

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA
FACULTAD DE CIENCIAS
E.A.P. BIOLOGÍA EN ACUICULTURA



Efecto de dietas con *Saccharomyces cerevisiae* sobre la proliferación de hemocitos en machos de *Cryphiops caementarius*

Tesistas: Bach. Cabrera Perez, Elizabeth Katherine
Bach. Marcelo Tomas, Zanny Karlen

**Tesis para optar por el Título Profesional de
Biólogo Acuicultor**

Nvo. Chimbote – Perú

2017

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA
FACULTAD DE CIENCIAS
E.A.P. BIOLOGÍA EN ACUICULTURA



Efecto de dietas con *Saccharomyces cerevisiae* sobre la proliferación de hemocitos en machos de *Cryphiops caementarius*

Dr. Walter Eduardo Reyes Avalos
Asesor

Dr. Carlos Alberto Azañero Díaz
Co-asesor

Nvo. Chimbote – Perú
2017

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA
FACULTAD DE CIENCIAS
E.A.P. BIOLOGÍA EN ACUICULTURA



Efecto de dietas con *Saccharomyces cerevisiae* sobre la proliferación de hemocitos en machos de *Cryphiops caementarius*

Conformidad del Jurado Evaluador

Dr. Guillermo Saldaña Rojas
Presidente

Blgo. Acui. Carmen Yzásiga Barrera
Integrante

Dr. Walter Eduardo Reyes Avalos
Integrante

Nvo. Chimbote – Perú
2017

DEDICATORIA

A Dios por haberme dado la vida, por guiarme por el buen camino.

“Así que no temas, porque yo estoy contigo; no te angusties, porque yo soy tu Dios. Te fortaleceré y te ayudaré; te sostendré con mi diestra victoriosa”

“Todo lo puedo en Cristo que me fortalece”

Para mis padres Gloria y Oswaldo, mis hermanos David y Joel, mis sobrinos Hilary y Abraham y mi enamorado Gherson a quienes amo profundamente, por haberme dado su apoyo incondicional, consejos, comprensión, amor y ayuda en los momentos difíciles.

Elizabeth Katherine Cabrera Perez

DEDICATORIA

A DIOS, por haberme dado la vida y permitirme el haber llegado hasta este momento tan importante de mi formación profesional.

A mi madre JUSTINA TOMAS por ser el pilar más importante en mi vida; por sus consejos y regaños, porque gracias a ella he aprendido a valorar lo bueno y a respetar lo malo; por demostrarme siempre su cariño y apoyo incondicional sin importar nuestras diferencias de opiniones.

A mis hermanas KATERIN Y LIZBETH que siempre están a mi lado en los mejores y peores momentos.

Marcelo Tomas, Zanny Karlen

AGRADECIMIENTO

A todos nuestros profesores de la Universidad Nacional del Santa, por impartirnos los conocimientos necesarios para nuestra formación profesional y por su total comprensión hacia nuestra persona.

A nuestro asesor de tesis Dr. Walter Reyes Avalos por sus consejos, su apoyo incondicional, por corregirnos cuando nos hemos equivocado, por encaminarnos para ser buenos profesionales, estamos agradecidas Profesor.

A nuestro co-asesor Dr. Carlos Azañero Díaz por su apoyo en todo este proceso, por su paciencia para enseñarnos y por brindarnos siempre su ayuda.

A Julissa y Lucero, nuestras amigas de la universidad, a las cuales apreciamos como hermanas porque siempre estuvieron con nosotras, por darnos sus consejos, su paciencia, compartir su alegría, su amor y cariño. Nos sentimos orgullosas de ustedes amigas. Gracias por ser parte de nuestras vidas.

Para todos ustedes, mi eterno cariño y gratitud.

Cabrera Perez & Marcelo Tomas

ÍNDICE

DEDICATORIA	
iii	
AGRADECIMIENTO	
v	
ÍNDICE DE FIGURAS	
vii	
ÍNDICE DE TABLAS	
vii	
ÍNDICE DE ANEXOS	
vii	
RESUMEN	
viii	
ABSTRACT	
viii	
I. INTRODUCCIÓN	
09	
II. MATERIALES Y MÉTODOS	
11	
2.1. MATERIAL	
11	
Población	
11	
Muestra	
11	
Unidad de análisis	
11	
2.2. MÉTODOS	
11	
Tipo de estudio	
11	
Diseño de investigación	
11	
2.3. VARIABLES Y OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES	
11	
Variable independiente	
11	
Variable dependiente	
11	
2.4. PROCEDIMIENTO	
11	
Transporte de camarones	
11	
Identificación y aclimatación de camarones	11
Selección y siembra de camarones	
12	
Sistema de cultivo	
12	

Dietas	
12	
Alimentación	
13	
Extracción de hemolinfa	
13	
Recuento de hemocitos	
13 calidad del agua	
14	
Análisis estadístico	
14	
III. RESULTADOS	
15	
3.1. NÚMERO TOTAL DE HEMOCITOS	
15	
3.2. HEMOCITOS GRANULOCITOS	
15	
3.3. HEMOCITOS SEMIGRANULOCITOS	
16	
3.4. HEMOCITOS HIALINOCITOS	
17	
3.5. HEMOCITOS ATÍPICOS	
18	
3.6. CALIDAD DEL AGUA	
18	
IV. DISCUSIÓN	
19	
V. CONCLUSIONES	
23	
VI. RECOMENDACIONES	
23	
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	
24	
ANEXOS	29

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Composición porcentual del alimento balanceado para <i>C. caementarius</i> (Reyes, 2012)	13
---	----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Número total de hemocitos (NTH) en machos de <i>C. caementarius</i> , según tratamientos.	15
Figura 2: Número de hemocitos granulocitos (HG) en machos de <i>C. caementarius</i> , según tratamientos.....	16
Figura 3: Número de hemocitos semi granulocitos (HSG) en machos de <i>C. caementarius</i> , según tratamientos	17
Figura 4: Número de hemocitos hialinos (HH) en machos de <i>C. caementarius</i> , según tratamientos.....	17
Figura 5: Número de hemocitos atípicos (HA) en machos de <i>C. caementarius</i> , según tratamientos.....	18

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Lugar de recolección de muestras	30
Anexo 2: Flujograma del proceso de activación de la levadura entera.....	31
Anexo 3: Panel Fotográfico	32
Anexo 3.1: Sistema De Cultivo	32
Anexo 3.2: Extracción De Hemolinfa.....	32
Anexo 3.3: Recuento de hemocitos en machos adultos.....	33
Anexo 4: Número Total De Hemocitos (NTH)	34
Anexo 5: Número Diferencial De Hemocitos (NDH) (X 105 (Cel/MI)).....	35
Anexo 6: Número Diferencial De Hemocitos (NDH) (%)	36
Anexo 7: Análisis Estadísticos.....	37

RESUMEN

Las levaduras poseen componentes estructurales que estimulan el sistema inmunológico y la hematopoyesis de los crustáceos con el cual se incrementan los hemocitos circulantes que desempeñan importantes funciones en la defensa del huésped. El objetivo fue evaluar el efecto de dietas con *Saccharomyces cerevisiae* sobre la proliferación de hemocitos en machos de *Cryphiops caementarius*. Fueron empleados 48 camarones machos adultos, capturados del río Pativilca, de $7,4 \pm 2,9$ g de peso total y de $5,3 \pm 1,2$ cm de longitud total.

Los camarones se mantuvieron en recipientes individuales instalados dentro de acuarios (seis camarones por acuario). Se emplearon una dieta control (3% de levadura activada) y tres dietas experimentales (6, 9 y 12% levadura activada), con dos repeticiones. El número total de hemocitos fue significativamente mayor ($p < 0,05$) con 6% de levadura ($134,75 \times 10^5$ cél mL^{-1}), así como el número de granulocitos ($31,44 \times 10^5$ cél mL^{-1}) y de semigranulocitos ($102,44 \times 10^5$ cél mL^{-1}). El número de hialinocitos varió durante el tiempo y disminuyó en todos los tratamientos, y mantenerse entre $0,31 \times 10^5$ cél mL^{-1} y $1,56 \times 10^5$ cél mL^{-1} . El número de hemocitos atípicos se mantuvieron bajos en todos los tratamientos y sin diferencias significativas ($p > 0,05$) con el basal ($0,31 \times 10^5$ cél mL^{-1}). Los resultados demuestran que con 6% de levadura en la dieta mejora el número de hemocitos totales y diferenciales en camarones machos de la especie.

Palabras clave: *Saccharomyces*, *Cryphiops*, hemocitos, camarón.

ABSTRACT

Yeasts have structural components that stimulate the immune system and the hematopoiesis of crustaceans with which circulating hemocytes that play important roles in the defense of the host are increased. The objective was to evaluate the effect of diets with *Saccharomyces cerevisiae* on the proliferation of hemocytes in males of *Cryphiops caementarius*. Thirty-eight adult male shrimp, captured from the Pativilca River, were used, with 7.4 ± 2.9 g of total weight and 5.3 ± 1.2 cm of total length. The shrimp were kept in individual containers installed inside aquariums (six shrimp per aquarium). A control diet (3% activated yeast) and three experimental diets (6, 9 and 12% activated yeast) were used, with two replicates. The total number of hemocytes was significantly higher ($p < 0.05$) with 6% yeast (134.75×10^5 cells mL^{-1}), as well as the number of granulocytes (31.44×10^5 cells mL^{-1}) and of semigranulocytes (102.44×10^5 cells mL^{-1}). The number of hyalinocytes varied over time and decreased in all treatments, and maintained between 0.31×10^5 cells mL^{-1} and 1.56×10^5 cells mL^{-1} . The number of atypical hemocytes remained low in all treatments and there were no significant differences ($p > 0.05$) with baseline (0.31×10^5 cells mL^{-1}). The results show that with 6% yeast in the diet improves the number of total and differential haemocytes in male shrimp of the species.

Key words: *Saccharomyces*, *Cryphiops*, haemocytes, shrimp.

