

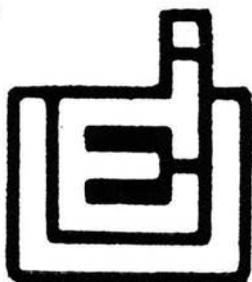


**Universidad Nacional Autónoma de México**

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES  
IZTACALA**

**“ ACTIVIDAD DE LA HEMOLINFA DEL CRUSTACEO  
DECAPODO Procambarus clarkii (acocil) SOBRE  
BACTERIAS PROPIAS Y NO PROPIAS ”**

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
B I O L O G A  
P R E S E N T A  
**MARIA ELENA HERNANDEZ CAMPOS**



LOS REYES IZTACALA

1992

El presente trabajo se realizó en el Lab. de Inmunología Comparada del Depto. de Bioquímica de la Escuela Superior de Medicina del IPN. Bajo la dirección del D.en C. J. Antonio Ramírez Almaraz, y apoyado por el CONACYT con el número de registro 61931.

A MIS PADRES:

Felipe y Cristina, por toda su confianza y apoyo incondicional para llegar a ser, lo que ahora soy.

A MIS HERMANOS:

Cristina, Felipe y Erika, con mucho cariño.

A MIS AMIGOS DE CCH:

Margarita, Paty, Rosa, Juan, Carlos y Jesús, por contar con su gran amistad y apoyo.

A MIS AMIGOS DE LA ENEPI:

Paula, Magy, Alberto, Alfonso, David, Gil, Miguel y Sergio, por los momentos buenos y malos que siempre compartimos.

## AGRADECIMIENTOS

Extiendo mi agradecimiento al D. en C. J. Antonio Ramírez Almaraz por la dirección de la Tesis, por toda su confianza y apoyo en todo momento, y por lo que me ha enseñado para mi formación como profesionista.

A la M. en C. Martha Salcedo A, al M. en C. Agustín Ruíz C, al M. en C. Sergio Vaca y al Biólogo Jesús Medina, por sus críticas y sugerencias en la revisión del presente trabajo.

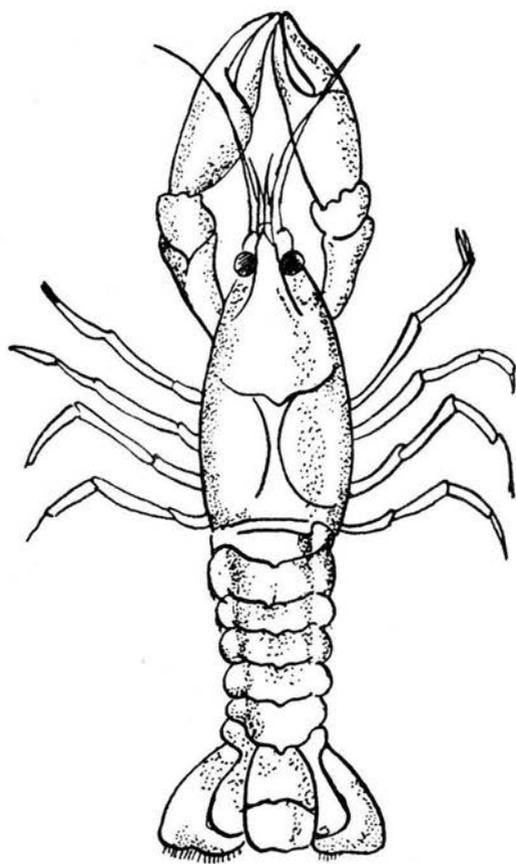
Al Dr. José T. Suárez Rocha por la oportunidad que me brindó para realizar la Tesis en el Depto. de Bioquímica de la ESM-IPN, y por toda su ayuda recibida.

Al M. en C. J. Humberto Lanz Mendoza del CINVESTAV, por haberme proporcionado los acociles utilizados y por su orientación en las discusiones del presente trabajo.

A la Q.B.P. Graciela Castro Escarpulli de la E.N.C.B.-IPN, por la identificación de las bacterias presentes en *Procambnarus clarkii*.

Al Pasante de Biología Francisco Bravo Moreno, por los magníficos dibujos que elaboró.

A todas las personas que contribuyeron en la elaboración del presente trabajo. G R A C I A S.



*Procamborus clarkii*

A C O C I L

## INDICE

RESUMEN .....	1
INTRODUCCION .....	2
ANTECEDENTES .....	8
JUSTIFICACION .....	11
OBJETIVOS .....	14
MATERIALES Y METODOS .....	15
RESULTADOS .....	22
DISCUSION .....	29
CONCLUSIONES .....	38
BIBLIOGRAFIA .....	39

## RESUMEN

En el presente trabajo se detectó la actividad aglutinante de la hemolinfa de *Procambarus clarkii* (acocil) sobre bacterias propias y no propias.

