempo de coagulación, para aislar las diferencias se realizó una comparación de a un nivel de significancia de 0.05, las diferencias significativas se muestran en la Figura 1.

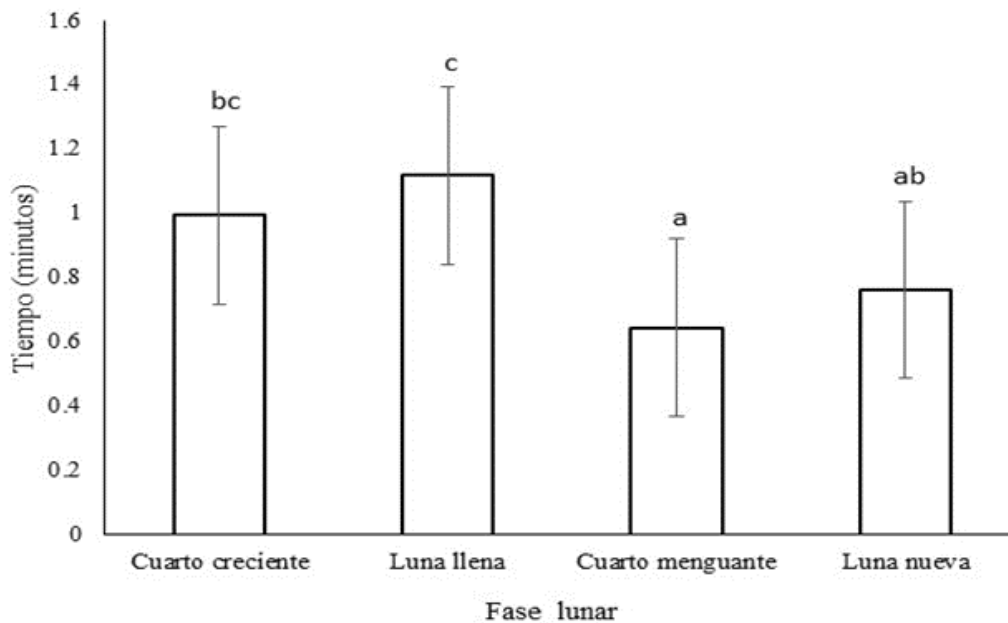


Figura 1. Tiempo promedio ( $\pm$  desviación estándar) de coagulación de la hemolinfa de progenitores de camarón en diferente fase lunar.

### Conteo total de hemocitos con cámara Neubauer

El mayor valor promedio de CTH fue en progenitores muestreados en la fase de luna llena ( $72 \times 10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$ ) y el valor menor fue en camarones del muestreo de luna nueva ( $27 \times 10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$ ), a pesar de que los valores promedio de células obtenidas en luna nueva repre-

senta 2.6 veces menor a lo obtenido en luna llena, no representó diferencias significativas ( $P=0.069$ ), la tendencia se muestra en la siguiente Figura 2

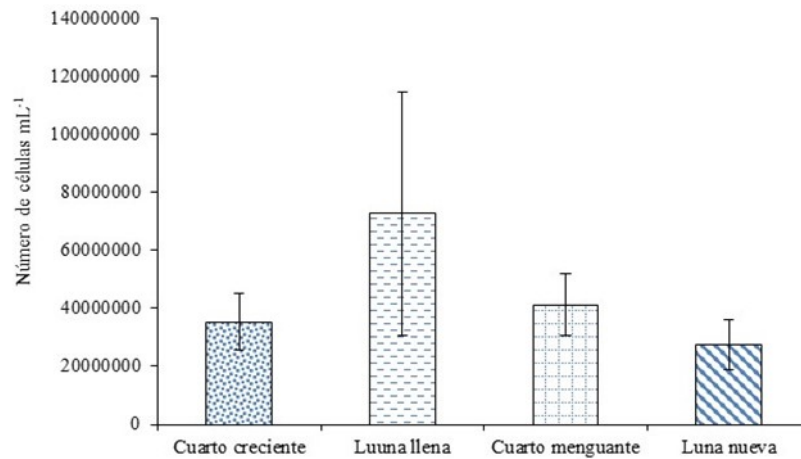


Figura 2. Valores promedio ( $\pm$ desviación estándar) de células de progenitores de camarón durante diferentes fases lunares y contabilizadas con cámara Neubauer.