I. INTRODUCCIÓN

El camarón *Cryphiops caementarius* Molina 1782 es una especie que se distribuye en la vertiente occidental de los Andes, desde el río Taymí en el norte del Perú (06° 32' S) (Méndez, 1981) hasta el río Maipo en el norte de Chile (33° 26' S) (Jara, 1997), pero abunda en los ríos Cañete, Ocoña, Majes-Camaná y Tambo en Perú (Wasiw & Yépez, 2015) y contribuye con el 80 % del recurso extraído en la costa peruana (Zacarías & Yépez, 2008). La extracción del recurso al 2014 fue de 1037 t (PRODUCE, 2015) que abasteció al mercado de Lima dada la gran demanda en gastronomía.

El sistema inmune de los crustáceos, está basado en efectores celulares y humorales, los que se conjugan para eliminar microorganismos potencialmente infecciosos, donde los hemocitos circulantes son cruciales en estas reacciones inmunitarias, porque realizan fagocitosis, encapsulación, formación de nódulos, producen citotoxicidad y constituyen la fracción celular de la hemolinfa (Bachere, 2000; Rendón & Balcázar, 2003; Cerenius et al., 2010; Fonseca et al., 2013).

El número total de hemocitos (NTH) y el número diferencial de hemocitos (NDH) cambian de acuerdo a la especie de crustáceo, al género, estación de año, condiciones de laboratorio, entre otros (Gelibolu et al., 2009). Además el NTH presenta variaciones debido al estrés, enfermedades y a las condiciones del ambiente (Johansson et al., 2000; Pacheco et al., 2012).

Los inmunoestimulantes e inmunomoduladores se incorporan a las dietas de los camarones, por la facilidad de dosificación oral; no ocasionan demanda de energía, por lo que no retardan el crecimiento; se usan en forma continua y no generan resistencia ni acostumbamiento (Berger, 2000). Sin embargo, Campa-Córdova et al. (2005) señalaron que se deben diseñar estudios dirigidos a conocer la dosis adecuada de inmunoestimulantes para evitar estrés fisiológico en los organismos de cultivo pero que incremente la respuesta inmune de los camarones.

Los crustáceos al no poseer un sistema inmunológico específico ni capacidad de memoria (Berger, 2000) es necesario emplear sustancias que tienen la cualidad de alertar al sistema inmune no específico de los crustáceos y estas se encuentran en las paredes de

bacterias Gram negativas (lipopolisacáridos), Gram positivas (péptidoglicanos) y en hongos, levaduras y algas (β -glucanos) (Rendón & Balcázar, 2003).

Saccharomyces cerevisiae contiene sustancias inmunoestimulantes que alertan al sistema inmune (Rendón & Balcázar, 2003). Además, las levaduras no solo aportan con β -glucano, mananoligosacáridos y otros componentes de la pared celular, sino también son fuentes de antioxidantes, principalmente de superóxido dismutasa, empleadas para incrementar la actividad antioxidante y estimular la proliferación de hemocitos circulantes (Pacheco et al., 2012). Los camarones con un mayor número de hemocitos son resistentes a alguna infección bacteriana (Le Moullac et al., 2000).

Subramanian et al. (2012) adicionaron 10% de *S. cerevisiae* en la dieta estándar de *Penaeus monodon* y los animales incrementaron el NTH, la fenoloxidasa y la actividad antibacterial. Cornejo et al. (2015), usaron por primera vez solo 3% de *S. cerevisiae* en la dieta estándar del camarón *C. caementarius* y lograron incrementar el NTH y los hemocitos granulocitos y semigranulocitos. Sin embargo, no se conoce la respuesta hemocitaria del camarón a elevadas concentraciones de *S. cerevisiae* en la dieta. Por consiguiente, se formuló el siguiente problema de investigación ¿Cuál es el efecto de dietas con 3, 6, 9 y 12% de *S. cerevisiae* sobre la proliferación de hemocitos en machos de *C. caementarius*?

La hipótesis establece que si, se emplean dietas con 3, 6, 9 y 12% de *S. cerevisiae*, entonces con 9% de *S. cerevisiae* se logra mayor proliferación de hemocitos en machos de *C. caementarius*.

El objetivo fue evaluar el efecto de dietas con *S. cerevisiae* sobre la proliferación de hemocitos en machos de *C. caementarius*. Los objetivos específicos fueron:

Cuantificar el NTH en machos de *C. caementarius* alimentados con 3, 6, 9 y 12% de *S. cerevisiae* en la dieta.

Cuantificar el número de hemocitos granulocitos, semigranulocitos y hialinocitos en machos de *C. caementarius* alimentados con 3, 6, 9 y 12% de *S. cerevisiae* en la dieta.

II. MATERIALES Y METODOS

2.1. MATERIAL

Población: Los camarones machos adultos de *C. caementarius* procedieron del río Pativilca (10°49'59"S - 77°43'09"W) (Pativilca, Barranca, Lima) (Anexo 1).

Muestra: La muestra fue 48 camarones machos adultos de $7,4 \pm 2,9$ g de peso total y de $5,3 \pm 1,2$ cm de longitud total (LT: Escotadura postorbital – Extremo posterior del telson), seleccionados al azar de un lote de 80 camarones.

Unidad de análisis: La unidad de análisis fue la hemolinfa de los camarones sembrados en cada uno de los acuarios de los tratamientos.

2.2. MÉTODOS

Tipo de estudio: Experimental.

Diseño de investigación: Se utilizó el diseño experimental de estímulo creciente, con un tratamiento control (3% de levadura) y tres tratamientos experimentales (6, 9 y 12% de levadura), cada uno con dos réplicas:

2.3. VARIABLES Y OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

Variable independiente: Levadura *S. cerevisiae*

Variable dependiente: Proliferación de hemocitos

2.4. PROCEDIMIENTO

Transporte de camarones: Los camarones se introdujeron individualmente en recipientes de 200 mL y luego se acondicionaron en recipientes de plásticos (50 L), con aireación constante. El transporte desde Pativilca hasta el Laboratorio duró 4,5 h y no hubo mortalidad.

Identificación y aclimatación de camarones: La especie de camarón se verificó según Méndez (1981) y el sexo macho se determinó por la amplitud de los coxopoditos del quinto par de periópodos y por el tamaño de los quelípodos. Los camarones se aclimataron durante una semana en acuarios con agua del mismo río y aireación continua. La alimentación se inició a partir del segundo día de aclimatación, con alimento balanceado (30% de proteína total).

Selección y siembra de camarones: Finalizado el periodo de aclimatación, se seleccionaron solo los camarones machos de tamaños similares de $5,3 \pm 1,2$ cm de longitud total y $7,4 \pm 2,9$ g de peso total, con apéndices cefalotorácicos completos y en estados de muda C y D₁ (Reyes & Lujan, 2003). En cada recipiente se asignó un camarón, es decir seis camarones por acuario (32 camarones m^{-2}).

Sistema de cultivo: Se empleó el sistema de cultivo individual conformado por ocho acuarios de vidrio ($0,60$ m de largo, $0,31$ m de ancho, $0,35$ m de alto con $0,186$ m^2) y en cada uno se introdujeron seis recipientes circulares de material plástico transparente con tapa (dos grupos de recipientes de tres niveles cada uno). Las paredes de los recipientes tuvieron aberturas para permitir el flujo de agua. En cada recipiente se le colocó un tubo de PVC de $\frac{1}{2}$ de diámetro que sobresalió 10 cm sobre el nivel del agua, por donde se introdujo los gránulos de alimento. Los acuarios tuvieron un sistema de recirculación de agua tipo air-water-lift, con filtro biológico de percolador ($1,5$ $L\ min^{-1}$). Se utilizó agua potable declorada, con previa aireación constante por 72 h (Anexo 3.1).

Dietas: La levadura entera se activó por el método de Martínez-Rodríguez et al. (2001) y Perdomo et al. (2004) con las modificaciones en la incubación de 24 h a $37^{\circ}C$ (Anexo 2). La levadura activada se usó como aditivo en las proporciones de 3 , 6 , 9 y 12% , en la dieta estándar (30% de proteína cruda) para la especie de camarón (Reyes, 2012) (Tabla 1).

Tabla 1: Composición porcentual de la dieta estándar para *C. caementarius*

INSUMOS	%
Harina de pescado	30,00
Harina de soya	21,00
Harina de maíz	16,70

Polvillo de arroz	22,00
Zeolita	2,00
Melaza	3,00
Aceite de pescado	2,00
Aceite de soya	0,50
Aceite de maíz	0,50
Lecitina de soya	1,00
Sal común	1,00
Complexvit	0,30

¹ Comprende (kg⁻¹): Vitaminas A 8 g; E 7 g; B1 8 g; B2 16 g; B6 11,6 g; B12 0,02 g; C 5 g; D3 5 g; K3 1 g; Nicotinamida 10 g; Niacina 6 g; Biotina 0,3 g; DL Metionina 20 g; Pantotenato de calcio 47 g; Cloruro de sodio 2,7 g; Cloruro de potasio 34 g; Sulfato de magnesio 7 g; Maca 5 g; y Excipientes 1000 g.

FUENTE: Reyes (2012).

Alimentación: Los camarones se alimentaron desde el primer día de siembra con el alimento elaborado. La ración diaria fue del 6% del peso húmedo por camarón. La frecuencia de alimentación fue de dos veces por día (08:00 y 19:00 h) durante seis días a la semana y se distribuyó el alimento en iguales proporciones.

Extracción de hemolinfa: A los siete días después de la aclimatación y previo a las tomas de muestras de hemolinfa, se suspendió la alimentación de los camarones por 12 h, luego se colocaron ocho camarones por 5 min en recipientes plásticos de 4 L con agua dulce declorada, pre aireada y a temperatura ambiente. La hemolinfa se extrajo del seno pericárdico de los camarones vivos, con una jeringa de 1 mL (Insulin Syringe 26 G ½); así mismo se realizaron preparaciones en fresco de la hemolinfa con solución de Alsever modificado a 4°C (Jussila et al., 1999) (Anexo 3.2).

Recuento de hemocitos: Para determinar el NTH y el NDH se midió 20 µL de hemolinfa extraída y se adicionó a un microtubo (Eppendorf) conteniendo 80 µL de solución de la solución de Alsever modificado a 4°C (Van de Braak, 2002). El conteo de hemocitos se realizó en cámara de Neubauer y en microscopio LEICA DM LS2 de luz convencional de campo luminoso provisto de contraste de fases (Anexo 3.3). Con los datos obtenidos se determinó el número total de hemocitos (NTH) (Anexo 4) y el número diferencial (NDH) (Anexo 5 y 6) que constituyeron los hemocitos granulocitos (HG), hemocitos semigranulocitos (HSG), hemocitos hialinos (HH) y hemocitos atípicos (HA), según Azañero *et al.* (2006) y con las formulas según Jussila (1997):

$$NTH (cél mL^{-1}) = \frac{(HC \times D \times C)}{0,4}$$

$$\text{NDH (cél mL}^{-1}\text{)} = \frac{(\text{HD} \times \text{D} \times \text{C})}{0,4}$$

Donde HC es el número de hemocitos contado, D es el factor de dilución de la hemolinfa, C es la conversión del factor $\times 0,1 \text{ mm}^3 \times \text{mL}$ (1000), HD es el número de hemocitos diferenciales contados.

Calidad del agua: Para mantener la calidad del agua se realizó la limpieza de los acuarios diariamente por sifoneo de los desechos sólidos acumulados en el fondo del acuario. El 30% del agua de cada acuario fue renovada dos veces por semana. El agua de todos los acuarios fue monitoreada cada siete días. Se determinó temperatura con un Oxímetro Hatch LDO ($\pm 0,01 \text{ mg L}^{-1}$), el pH con un pH-metro digital 110 ($\pm 0,01^\circ\text{C}$), el CO_2 , la dureza total y la alcalinidad total por métodos titrimétricos y con el test colorimétrico Nutrafin ($\pm 0,01 \text{ mg L}^{-1}$) se determinó amonio, nitritos y nitratos.

Análisis estadístico: Los resultados se sometieron a la prueba de Kolmogorov-Smirnov para determinar la normalidad de datos, luego se aplicó análisis de varianza simple y la prueba de Duncan, en ambos casos con un nivel de significancia del 5%, además se realizó la prueba de t Student para comparar el NTH y NDH basales con la variación de los mismos a través del tiempo. Todos los análisis se efectuaron utilizando el Software SPSS versión 23 para Windows (Anexo 7).

III. RESULTADOS

3.1. NÚMERO TOTAL DE HEMOCITOS

El NTH basal de los camarones fue de $11,06 \pm 1,50 \times 10^5 \text{ cél mL}^{-1}$. A los siete días de cultivo, el NTH de los camarones incrementaron ($p < 0,05$), en 5, 6, 7 y 10 veces con 12%, 3%, 6% y 9% de *S. cerevisiae* en la dieta. A los 14 días, el NTH de los camarones de todos

los tratamientos disminuyeron en alrededor de 25% del valor del muestreo anterior, excepto los camarones alimentados con 12% de *S. cerevisiae* que se mantuvo constante. El NTH de los camarones alimentados con 6% de *S. cerevisiae* fueron los únicos que incrementaron a los 21 días ($88,31 \pm 5,26 \times 10^5$ cél mL⁻¹) y 28 días de cultivo ($134,75 \pm 2,30 \times 10^5$ cél mL⁻¹); en cambio, en los demás tratamientos, el NTH varió a través del tiempo y no superaron los 78×10^5 cél mL⁻¹ (Fig. 1).

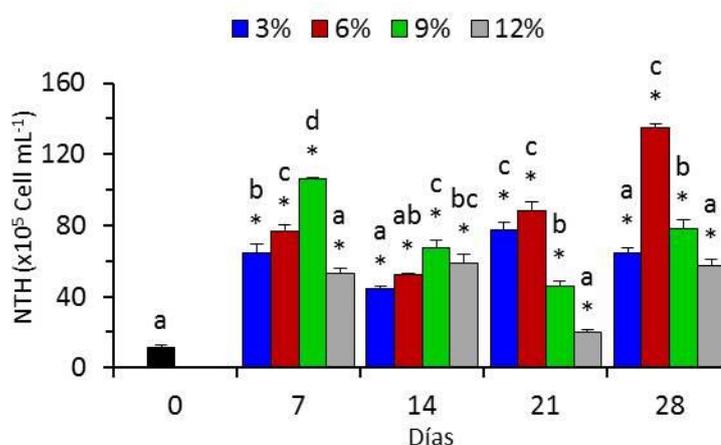


Figura 1. Número total de hemocitos (NTH) en machos de *C. caementarius*, según tratamientos. Letras iguales sobre las barras indican que no hay diferencias significativas por cada muestreo ($p > 0,05$); los asteriscos indican diferencia significativa ($p < 0,05$) con relación al valor inicial.

3.2. HEMOCITOS GRANULOCITOS

El número de HG basal de los camarones fue de $3,19 \pm 0,62 \times 10^5$ cél mL⁻¹. A los siete días de cultivo, los HG de los camarones incrementaron ($p < 0,05$), en 6 veces con 3% y 9% de *S. cerevisiae* en la dieta, y de 4 veces con 6% de *S. cerevisiae*, en cambio con 12% de *S. cerevisiae* no se observó diferencias ($p > 0,05$), con los HG basal.

Los camarones alimentados con 6% de *S. cerevisiae* fueron los únicos que incrementaron los HG a los 14 días ($16,06 \pm 1,68 \times 10^5$ cél mL⁻¹), 21 días ($18,06 \pm 0,80 \times 10^5$ cél mL⁻¹) y 28 días de cultivo ($31,44 \pm 3,45 \times 10^5$ cél mL⁻¹); en cambio, en los alimentados con 3%, 9% y 12% de *S. cerevisiae*, los HG varían a través del tiempo y no superaron los 23×10^5 cél mL⁻¹ (Fig. 2).

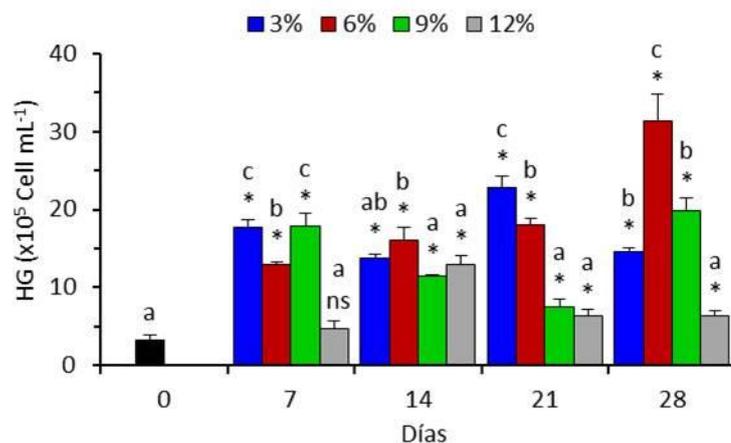


Figura 2. Número de hemocitos granulocitos (HG) en machos de *C. caementarius*, según tratamientos. Letras iguales sobre las barras indican que no hay diferencia significativa por cada muestreo ($p > 0,05$); los asteriscos indican diferencias significativas en relación al valor inicial ($p < 0,05$); ns: es no significativo al valor inicial.

3.3. HEMOCITOS SEMIGRANULOCITOS

El número de HSG basal de los camarones fue de $6,00 \pm 1,24 \times 10^5$ cél mL⁻¹. A los siete días de cultivo, el HSG de los camarones incrementaron ($p < 0,05$), en 7, 10, 15 y 8 veces con 3%, 6%, 9% y 12% de *S. cerevisiae* en la dieta. A los 14 días, los HSG de los camarones de todos los tratamientos disminuyeron en alrededor de 40% del valor del muestreo anterior, excepto los camarones alimentados con 12% de *S. cerevisiae* que se mantuvo constante. Los camarones alimentados con 6% de *S. cerevisiae* fueron los únicos que incrementaron los HSG a los 21 días ($69,13 \pm 6,898 \times 10^5$ cél mL⁻¹) y 28 días de cultivo ($102,44 \pm 5,57 \times 10^5$ cél mL⁻¹); en cambio, en los demás tratamientos, los HSG variaron a través del tiempo y no superaron los 57×10^5 cél mL⁻¹ (Fig. 3).

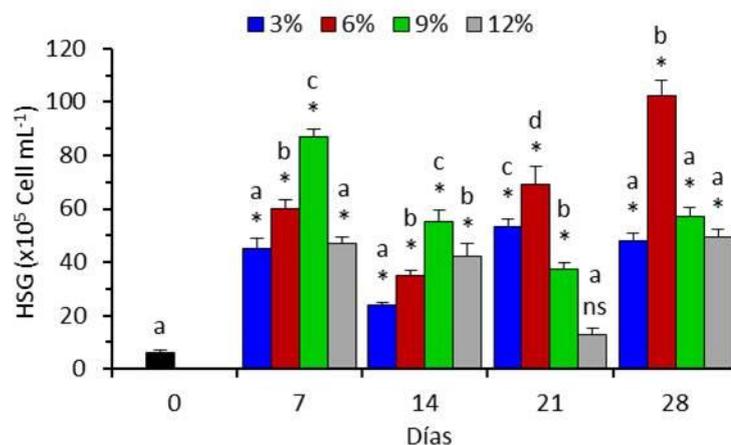


Figura 3. Número de hemocitos semigranulocitos (HSG) en machos de *C. caementarius*, según tratamientos. Letras iguales sobre las barras indican que no hay diferencia significativa por cada muestreo ($p > 0,05$); los asteriscos indican diferencias significativas en relación al valor inicial ($p < 0,05$); ns: es no significativo al valor inicial.