### Conteo diferencial de hemocitos

Los porcentajes de los tres diferentes hemocitos contabilizados por el tamaño y presencia o no de gránulos fue mayor para hialinos (H), seguido de semigranulosos (SG) y los de menor número fueron los hemocitos granulosos (G) con 2.3%. Respecto al porcentaje promedios de hemocitos H de camarones del muestreo de cuarto menguante, el promedio fue menor y significativamente diferente ( $P < 0.05$ ) a los porcentajes promedios de H, de camarones de las diferentes fases lunares. El porcentaje de hemocitos SG fue significativamente

mayor en camarones de la fase de cuarto menguante que los porcentajes obtenidos en camarones de las diferentes fases lunares. De la misma manera que los SG, el mayor porcentaje de hemocitos G, se contabilizó en camarones de la fase lunar de cuarto menguante, el análisis estadístico aplicado logro determinar diferencias significativas con respecto a los promedios de hemocitos G obtenidos en camarones de luna nueva, cuarto creciente y luna llena (Tabla 1).

Tabla 1. Porcentajes promedio de hemocitos ( $\pm$  desviación estándar) de progenitores de camarón, encontrados con cámara Neubauer

Tipo de célula	Cuarto creciente	Luna llena	Cuarto menguante	Luna nueva
H	62.5 $\pm$ 11.3b	65.3 $\pm$ 5.3b	45.4 $\pm$ 11.4a	66.4 $\pm$ 4.7b
SG	33.3 $\pm$ 9.2a	32.3 $\pm$ 5.7a	46.5 $\pm$ 9.0b	31.3 $\pm$ 5.2a
G	4.2 $\pm$ 2.7a	2.4 $\pm$ 0.8a	8.1 $\pm$ 2.5b	2.3 $\pm$ 1.5a

ANOVA una vía por tipo de célula, comparación de promedios Tukey ( $P < 0.05$ ). a<b



**Conteo total de hemocitos con citómetro de flujo**

El número de células contabilizadas por citometría de flujo arrojó como resultado una tendencia similar a lo contabilizado con cámara Neubauer, el valor mayor promedio y el valor de menor promedio de células, fueron contabilizados en la fase de luna llena y luna nueva respectivamente. Específicamente el conteo de células mediante citometría de flujo, los promedios de células en camarones muestreados en fase de luna llena fue  $22 \times 10^5$  células  $\text{mL}^{-1}$ , mientras que el menor valor fue en camarones analizados en la fase de luna

nueva ( $0.5 \times 10^5$  células  $\text{mL}^{-1}$ ). El número de células contabilizadas mediante citometría fueron menores que las contabilizadas con cámara Neubauer, el análisis estadístico realizado (Kruskal-Wallis) detectó diferencias significativas ( $P=0.001$ ) entre los valores obtenidos en cada una de las fases lunares, para aislar las diferencias se realizó una comparación de promedios mediante la prueba Tukey ( $P<0.05$ ). Las diferencias significativas en los promedios de células contabilizadas por citometría de flujo se muestran en la siguiente Figura 3.