3.4. HEMOCITOS HIALINOCITOS

El número de HH basal de los camarones fue de $1,56 \pm 0,44 \times 10^5$ cél mL⁻¹. A los siete días de cultivo, los HH de aquellos alimentados con 6% de *S. cerevisiae* incrementó ($p < 0,05$) ($3,19 \pm 0,62 \times 10^5$ cél mL⁻¹); en cambio, los HH de aquellos alimentados con 3%, 9% y 12% de *S. cerevisiae* disminuyeron ($p < 0,05$) en relación con los HH basal. A los 14 días se registró que un incremento abrupto de los HH en los camarones alimentados con 3% ($6,38 \pm 0,53 \times 10^5$ cél mL⁻¹) y 12% ($3,56 \pm 0,62 \times 10^5$ cél mL⁻¹) de *S. cerevisiae* en la dieta. A los 21 y 28 días el número de HH de todos los tratamientos disminuyeron y fluctuaron entre $1,56 \times 10^5$ cél mL⁻¹ y $0,31 \times 10^5$ cél mL⁻¹ (Fig. 4).

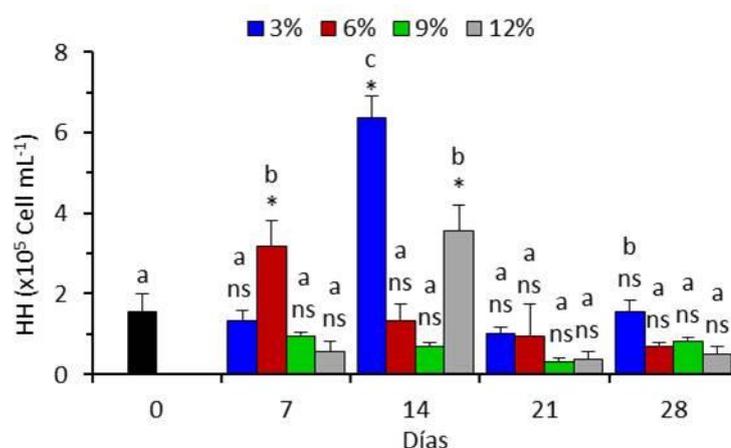


Figura 4. Número de hemocitos hialinos (HH) en machos de *C. caementarius*, según tratamientos. Letras iguales sobre las barras indican que no hay diferencia significativa por cada muestreo ($p > 0,05$); los asteriscos indican diferencias significativas en relación al valor inicial ($p < 0,05$); ns: es no significativo al valor inicial.

3.5. HEMOCITOS ATÍPICOS

El número de HA basal de los camarones fue de $0,31 \pm 0,09 \times 10^5$ cél mL⁻¹. Durante los 28 días de cultivo los HA se mantuvieron bajos y sin diferencias ($p > 0,05$) con los HA basal; excepto en aquellos alimentados con 12% de *S. cerevisiae* cuyos HA a los 21 días fue de alto ($0,56 \pm 0,09 \times 10^5$ cél mL⁻¹) y mucho más alto a los 28 días fue alto ($1,13 \pm 0,18 \times 10^5$ cél mL⁻¹) en relación con el basal y con los demás tratamientos que fluctuaron entre $0,19 \pm 0,09 \times 10^5$ cél mL⁻¹ y $0,38 \pm 0,18 \times 10^5$ cél mL⁻¹ (Fig. 5).

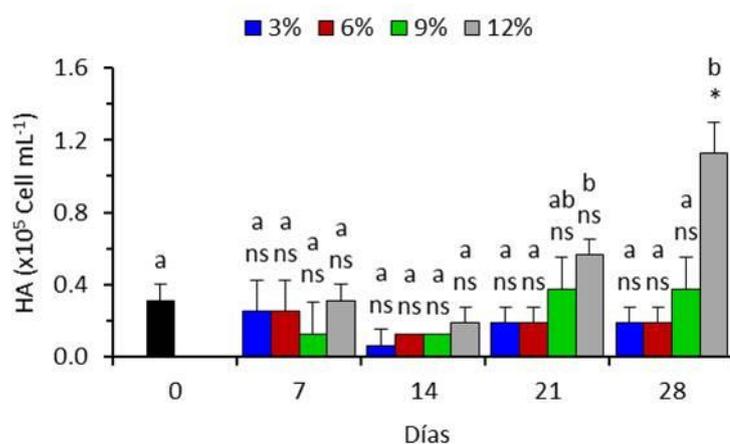


Figura 5. Número de hemocitos atípicos (HA) en machos de *C. caementarius*, según tratamientos. Letras iguales sobre las barras indican que no hay diferencia significativa por cada muestreo ($p > 0,05$); los asteriscos indican diferencias significativas en relación al valor inicial ($p < 0,05$); ns: es no significativo al valor inicial.

3.6. CALIDAD DEL AGUA

Los parámetros de calidad del agua no mostraron variación ($p > 0,05$) entre tratamientos. La temperatura varió de 25,5 a 26,8°C, el pH de 7,05 a 7,21, el oxígeno disuelto de 3,70 a 5,40 mg L⁻¹, los nitritos fueron de 0,10 mg L⁻¹ y no se encontró amonio total.

IV. DISCUSIÓN

En el presente estudio, el NTH basal ($11,06 \times 10^5$ cél mL⁻¹) y el NDH basales como los HG ($3,19 \times 10^5$ cél mL⁻¹), HSG ($6,00 \times 10^5$ cél mL⁻¹) y HH ($1,56 \times 10^5$ cél mL⁻¹) de los camarones machos de *C. caementarius* del río Pativilca fueron aproximadamente tres veces mayor que los obtenidos por Cornejo et al. (2015) para la misma especie capturada del mismo lugar. Sin embargo, en la investigación no se analizaron las condiciones del río de donde procedieron los camarones.

Las diferentes concentraciones de *S. cerevisiae* en la dieta de *C. caementarius*, ocasionaron un rápido incremento del NTH en los primeros siete días de alimentación, donde

los mayores valores se dieron con 9% de *S. cerevisiae* en la dieta, lo que sugiere que esta sería la máxima concentración de *S. cerevisiae* a ser empleada para mejorar de manera rápida, el estado inmunológico de la especie. Sin embargo, este incremento del NTH no permaneció en el tiempo, pues a los 14 días disminuyó en todos los tratamientos debido a la deficiencia o exceso de *S. cerevisiae* en la dieta, y solo en los camarones alimentados con 6% de *S. cerevisiae* se incrementó rápida y significativamente el NTH ($134,75 \times 10^5$ cél mL⁻¹) hasta los 28 días de cultivo, lo cual sería el máximo NTH de la especie que indicaría un mejor estado inmunológico, respecto a los valores basales y a lo informado previamente ($33,05 \times 10^5$ cél mL⁻¹, Cornejo et al. 2015). El incremento en NTH se relaciona con el estado nutricional del camarón (Le Moullac et al. 1999) cuya respuesta inmune se refuerza con los inmunoestimulantes de levadura (Le Moullac et al. 2000) que al incrementar el NTH resisten mejor a una infección debido a que su estado inmunológico es mejorado (Campa & Luna, 2011). Además, las levaduras son activadores, moduladores y fortificadores del sistema inmune en diversos organismos por la presencia de β -glucanos, mananoligosacáridos y otros componentes de la pared celular (Zhen-Ming et al. 2010), con los cuales se incrementan los hemocitos circulantes en crustáceos (Campa-Córdova et al. 2010).

Es la primera vez que se logró obtener un mayor NTH ($134,75 \times 10^5$ cél mL⁻¹) en machos adultos de *C. caementarius* alimentados con 6% de *S. cerevisiae* en la dieta a los 28 días, lo que indicaría ser la concentración adecuada de *S. cerevisiae* para estimular la proliferación de hemocitos. Cornejo et al. (2015) obtuvieron, para la misma especie, un valor cuatro veces menor ($33,05 \times 10^5$ cél mL⁻¹), pero ellos emplearon 3% de *S. cerevisiae* en la dieta en similar período. En consecuencia, se recomienda emplear 6% de *S. cerevisiae* en la dieta para incrementar los hemocitos durante mayor tiempo de cultivo. Aunque, las variaciones del NTH dependen del género, número de ejemplares, temporada, condiciones ambientales, estrés y enfermedades (Johansson et al. 2000; Gelibolu et al. 2009; Pacheco et al. 2012) y también de la respuesta inmune de cada especie de crustáceo (Song & Hsieh, 1994; Matozzo & Marin, 2010). Además, el NTH varía entre especies de crustáceos, así en *Penaeus monodon* el NTH es de $50,9 \times 10^6$ cél mL⁻¹ (Van de Braak, 2002), en *Callinectes sapidus* es de $216,43 \times 10^4$ cél mL⁻¹ (Gelibolu et al. 2009) y en *Carcinus aestuarii* de $6,4 \times 10^6$ cél mL⁻¹ (Matozzo & Marin, 2010).

La dieta con 6% de *S. cerevisiae* fue la única que estimuló significativamente la proliferación de HG ($31,44 \times 10^5$ cél mL⁻¹) y HSG ($102,44 \times 10^5$ cél mL⁻¹) de machos de *C.*

caementarius durante los 28 días de cultivo, en relación con los demás tratamientos que se mantuvieron casi estables. Estos resultados, que fueron dos y cinco veces más altos, respectivamente, que los obtenidos por Cornejo et al. (2015) en la misma especie de machos de camarón, probablemente se deben a la menor concentración de *S. cerevisiae* (3%) que emplearon en la dieta. En consecuencia, los valores de HG y HSG obtenidos con 6% de *S. cerevisiae*, sugieren que los camarones de la especie presentarían un sistema inmunológico preparado y reforzado, necesario para contrarrestar alguna enfermedad. En los crustáceos, los HG y los HSG participan en encapsulación, formación de nódulos, fagocitosis, citotoxicidad y liberación de profenoloxidasas, con los cuales se prepara a los organismos para enfrentar alguna invasión de microorganismos (Lanz et al. 1993; Johansson et al. 2000; Rodríguez & Le Moullac, 2000; Rendón & Balcázar, 2003; Aguirre-Guzmán et al. 2009).

El número de HH de machos de *C. caementarius* fue variable en el tiempo y en todos los tratamientos con respecto a los HH basal ($1,56 \times 10^5$ cél mL⁻¹), pero con tendencia a disminuir y mantenerse entre $0,31 \times 10^5$ cél mL⁻¹ y $1,56 \times 10^5$ cél mL⁻¹, aunque, estos valores fueron más altos que los obtenidos para la misma especie ($\sim 0,11 \times 10^5$ cél mL⁻¹, Cornejo et al. 2015). Esta variación de los HH durante el tiempo de cultivo, podría ser ocasionado por alguna alteración orgánica o fisiológica no perceptible en los camarones. Esto se sustenta por el hecho de que los HH de los crustáceos decápodos tienen capacidad fagocítica y participan en la coagulación (Raa, 2000; Johansson et al. 2000) y se ha reportado que el incremento se debe a alguna infección (Montesdeoca et al. 2002) y por la alta actividad fagocítica que tienen los HH (Lv et al. 2014). En cambio, la disminución de los HH estaría relacionada con el incremento de los HG y HSG, principalmente con 6% de *S. cerevisiae* en la dieta, similar a la variación reportados por Cornejo et al. (2015) en la misma especie aunque ellos emplearon 3% de *S. cerevisiae* en la dieta.

Por otra parte, el número de HA basal fue de $0,31 \times 10^5$ cél mL⁻¹ de los camarones machos de *C. caementarius*, que fue similar ($p < 0,05$) con aquellos alimentados hasta con 9% de *S. cerevisiae* en la dieta; y además, fueron similares a lo obtenido en la misma especie ($0,28 \times 10^5$ cél mL⁻¹, Cornejo et al. 2015). En cambio, el incremento abrupto observado a los 21 días y 28 días de cultivo solo en aquellos alimentados con 12% de *S. cerevisiae* en la dieta, indicarían alteraciones en la hematopoyesis por exceso de *S. cerevisiae* que debe haber afectado el estado inmunológico del camarón. En *L. vannamei* la alta concentración de HA se relaciona con un deficiente estado inmunitario, baja capacidad de reemplazo por

hemocitos nuevos y una libre circulación de células inmunitarias desgastadas o apoptóticas (Maldonado; 2003).

La disminución del NTH, de los HG y HSG de los camarones *C. caementarius* desde los 21 días de cultivo, alimentados con 9% y 12% de *S. cerevisiae*, sugiere que ambas concentraciones de *S. cerevisiae* fueron muy elevadas que afectaron la proliferación de los hemocitos en la especie; y como respuesta a ello, ocasionaron incremento de los HA. Estos resultados podrían explicarse según lo sugerido por Chang et al. (2000) quienes consideraron que una sobredosis de levadura causa fatiga inmune en *P. monodon*.

Por otro lado, la calidad de agua de cultivo del camarón fue similar ($p < 0,05$) entre tratamientos, y estuvieron cercanos a los parámetros registrados para el ambiente natural donde son considerados como favorables para *C. caementarius* (Wasiw & Yopez, 2015). De igual manera fueron semejantes a las condiciones normales de laboratorio donde se experimenta con la especie en el mismo sistema de cultivo (Reyes, 20015; Cornejo et al. 2015). En consecuencia los resultados del presente estudio se debieron a las diferentes concentraciones de *S. cerevisiae* en la dieta.

Por consiguiente, los resultados permiten inferir que con el uso de 6% de *S. cerevisiae* en la dieta se mejora el estado inmunológico de los camarones machos de *C. caementarius*, al ocasionar mayor incremento del NTH, de los HG y HSG, y disminución de los HA, en relación a lo obtenido con 3% de *S. cerevisiae* (Cornejo et al. 2015). Sin embargo, es conveniente complementar dicho estudio con otros parámetros inmunológicos y realizar el desafío con bacterias patógenas.

V. CONCLUSIONES

El NTH (134.75×10^5 cél mL⁻¹) fue significativamente mayor ($p < 0.05$) en los camarones machos de *C. caementarius* alimentados con 6% de *S. cerevisiae* en la dieta, en relación con los demás tratamientos.

El número de HG (31.44×10^5 cél mL⁻¹) y de HSG (102.44×10^5 cél mL⁻¹) fueron significativamente mayores ($p < 0,05$) en los camarones machos de *C. caementarius* alimentados con 6% de *S. cerevisiae*, en relación con los demás tratamientos.

El número de HH en los camarones machos de *C. caementarius* varió durante el tiempo y disminuyó ($p < 0,05$) en todos los tratamientos, y se mantuvo entre 0.31×10^5 cél mL⁻¹ y 1.56×10^5 cél mL⁻¹.

El número de HA en los camarones machos de *C. caementarius* se mantuvieron bajos en todos los tratamientos y sin diferencias significativas ($p>0.05$) con los HA basal (0.31×10^5 cél mL⁻¹).

VI. RECOMENDACIONES

Emplear 6% de *S. cerevisiae* en la dieta de postlarvas y juveniles de *C. caementarius* para mejorar el estado inmunológico y por consiguiente el crecimiento y supervivencia.

Evaluar la resistencia de machos y hembras de *C. caementarius* alimentados con 6% de *S. cerevisiae*, mediante el desafío con bacterias patógenas.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguirre-Guzmán, G., J.G. Sánchez-Martínez, A.I. Campa-Córdova, A. Luna-González & F. Ascencio. 2009. Penaeid shrimp immune system. Thai Journal of Veterinary and Medicine 39(3): 205-215.
https://www.researchgate.net/publication/261323302_Penaeid_Shrimp_Immune_System
- Azañero, C., W. Reyes, H. Monja, 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 CIVA 2006 (<http://www.civa2006.org>), 774-781.
- Bachere, E. 2000. Shrimp immunity and disease control. Aquaculture 191: 3–11.
- Berger, C. 2000. Aportes de la Bio-Tecnología a la Alimentación y a la Inmuno-Estimulación de Camarones peneidos. In: Cruz - Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-

- Salazar, M., Olvera-Novoa, M.A. y Civera-Cerecedo, R. (Eds.). Avances en Nutrición Acuícola. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 19-22 Noviembre, 2000. Mérida, Yucatán.
http://www.uanl.mx/utilerias/nutricion_acuicola/V/archivos/berger.pdf
- Chang, C.F., H.Y. Chen, M.S. Su & I.C. Liau. 2000. Immunomodulation by dietary β -1, 3-glucan in the brooders of the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. Fish & Shellfish Immunology, 10: 505–514.
- Campa-Córdova, A.I., A. Hernández-Salmerón, F. Ascencio-Valle & G. Aguirre-Guzmán. 2010. Respuesta inmune y antioxidante en camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, expuesto a inmunoestimulantes y probióticos. En: Cruz-Suarez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J. (Eds), Avances en Nutrición Acuícola X - Memorias del Décimo Simposio Internacional de Nutrición Acuícola, 8-10 de Noviembre, San Nicolás de los Garza, N. L., México. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México, pp. 567-587.
http://universidad.uanl.mx/utilerias/nutricion_acuicola/X/archivos/21-ACampa.pdf
- Campa, A. & A. Luna. 2011. Respuesta inmune en camarón blanco, *Litopenaeus vannamei*, expuesto a infecciones bacterianas y virales. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Hernández-Hernández, L. (Eds), Avances en Nutrición Acuícola XI - Memorias del Décimo Primer Simposio Internacional de Nutrición Acuícola, 23-25 de Noviembre, San Nicolás de los Garza, N. L., México. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México, pp. 317-344.
http://www.uanl.mx/utilerias/nutricion_acuicola/XI/archivos/16-campa.pdf
- Cerenius, L., P. Jiravanichpaisal, H. Liu & I. Söderhäll. 2010. Crustacean Immunity. Adv Exp Med Biol., 708: 239-59.
- Cornejo, J., L. Pérez & W. Reyes. 2015. Effect of *Saccharomyces cerevisiae* yeast in the diet of male shrimp *Cryphiops caementarius* (Crustacea, Palaemonidae) on total and differential hemocytes count. Revista Bio Ciencias, 3(3): 173-186.
<http://editorial.uan.edu.mx/BIOCIENCIAS/article/view/154>
- Fonseca, E., R. González & R. Rico. 2013. Sistema inmune de los camarones. Revista AquaTIC, n° 38, pp. 68-84. http://revistaaquatic.com/aquatic/pdf/38_6.pdf
- Gelibolu, S., C. Türeli & A. Şahan. 2009. Determination of haemocytes amount and haemocytes type in mature blue crab (*Callinectes sapidus*, Rathbun, 1896) captured in akyatan lagoon (karataş/adana- turkey). Journal of Fisheries Science, 3(3): 181-186.
- Jara, C.G. 1997. Antecedentes sobre el desarrollo de la carcinología en Chile. Invest. Mar., Valparaíso, 25: 245-254.