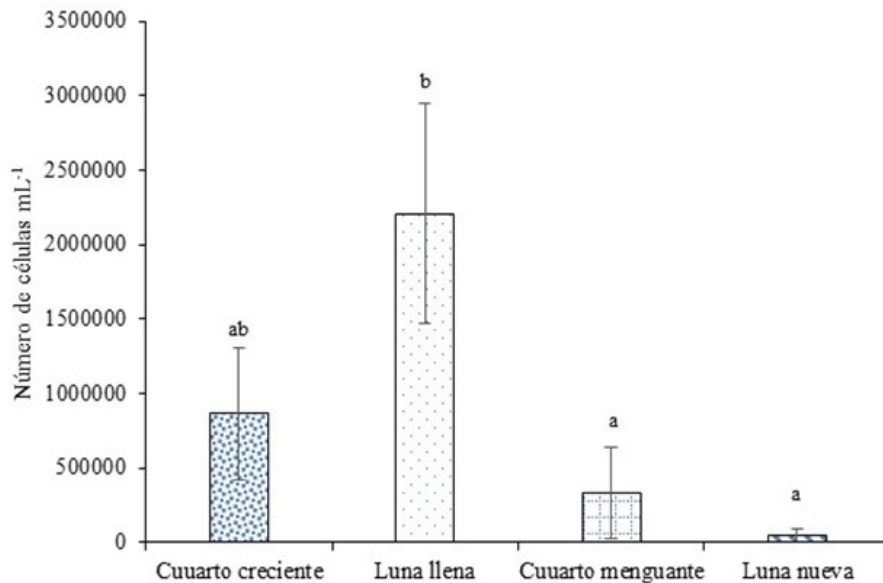


Figura 3. Valores promedio ( $\pm$ desviación estándar) de células totales de progenitores de camarón en diferente fase lunar.

$a \leq ab$ ,  $a < b$ .

Los hemogramas obtenidos representan comparativamente poblaciones de células en la hemolinfa de camarón colectado en la fase de cuarto menguante y luna llena, lo que representa diferencias significativas en la población de hemocitos obtenido mediante citometría de flujo (Figura 4).

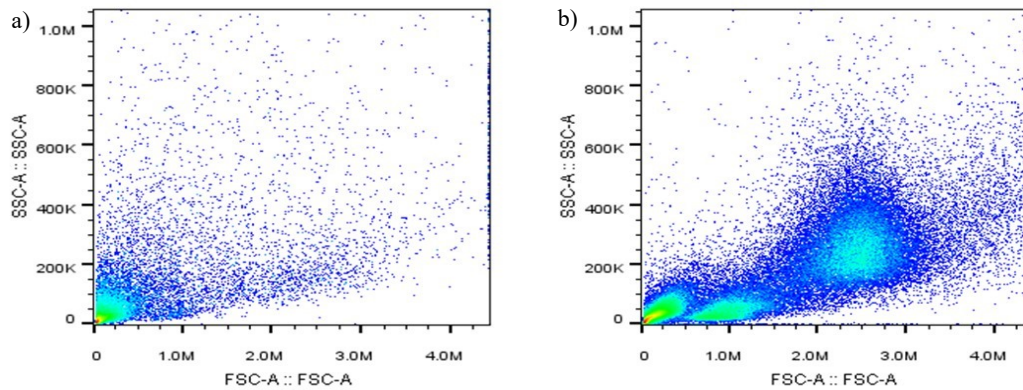


Figura 4. Hemogramas de hemocitos totales durante Cuarto menguante (a) y Luna llena (b). Eje "X" representa el tamaño de las células y el eje "Y" indica granularidad.

## DISCUSIÓN

El tiempo de coagulación de la hemolinfa de progenitores fue mayor en luna llena, se ha considerado que el incremento en el tiempo de coagulación puede ser usado como un indicador de estrés (Jussila *et al.*, 2001; Fotedar *et al.*, 2001), en juveniles de *Litopenaeus vannamei* se ha demostrado igualmente un incremento en el tiempo de coagulación por la exposición a concentraciones subletales de sulfato de cobre (Bautista-Covarrubias *et al.*, 2015). Los tiempos de coagulación de la hemolinfa en organismos en buen estado de salud se mantienen entre 30 y 40 segundos (Lightner y Readman, 1988), pero si la presencia de bacterias en la hemolinfa es abundante, aumenta el tiempo de coagulación. Por lo tanto, el tiempo de coagulación se puede usar como indicativo de salud y como criterio de evaluación de respuesta a una enfermedad (Yoganandhan *et al.*, 2003). A pesar de que el mayor tiempo promedio de coagulación ( $1.11 \pm 0.31$  minutos) se presentó en hemolinfa de progenitores del muestreo de luna llena, no se observó un síntoma de enfermedad.

La respuesta celular es un mecanismo de defensa de los crustáceos ante la presencia de microorganismos patógenos y también debido a la presencia de residuos tóxicos. Se ha referenciado que cambios en el número total de hemocitos circundantes

en la hemolinfa pueden ser debido a diversos factores, como el estrés fisiológico, la exposición a contaminantes (Kaoud y Rezk, 2011), cambios en la temperatura o en la salinidad (Wang y Chen, 2005; Fan *et al.*, 2013), además de la exposición a metales a nivel laboratorio (Lorenzon *et al.*, 2001), al tiempo de exposición y en función de la especie de crustáceos utilizada (Yeh *et al.*, 2004). Es necesario mencionar que el valor máximo y mínimo del total de células conatabilizadas con cámara Neubauer y por citometría de flujo coincide con las fases de luna llena y luna nueva, es posible mencionar que la variabilidad en el CTH en progenitores puede también estar influenciado por la fase lunar y el proceso de muda.

En el presente trabajo la diferenciación de células con microscopio, representó a los H en mayor porcentaje (66%), seguido de SG (46.5%) y G (8.1%). Rueda (2018) en un estudio en el que experimentó diferentes dietas vitaminadas para *Penaeus vannamei*, en su tratamiento control, coincide en que las células más abundantes son los hemocitos H ( $4.0 \pm 2.0 \times 10^7$ ), seguidos de los hemocitos SG ( $1.3 \pm 0.5 \times 10^7$ ) y finalmente los hemocitos G ( $1.2 \pm 0.2 \times 10^7$ ), mientras que Cárdenas *et al.* (2000), mediante citometría de flujo determinaron en *Procambarus zonangulus* la población de H (77.1%), SG (2.3%) y G (12.6%) cuando el organismo fue

expuesto a pared celular de hongos, lo cual pudiera representar la disminución de los hemocitos SG. Giulianini *et al.* (2007) han demostrado que todos los tipos de hemocitos aumentan en presencia de partículas extrañas pero en mayor cantidad las células del tipo granuloso, así como también los SG aumentan cuando *P. monodon* son expuestos a baja dosis de un estimulante estructuralmente similar al ARN de doble cadena, que está presente en algunos virus (Poly I:C) y generar a una alta dosis la producción de especies reactivas de oxígeno, de nitrógeno y producción de óxido nítrico (Xian *et al.*, 2018).

El hecho de que se observe un incremento en el número de hemocitos SG y G en ciertas fases lunares puede indicar que los organismos se encuentran bajo algún factor estresante y requiera mayor cantidad de este tipo de células, ya que tanto los hemocitos SG como los G son los que contienen en su interior el sistema proPO (Smith y Söderhäll, 1983; Chen *et al.*, 2014) el cual será activado para la eliminación de agentes exógenos.

El citómetro de flujo es una tecnología importante que permite identificar características de los hemocitos de camarón; tamaño, complejidad, fagocitosis, estallido respiratorio, actividad mitocondrial y viabilidad para evaluar los mecanismos de defensa y de modulación como respuesta del camarón a agentes patógenos y de estrés ambiental (Sun *et al.*, 2010). Considerando que las condiciones ambientales y de calidad de agua en la que se mantienen los progenitores son de condición favorable, fue determinado mediante citometría de flujo variabilidad en el número de células totales en hemolinfa colectada en cuarto menguante y luna llena. Mientras que Xian *et al.* (2011) mediante la citometría de flujo, encontraron decremento del número total de hemocitos en función del tiempo de exposición a nitrito, además determinaron que ocasionó daño al ADN y una sobreproducción de especies reactivas de

oxígeno (ROS) en *P. monodon*. Finalmente mencionar que la utilidad de la citometría de flujo es de gran importancia en la acuicultura, ya que permite identificar anomalías en el sistema de defensa del camarón, además de conocer en corto tiempo el estatus de salud de los organismos de cultivo.