- Johansson, M., P. Keyser, K. Sritunyalucksana & K. Soderhall. 2000. Crustacean haemocytes and haematopoiesis. *Aquaculture* 191: 45–52. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S004484860000418X>
- Jussila, J. 1997. Physiological responses of astacid and parastacid crayfishes (Crustacea: Decapoda) to conditions of intensive culture. Doctoral Dissertation. University of Kuopio. Perth, Western Australia. http://epublications.uef.fi/pub/urn_isbn_951-781-705-3/urn_isbn_951-781-705-3.pdf
- Lanz, H., S. Hernandez, E. Garrido-Guerrero, V. Tutsumi & H. Aréchiga. 1993. Prophenoloxidase system activation in the crayfish *Procambarus clarkii*. *Developmental & Comparative Immunology*, 17: 399-406. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0145305X9390031K>
- Le Moullac, G., J. Rodriguez, D. Saulnier, G. Cuzon & L. Chim. 1999. Immunomodulation: nutritional aspects and immunostimulation. IFREMER-Aquacop, Taravao, Tahiti. CENAIM-ESPOL, Guayaquil, Ecuador. Forum.
- Le Moullac, G., L. Phillip, D. Saulnier, C. Goarant & M. Dehasque. 2000. Principios y problemas envueltos en la evaluación de inmunoestimulantes en juveniles de camarón. pp 509-519. En: Civera-Cerecedo, R., PérezEstrada, C.J., Ricque-Marie, D. y Cruz-Suárez, L.E. (Eds.) Avances en Nutrición Acuícola IV. Memorias del IV Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. Noviembre 15-18, 1998. La Paz, B.C.S., México. http://www.uanl.mx/utilerias/nutricion_acuicola/IV/archivos/30moul.pdf
- Lv, S., J. Xu, J. Zhao, N. Yin, B. Lu, S. Li, Y. Chen & H.Xu. 2014. Classification and phagocytosis of circulating haemocytes in Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) and the effect of extrinsic stimulation on circulating haemocytes *in vivo*. *Fish & Shellfish Immunology* 39: 415-422.
- Maldonado, M. 2003. Respuesta inmunitaria en familias de *Litopenaeus vannamei*, bajo condiciones de infección con WSSV y el efecto de la adición de β -1,3 glucanos. Tesis de Magister. Instituto Nacional Politécnica del Litoral. Guayaquil, Ecuador.
- Martínez-Rodríguez, A.J., M.C. Polo & A.V. Carrascosa. 2001. Structural and ultrastructural changes in yeast cells during autolysis in model wine system ad in sparkling wines. *International Journal of Food Microbiology*, 71: 45-51.
- Matozzo, V. & Marin, M.G. 2010. The role of haemocytes from the crab *Carcinus aestuarii* (Crustacea, Decapoda) in immune responses: A first survey. *Fish & Shellfish Immunology* 28: 534-541.
- Méndez, M. 1981. Claves de identificación y distribución de los langostinos y camarones (Crustacea: Decapoda) del mar y ríos de la costa del Perú. *Boletín Instituto del Mar Perú* 5: 1-170.

<http://biblioimarpe.imarpe.gob.pe:8080/bitstream/handle/123456789/1028/BOL%205.pdf?sequence=1>

- Montesdeoca, M., Y. Amano, F. Echevarria, I. Betancourt, F. Panchana, M. Sotomayor, *et al.* 2002. La respuesta inmunitaria celular del camarón *Litopenaeus vannamei* al WSSV y su utilidad en el control de la enfermedad en los estanques. *El Mundo Acuícola* 8(1): 38-42. <https://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/8742/1/10.pdf>
- Pacheco, M., Á. Campa, G. Aguirre, A. Luna, M. Guzmán & F. Ascencio. 2012. Efecto de *Debaryomyces hansenii* en la respuesta antioxidante de juveniles de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. *Rev. Mvz Cordoba* 17(1): 2820-2826. <http://revistas.unicordoba.edu.co/revistamvz/mvz-171/V17N1A3.pdf>
- Perdomo, M.C., R.S. Vargas & J. Campos. 2004. Valor nutritivo de la levadura de cervecería (*Saccharomyces cerevisiae*) y de sus derivados, extracto y pared celular, en la alimentación aviar. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal*, 12 (5): 89-95. <http://www.bioline.org.br/request?la04011>
- PRODUCE. 2015. Anuario estadístico 2014. Ministerio de la Producción. <http://www.produce.gob.pe/images/stories/Repositorio/estadistica/anuario/anuario-estadistico-pesca-2014.pdf>
- Raa, J. 2000. The use of immune-stimulants in fish and shellfish feeds. In: Cruz -Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Olvera-Novoa, M.A. y Civera-Cerecedo, R., (Eds.). *Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. 19-22 Noviembre, 2000. Mérida, Yucatán, México. http://www.uanl.mx/utilerias/nuicion_acuicola/V/archivos/raa.pdf
- Rendón L. & J. Balcázar. 2003. Inmunología de camarones: Conceptos básicos y recientes avances. *Revista Aquatic*, n° 19, pp. 27-33. http://www.revistaaquatic.com/aquatic/pdf/19_4.pdf
- Reyes, W. & H. Lujan. 2003. Estados y subestados del ciclo de muda del camarón de río (*Cryphiops caementarius* Molina, 1872) (Crustacea, Decapoda, Palaemonidae) en laboratorio. Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura. Zaragoza, España.
- 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.
- Rodríguez, J. & G. Le Moullac. 2000. State of the art of immunological tools and health control of penaeid shrimp. *Aquaculture*, 191(1-3): 109-119.
- Sajeevan, T., R. Philip & B. Singh. 2006. Immunostimulatory effect of a marine yeast *Candida Sake S165* in *Fenneropenaeus indicus*. *Aquaculture*, 257(1-4): 150-155.

- Song, Y.L. & Y.T. Hsieh. 1994. Immunostimulation of tiger shrimp (*Penaeus monodon*) hemocytes for generation of microbicidal substances: analysis of reactive oxygen species. *Developmental & Comparative Immunology* 18, 201-209.
- Subramanian, M., N.M. Alikunhi & K. Kandasamy. 2012. Immunostimulatory effect of mangrove-derived marine yeasts in *Penaeus monodon*. *Aquaculture Research*, 45(3): 3889-396. doi:10.1111/j.1365-2109.2012.03235.x
- Van de Braak, K. 2002. Haemocytic defence in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). Tesis PhD. Wageningen Institute of Animal Sciences, The Netherlands. <http://edepot.wur.nl/121288>
- Viacava, M., R. Aitken & J. Llanos. 1978. Estudio del camarón en el Perú 1975-1976. *Bol Inst. Mar del Perú*, 3(5): 161-233. <http://biblioimarpe.imarpe.gob.pe:8080/bitstream/handle/123456789/977/BOL%203%285%29.pdf?sequence=3>
- Wasiw, J., & V. Yépez. 2015. Evaluación poblacional del camarón *Cryphiops caementarius* en ríos de la costa sur del Perú. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 26(2), 166-181. Doi: <http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v26i2.11103>
- Zhen-Ming, C., G. Liu, S. Zhao, J. Li & Y. Peng. 2010. Levaduras marinas como agentes de biocontrol y productores de bio-productos. *Aplicado Microbiología y Biotecnología* 86, 1227- 1241.
- 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. IMARPE. http://www.imarpe.gob.pe/imarpe/archivos/informes/imarpe_26_informe_2007_camaron_de_rio_web.pdf
- Zapata, S. 2001. Posibilidades y potencialidad de la agroindustria en el Perú en base a la biodiversidad y los bionegocios. Comité Biocomercio Perú. <http://bibliotecavirtual.minam.gob.pe/biam/handle/minam/866>

ANEXOS

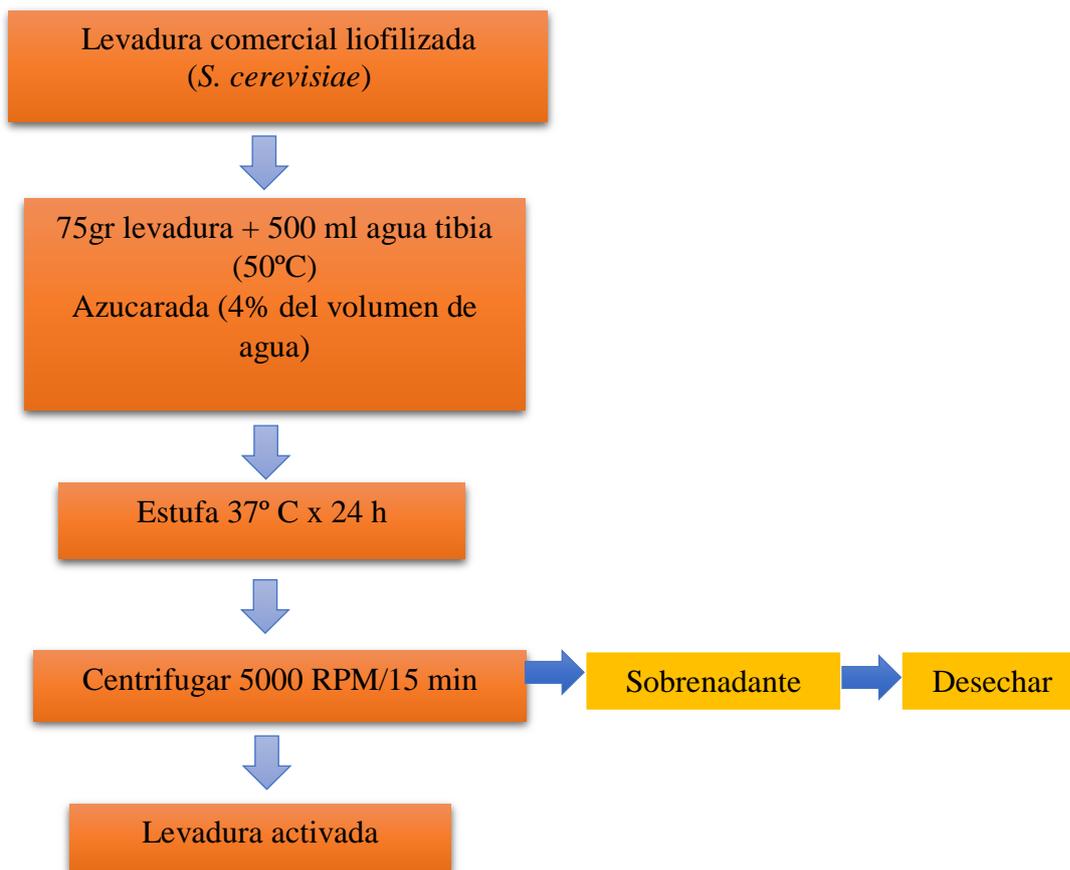
ANEXO 1

Lugar de recolección de camarones.