## CONCLUSIÓN

En conclusión, el presente estudio demuestra que la variabilidad de hemocitos sucede en la hemolinfa de progenitores en función de las fases lunares, considerando sus condiciones favorables que se les mantiene en los estanques no puede ser una condición de estrés lo que ocasione tal efecto. Así mismo, se demostró que hay un incremento celular en el muestreo de hemolinfa en luna llena y una disminución en luna nueva determinado por los dos métodos empleados de CTH. A pesar de haber encontrado diferencias significativas en el tiempo de coagulación, esta no se relaciona con algún problema de presencia de bacterias o de estrés, más bien pudiera estar relacionado con el proceso de muda ya que el mayor tiempo de coagulación coincide con el muestreo de luna llena

## AGRADECIMIENTOS

Proyecto realizado con recursos provenientes del impuesto especial destinado a la UAN 2018 y con recurso del proyecto PRODEP: F-PRODEP-38/Rev-04 SEP-23-005.-UAN-EXB-277.

## REFERENCIAS

Araujo, M. (2000). El ciclo lunar y retención de sulfitos con relación a la textura del exoesqueleto en *Litopenaeus vannamei*. Universidad Zamorano. Proyecto especial del programa de Ingeniero Agrónomo. Honduras. 18 p.



- Arredondo, V. B. O. y Voltolina, D. (2007). Concentración, recuento celular y tasa de crecimiento. En: "Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal". Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. La Paz, B.C.S. México. 17-25 pp.
- Bachère, E. (2000). Shrimp immunity and disease control. *Aquaculture*, 191:3-11.
- Bautista-Covarrubias, Juan C., Martín G. Frías-Espericueta, Germán, J. Velarde-Montes, Domenico Voltolina, Luz M. García-de la Parra y Martín F. Soto Jiménez. (2015). Relationships between copper and stress indicators in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Marine & Freshwater Behaviour & Physiology*, 48 (3): 193-203
- Battison, A.; Cawthorn, R. y Horney, B. (2003). Classification of *Homarus americanus* hemocytes and the use of differential hemocyte counts in infected with *Aerococcus viridans* var. *homari* (Gaffkemia). *Journal of Invertebrate Pathology*. 84:3: 177-197.
- Cadena, E. (2000). Relación entre el ciclo de muda y la actividad de las enzimas digestivas y su efecto en la tasa de alimentación y el crecimiento del juvenil *Penaeus vannamei*. Tesis de grado. Facultad Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar.
- Cárdenas, W.; Jenkins, J. A. y Dankert†, J. R. (2000). A Flow Cytometric Approach to the Study of Crustacean Cellular Immunity. *Journal of Invertebrate Pathology*. 76: 112-119
- Costa, A.; Buglione, C.; Bezerra, F.; Martins, P. y Barracco, M. (2009). Immune assessment of farmreared *Penaeus vannamei* shrimp naturally infected by IMNV in NE Brazil. *Aquaculture*. 291(3): 141-146.
- Chen, Y. Y., Chen, J. C., Lin, Y.C., Yeh, S. T., Chao, K. P. y Lee, C. S. (2014). White Shrimp *Litopenaeus vannamei* that have received *Petalonia binghamiae* Extract Activate Immunity, Increase Immune Response and Resistance against *Vibrio alginolyticus*. *Journal Aquaculture Research & Development*. 5: 268 doi:10.4172/2155-9546.1000268
- Fan, L.; Wang, A. y Wu, Y. (2013). Comparative proteomic identification of the hemocyte response to cold stress in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Proteomics*. 80: 196-206.
- Fotedar, S., Tsvetnenko, E. y Evans, L. (2001). Effect of air exposure on the immune system of the rock lobster *Panulirus cygnus*. *Marine and Freshwater Research*. 52: 1351-1355.
- García Hernández, J., Leyva Morales, J.B., Martínez Rodríguez, M.E., Hernández Ochoa, M.I., Aldana Madrid, M.L., Rojas García, A.E., Betancourt Lozano, M., Perez Herrera, N.E., y Perera Rios, J.H. (2018). Estado actual de la investigación sobre plaguicidas en México. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 34 (Especial sobre Contaminación y Toxicología por Plaguicidas (CTP) 29-60, DOI: 10.20937/RICA.2018.34.esp01.03
- Giulianini, P. G., Bierti, M., Lorenzon, S., Battistella, S. y Ferrero, E. A. (2007). Ultrastructural and functional characterization of circulating hemocytes from the freshwater crayfish *Astacus leptodactylus*: cell types and their role after in vivo artificial non-self challenge. *Micron*. 38:49-57.
- Homblad, T. y Söderhäll, K. (1999). Cell adhesion molecules and antioxidative enzymes in a crustacean, possible role in immunity. *Aquaculture*. 172: 111-123.
- Huang, J., Yang, Y. y Wang, A. (2010). Reconsideration of phenoloxidase activity determination in white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish and Shellfish Immunology*. 28: 240-244.
- Jiravanichpaisal, P., Lee, B. L. y Söderhäll, K. (2006). Cell-mediated immunity in arthropods: hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. *Immunobiology*. 211(4):213-236.
- Johansson, M. W., Keyser, P., Sritunyalucksana, K. y Söderhäll, K. (2000). Crustacean haemocytes and haematopoiesis. *Aquaculture*. 191(1): 45-52.
- Jussila J, Mcbride S, Jago J y Evans LH. (2001). Hemolymph clotting time as an indicator of stress in western rock lobster (*Panulirus cygnus* George). *Aquaculture*, 199: 185-193.
- Kaoud, H.A. y Rezk, A. (2011). Effect of exposure to cadmium on the tropical freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *African Journal of Aquatic Science*. 36: 253-260.