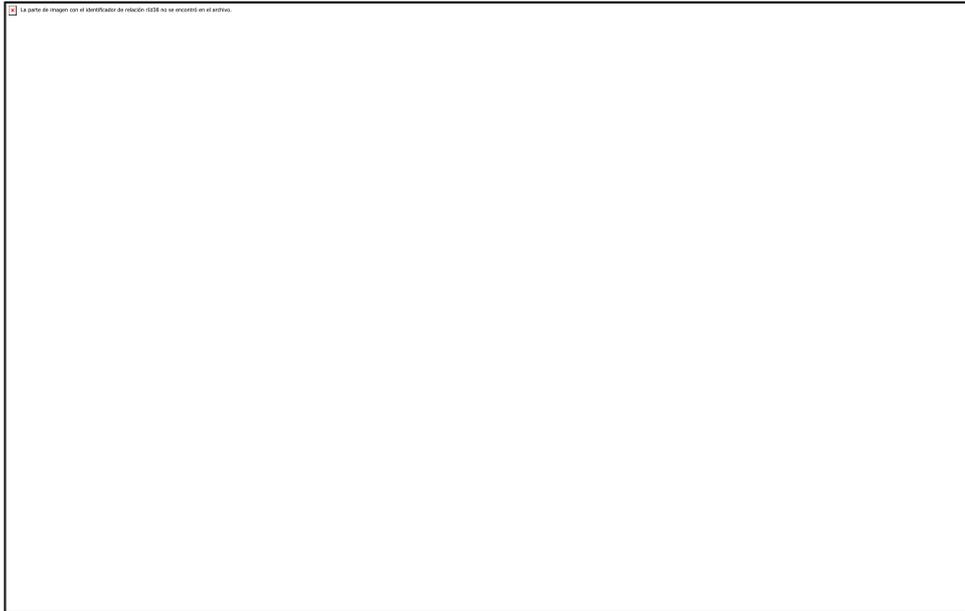
ANEXO 2

Flujograma del proceso de activación de la levadura *S. cerevisiae* (Martínez-Rodríguez et al., 2001; Perdomo et al., 2004)

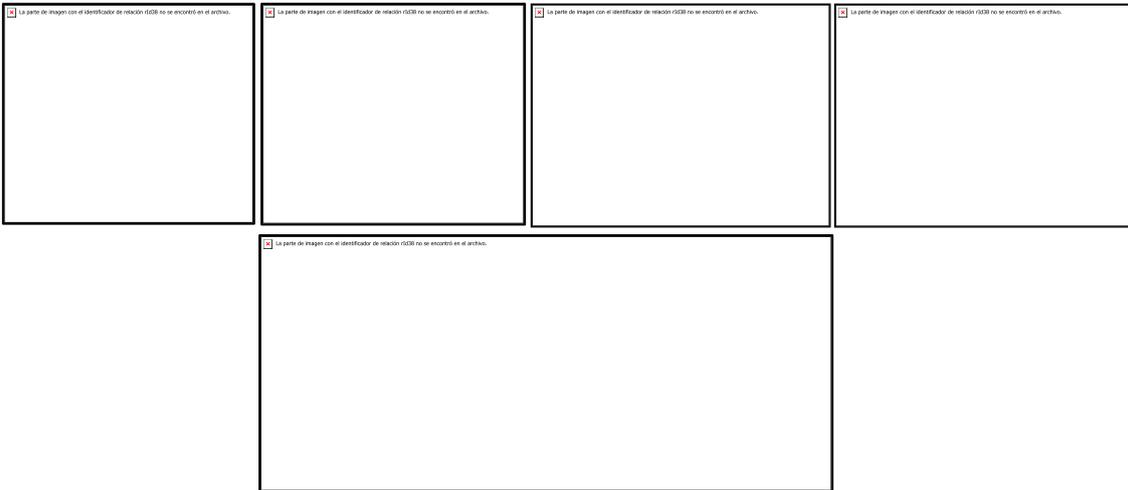


ANEXO 3

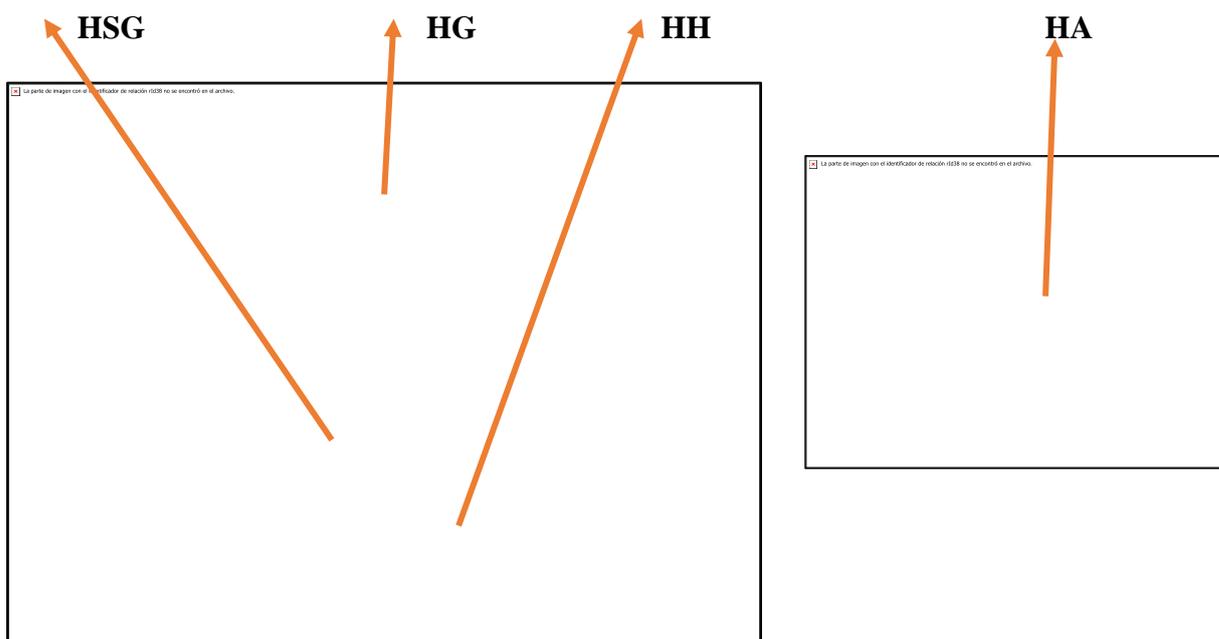
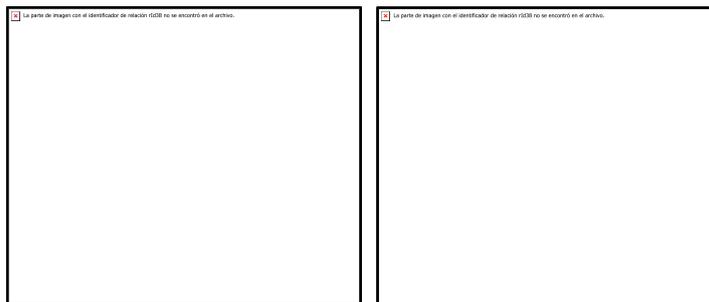
3.1 Sistema de cultivo del camarón en recipientes individuales, con recirculación de agua de tipo air-water-lift y con filtro biológico de goteo.



3.2 Extracción de hemolinfa del seno pericárdico de *C. caementarius*



3.3 Recuento de hemocitos en machos adultos de *C. caementarius*. Hemocitos granulocitos (HG), hemocitos semigranulocitos (HSG), hemocitos hialino (HH) y hemocitos atípicos (HA).



ANEXO 4

Número total de hemocitos (NTH)

TRATAMIENTOS	TIEMPO (Días)	NTH x10 ⁵ (cel/ml)
3% de levadura	0	11.06 ± 1.50
	7	64.19 ± 5.57
	14	43.00 ± 1.86
	21	77.56 ± 4.51
	28	64.19 ± 3.45
6% de levadura	0	11.06 ± 1.55
	7	76.38 ± 3.89
	14	52.44 ± 0.27
	21	88.31 ± 5.21
	28	134.75 ± 2.30
9% de levadura	0	11.06 ± 1.60
	7	105.88 ± 1.24
	14	64.38 ± 4.24
	21	45.50 ± 3.18
	28	78.00 ± 4.95
12% de levadura	0	11.06 ± 1.65
	7	52.75 ± 3.36
	14	58.81 ± 5.21
	21	20.00 ± 1.77
	28	57.44 ± 3.80

ANEXO 5

Número diferencial de hemocitos de *C. caementarius* ($\times 10^5$ cél mL⁻¹)

TRATAMIENTOS	TIEMPO (Días)	HEMOCITOS DIFERENCIALES $\times 10^5$ (cel/ml)			
		Granulocito	Semigranulocitos	Hialinocitos	Atípicos
3% de levadura	0	3.19 \pm 0.62	6.00 \pm 1.24	1.56 \pm 0.44	0.31 \pm 0.09
	7	17.69 \pm 0.97	44.94 \pm 4.15	1.31 \pm 0.27	0.25 \pm 0.18
	14	13.75 \pm 0.53	24.13 \pm 0.71	6.38 \pm 0.53	0.06 \pm 0.09
	21	22.88 \pm 1.41	53.50 \pm 2.83	1.00 \pm 0.18	0.19 \pm 0.09
	28	14.56 \pm 0.44	47.88 \pm 3.18	1.56 \pm 0.27	0.19 \pm 0.09
6% de levadura	0	3.19 \pm 0.62	6.00 \pm 1.24	1.56 \pm 0.44	0.31 \pm 0.14
	7	12.88 \pm 0.35	60.06 \pm 3.09	3.19 \pm 0.62	0.25 \pm 0.18
	14	16.06 \pm 1.68	34.94 \pm 1.86	1.31 \pm 0.44	0.13 \pm 0.00
	21	18.06 \pm 0.80	69.13 \pm 6.89	0.94 \pm 0.80	0.19 \pm 0.09
	28	31.44 \pm 3.45	102.44 \pm 5.57	0.69 \pm 0.09	0.19 \pm 0.09
9% de levadura	0	3.19 \pm 0.62	6.00 \pm 1.24	1.56 \pm 0.44	0.31 \pm 0.19
	7	17.81 \pm 1.68	87.00 \pm 3.01	0.94 \pm 0.09	0.13 \pm 0.18
	14	11.38 \pm 0.18	55.19 \pm 4.15	0.69 \pm 0.09	0.13 \pm 0.00
	21	7.56 \pm 0.97	37.25 \pm 2.30	0.31 \pm 0.09	0.38 \pm 0.18
	28	19.88 \pm 1.59	56.94 \pm 3.45	0.81 \pm 0.09	0.38 \pm 0.18
12% de levadura	0	3.19 \pm 0.62	6.00 \pm 1.24	1.56 \pm 0.44	0.31 \pm 0.24
	7	4.75 \pm 0.88	47.13 \pm 2.30	0.56 \pm 0.27	0.31 \pm 0.09
	14	12.88 \pm 1.24	42.19 \pm 4.68	3.56 \pm 0.62	0.19 \pm 0.09
	21	6.31 \pm 0.80	12.75 \pm 2.47	0.38 \pm 0.18	0.56 \pm 0.09
	28	6.38 \pm 0.71	49.44 \pm 2.74	0.50 \pm 0.18	1.13 \pm 0.18