- Kakoolaki, S., Sharifpour, .I, Soltani, M., Ebrahimzadeh, M.H.A., Mirzargar, S. y Rostami, M. (2010). Selected morpho-chemical features of hemocytes in farmed shrimp, *Fenneropenaeus indicus* in Iran. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 9: 219-232.
- Lightner, D.V. y Readman, R.M. (1988). Shrimp diseases and current diagnostic methods. *Aquaculture*, 164: 201-220.
- Lorenzon, S., Francese, M., Smith, V. J. y Ferrero, E.A. (2001). Heavy metals affect the circulating hemocyte number in the shrimp *Palaemon elegans*. *Fish & Shellfish Immunology*. 11: 459-472.
- Martin, G. G. y Graves, B. L. (1985). Fine structure and classification of shrimp hemocytes. *Journal of Morphology*. 185: 339-348.
- Molina, C., Cadena, E. y Orellana, F. (2000). Alimentación de camarones en relación a la actividad enzimática como una respuesta natural al ritmo circadiano y ciclo de muda. En: Avances en Nutrición Acuícola. Memorias V Simposio internacional de Nutrición Acuícola, Mérida Yucatán, México (p. 358-380).
- O'Halloran, M. J. y O'Dor, R. K. (1988). Molt cycle of male snow crabs, *Chionoecetes opilio*, from observations of external features, setal changes, and feeding behavior. *Journal of Crustacean Biology*. 8: 164-176.
- Ponce, P. J. T., Romero, C. O., Castillo, V. S., Arteaga, N. P., Ulloa, G. M., González, S. R. y Esparza, L. (2006). El desarrollo sostenible de la acuicultura en América Latina. *Revista Electrónica de Veterinaria REDVET*. 7(07).
- Qiu, J., Wang, W. N., Wang, L. J., Liu, Y. F. y Wang, A. L. (2011). Oxidative stress, DNA damage and osmolality in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* exposed to acute low temperature stress. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C, Toxicology and Pharmacology*. 154: 36-41.
- Rendón, L., y Balcázar, J. L. (2003). Inmunología de camarones: Conceptos básicos y recientes avances. *Revista AquaTIC*, 19:27-33.
- Robertson, L., Bray, W., Leung-Trujillo, J. y Lawrence, A. (1987). Practical molt staging of *Penaeus setiferus* and *Penaeus stylirostris*. *Journal of the World Aquaculture Society*. 18 (3): 180-185.
- Rueda, D. (2018). Evaluación de la respuesta inmune en camarón blanco del pacífico "*Penaeus vannamei*" a base de dietas con niveles altos de vitaminas, nucleótidos y  $\beta$ -glucanos. Universidad Central del Ecuador. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Tesis de grado para obtener el Título de Médico Veterinario Zootecnista. Ecuador. 49 p.