ANEXO 6

Número diferencial de hemocitos de *C. caementarius* (%)

TRATAMIENTOS	TIEMPO (Días)	HEMOCITOS DIFERENCIALES (%)			
		Granulocito	Semigranulocitos	Hialinocitos	Atípicos
3% de levadura	0	29	54	14	3
	7	28	70	2	0
	14	31	54	14	0
	21	29	69	1	0
	28	23	75	2	0
6% de levadura	0	29	54	14	3
	7	17	79	4	0
	14	31	67	2	0
	21	20	78	1	0
	28	23	76	1	0
9% de levadura	0	29	54	14	3
	7	17	82	1	0
	14	17	82	1	0
	21	17	82	1	1
	28	25	73	1	0
12% de levadura	0	29	54	14	3
	7	9	89	1	1
	14	22	72	6	0
	21	32	64	2	3
	28	11	86	1	2

ANEXO 7: ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Homogeneous Subsets

NTH_0_dias

Tratamientos		N	Subset
			1
Duncan ^{a,b}	Levadura_12	2	1106250,00
	Levadura_3	2	1106250,00
	Levadura_6	2	1106250,00
	Levadura_9	2	1106250,00
Sig.			1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2,000.

Homogeneous Subsets

NTH_7_dias

Tratamientos		N	Subset			
			1	2	3	4
Duncan ^{a,b}	Levadura_12	2	5275000,00			
	Levadura_3	2		6418750,00		
	Levadura_6	2			7637500,00	
	Levadura_9	2				10587500,00
Sig.			1,000	1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2,000.

Homogeneous Subsets

NTH_14_dias

Tratamientos		N	Subset		
			1	2	3
Duncan ^{a,b}	Levadura_3	2	4431250,00		
	Levadura_6	2	5243750,00	5243750,00	
	Levadura_12	2		5881250,00	5881250,00
	Levadura_9	2			6737500,00
Sig.			,080	,142	,070

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2,000.

Homogeneous Subsets

NTH_21_dias

Tratamientos		N	Subset		
			1	2	3
Duncan ^{a,b}	Levadura_12	2	2000000,00		
	Levadura_9	2		4550000,00	
	Levadura_3	2			7756250,00
	Levadura_6	2			8831250,00
Sig.			1,000	1,000	,051

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2,000.

Homogeneous Subsets

NTH_28_dias

Tratamientos		N	Subset		
			1	2	3

Duncan ^{a,b}	Levadura_12	2	5743750,00		
	Levadura_3	2	6418750,00		
	Levadura_9	2		7800000,00	
	Levadura_6	2			13475000,00
	Sig.		,146	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2,000.

Homogeneous Subsets

Granulocitos_0_dias

Tratamientos		N	Subset	
			1	
Duncan ^{a,b}	Levadura_12	2	318750,00	
	Levadura_3	2	318750,00	
	Levadura_6	2	318750,00	
	Levadura_9	2	318750,00	
	Sig.		1,000	

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2,000.

Homogeneous Subsets

Granulocitos_7_dias

Tratamientos		N	Subset		
			1	2	3
Duncan ^{a,b}	Levadura_12	2	475000,00		
	Levadura_6	2		1287500,00	
	Levadura_3	2			1768750,00
	Levadura_9	2			1781250,00
	Sig.		1,000	1,000	,913

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2,000.

Homogeneous Subsets

Granulocitos_14_dias

Tratamientos		N	Subset	
			1	2
Duncan ^{a,b}	Levadura_9	2	1137500,00	
	Levadura_12	2	1287500,00	
	Levadura_3	2	1375000,00	1375000,00
	Levadura_6	2		1606250,00
	Sig.		,097	,099

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2,000.

Homogeneous Subsets

Granulocitos_21_dias

Tratamientos		N	Subset		
			1	2	3

Duncan ^{a,b}	Levadura_12	2	631250,00		
	Levadura_9	2	756250,00		
	Levadura_6	2		1806250,00	
	Levadura_3	2			2287500,00
	Sig.		,290	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2,000.

Homogeneous Subsets

Granulocitos_28_dias

Tratamientos		N	Subset		
			1	2	3
Duncan ^{a,b}	Levadura_12	2	637500,00		
	Levadura_3	2		1456250,00	
	Levadura_9	2		1987500,00	
	Levadura_6	2			3143750,00
	Sig.		1,000	,052	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2,000.

Homogeneous Subsets

Semigranulocitos_0_dias

Tratamientos		N	Subset
			1
Duncan ^{a,b}	Levadura_12	2	600000,00
	Levadura_3	2	600000,00
	Levadura_6	2	600000,00
	Levadura_9	2	600000,00
	Sig.		1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2,000.

Homogeneous Subsets

Semigranulocitos_7_dias

Tratamientos		N	Subset		
			1	2	3
Duncan ^{a,b}	Levadura_3	2	4493750,00		
	Levadura_12	2	4712500,00		
	Levadura_6	2		6006250,00	
	Levadura_9	2			8700000,00
	Sig.		,533	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2,000.

Homogeneous Subsets

Semigranulocitos_14_dias

Tratamientos		N	Subset		
			1	2	3

Duncan ^{a,b}	Levadura_3	2	2412500,00		
	Levadura_6	2		3493750,00	
	Levadura_12	2		4218750,00	
	Levadura_9	2			5518750,00
	Sig.		1,000	,092	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2,000.

Homogeneous Subsets

Semigranulocitos_21_dias

Tratamientos		N	Subset			
			1	2	3	4
Duncan ^{a,b}	Levadura_12	2	1275000,00			
	Levadura_9	2		3725000,00		
	Levadura_3	2			5350000,00	
	Levadura_6	2				6912500,00
	Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2,000.

Homogeneous Subsets

Semigranulocitos_28_dias

Tratamientos		N	Subset	
			1	2
Duncan ^{a,b}	Levadura_3	2	4787500,00	
	Levadura_12	2	4943750,00	
	Levadura_9	2	5693750,00	
	Levadura_6	2		10243750,00
	Sig.		,084	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2,000.

Homogeneous Subsets

Hialino_0_dias

Tratamientos		N	Subset
			1
Duncan ^{a,b}	Levadura_12	2	156250,00
	Levadura_3	2	156250,00
	Levadura_6	2	156250,00
	Levadura_9	2	156250,00
	Sig.		1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2,000.

Homogeneous Subsets

Hialino_7_dias

Tratamientos		N	Subset	
			1	2

Duncan ^{a,b}	Levadura_12	2	56250,00	
	Levadura_9	2	93750,00	
	Levadura_3	2	131250,00	
	Levadura_6	2		318750,00
	Sig.		,114	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2,000.

Homogeneous Subsets

Hialino_14_dias

Tratamientos		N	Subset		
			1	2	3
Duncan ^{a,b}	Levadura_9	2	68750,00		
	Levadura_6	2	131250,00		
	Levadura_12	2		356250,00	
	Levadura_3	2			637500,00
	Sig.		,251	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2,000.

Homogeneous Subsets

Hialino_21_dias

Tratamientos		N	Subset
			1
Duncan ^{a,b}	Levadura_9	2	31250,00
	Levadura_12	2	37500,00
	Levadura_6	2	93750,00
	Levadura_3	2	100000,00
	Sig.		,182

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2,000.

Homogeneous Subsets

Hialino_28_dias

Tratamientos		N	Subset	
			1	2
Duncan ^{a,b}	Levadura_12	2	50000,00	
	Levadura_6	2	68750,00	
	Levadura_9	2	81250,00	
	Levadura_3	2		156250,00
	Sig.		,147	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2,000.

Homogeneous Subsets

Atipico_0_dias

Tratamientos	N	Subset
		1

Duncan ^{a,b}	Levadura_12	2	31250,00
	Levadura_3	2	31250,00
	Levadura_6	2	31250,00
	Levadura_9	2	31250,00
	Sig.		1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2,000.

Homogeneous Subsets

Atipico_7_dias

Tratamientos		N	Subset
			1
Duncan ^{a,b}	Levadura_9	2	12500,00
	Levadura_3	2	25000,00
	Levadura_6	2	25000,00
	Levadura_12	2	31250,00
	Sig.		,309

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2,000.

Homogeneous Subsets

Atipico_14_dias

Tratamientos		N	Subset
			1
Duncan ^{a,b}	Levadura_3	2	6250,00
	Levadura_6	2	12500,00
	Levadura_9	2	12500,00
	Levadura_12	2	18750,00
	Sig.		,121

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2,000.

Homogeneous Subsets

Atipico_21_dias

Tratamientos		N	Subset	
			1	2
Duncan ^{a,b}	Levadura_3	2	18750,00	
	Levadura_6	2	18750,00	
	Levadura_9	2	37500,00	37500,00
	Levadura_12	2		56250,00
	Sig.		,190	,184

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2,000.

Homogeneous Subsets

Atipico_28_dias

Tratamientos		N	Subset	
			1	2

Duncan ^{a,b}	Levadura_3	2	18750,00	
	Levadura_6	2	18750,00	
	Levadura_9	2	37500,00	
	Levadura_12	2		112500,00
	Sig.		,257	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2,000.