- Sabu, A. S. y Gopal, C. (2016). Changes in the haemolymph of *Fenneropenaeus indicus* exposed to malathion and endosulfan. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*. 4(1): 264-269.
- SAGARPA. (2009). Estudio de la infraestructura logística para la exportación del camarón blanco a algunas ciudades de Estados Unidos y Canadá. SAGARPA. 324 p.
- Sequeira, T., Vilanova, M., Lobo-da-Cunha, A., Baldaia, L. y Arala-Chaves, M. (1995). Flow cytometric analysis of molt-related changes in hemocyte type in male and female *Penaeus japonicus*. *Biological Bulletin*. 189: 376-380.
- Söderhäll, K. y Cerenius, L. (1992). Crustacean immunity. *Annual Review of Fish Diseases*. 2:3-23.
- Sun, J., Wang, A., y Zhang, T. (2010). Flow Cytometric Analysis of Defense Functions of Hemocytes from the Penaeid Shrimp, *Penaeus vannamei*. *Journal of the World Aquaculture Society*. 41 (1): 92-105.
- Shin, Y. K. y Chin, P. (1994). Physiological changes in relation to molt cycle of *Macrobrachium nipponense* (De Haan). *Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 27: 380-389.
- Smith, V. J. y Söderhäll, K. (1983). Induction of degranulation and lysis of haemocytes in the freshwater crayfish, *Astacus astacus* by components of the prophenoloxidase activating system in vitro. *Cell & tissue research*. 233(2):295-303.
- Wang, L. U. y Chen, J. C. (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.
- Xian, J. A., Zhang, X. X., Wang, D. M., Li, J. T., Zheng, P. H. y Lu Y.P. (2017). Various cellular responses of different shrimp hemocyte subpopulations to lipopolysaccharide stimulation. *Fish & Shellfish Immunology*. 69: 195-199

- Xian; J. A., Wang, A. L., Chen, X. D., Gou, N. N., Miao, Y. T., Liao, S. A. y Ye, C. X. (2011). Cytotoxicity of nitrite on haemocytes of the tiger shrimp *Penaeus monodon*, using flow cytometric analysis. *Aquaculture*. 317:240-244.
- Xian, J.A., Zhang, X.X., Sun, J.F., Wang, L., Wang, D.M., Li, J.T., Duan, R.J., Lu, Y.P., .Zheng, P. H. (2018). Flow cytometric analysis of *Penaeus monodon* haemocyte responses. *Fish and Shellfish Immunology*. 74: 62-68.
- Yeh, S.T, Liu, C.H. y Chen, J.C. (2004). Effect of copper sulfate on the immune response and susceptibility to *Vibrio alginolyticus* in the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology*, 17: 437-446.
- Yoganandhan, K., Thirupathi, S. y Sahul Hameed, S. A. (2003). Biochemical, physiological and hematological changes in white spot syndrome virus-infected shrimp, *Penaeus indicus*. *Aquaculture*. 221:1-11.