Las bacterias no propias, fueron obtenidas de pacientes con diversos cuadros clínicos de infección; las propias se aislaron de cutícula, branquias, hepatopáncreas e intestino. Todas las bacterias presentes en el acocil se caracterizaron por habitar fuentes naturales de agua, suelo y no se consideran patógenas, a excepción de *Aeromonas hydrophila*, reportada como patógena para organismos dulceacuícolas.

Se estudió la capacidad aglutinante de la hemolinfa del acocil y se encontro que ninguna de las bacterias propias fué aglutinada; de las no propias, sólo aglutinó a: *Lactobacillus*, *Staphylococcus aureus* cepas SEA y MS-76 y *Streptococcus pyogenes* ( $\beta$ -hemolítico).

También se observó que la hemolinfa no inhibió el desarrollo del crecimiento de las bacterias mencionadas.

La capacidad del acocil para eliminar diferentes especies de bacterias, se analizó al inocular dichas bacterias a tres diferentes concentraciones: 1)  $0.3 \times 10^8$  UFC/mL, 2)  $0.6 \times 10^8$  UFC/mL y 3)  $0.9 \times 10^8$  UFC/mL. Sólo *Aeromonas hydrophila* fué capaz de matar a los acociles inoculados con las concentraciones de los incisos 2 y 3.

## INTRODUCCION

Han sido descritas más de un millón de especies animales, de las cuales el 5 % aproximadamente poseen columna vertebral, por lo que se designan con el nombre de vertebrados. Las especies restantes, que comprenden el 95 % del reino animal son invertebrados. Entre las 31,312 especies conocidas del subfilo Crustácea, se encuentran muchos organismos muy comunes, como los cangrejos, camarones, langostas, langostinos y cochinillas de la humedad. Además, hay miríadas de crustáceos diminutos que viven en los mares, lagos y lagunas del mundo entero y ocupan una posición básica en las cadenas tróficas alimenticias acuáticas (Barnes 1986).

Los artrópodos son el grupo de organismos que más éxito han tenido dentro del reino animal, tomando como base el gran número de ellos, su diversidad de especies, el amplio rango de habitats que ocupan y la gran diversidad de alimento que consumen. Muchos investigadores consideran que el éxito de los invertebrados es producto más de su gran capacidad reproductora que de su capacidad de adaptación y respuesta del medio ambiente (Rosales 1987).

La Clase Malacostraca es la más importante entre los artrópodos, que es principalmente acuática. Casi todos los crustáceos son marinos, pero hay también muchas especies dulceacuícolas.

En lo que se refiere a su filogenia, los crustáceos, tanto entomostráceos como malacostráceos, existen desde el periodo Cámbrico, pero su origen y sus relaciones con los demás grupos de artrópodos son obscuras (Barnes 1986).

Esta clase, posee el orden decápoda del cual se conocen alrededor de 8,500 especies, y su tamaño es muy variable dependiendo del hábitat en que se desarrollen.

La forma del cuerpo es muy diferente y está determinada por su forma de vida y habitat, pero todos los decápodos se caracterizan por poseer tres secciones o tagmas que son: pereión, pleón y telson (Figura 1).

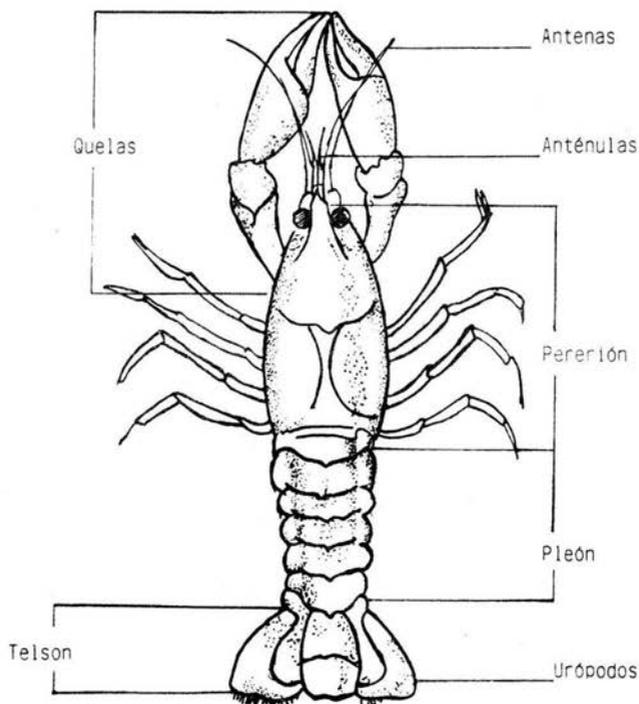


Figura 1. Anatomía del acocíl Procambarus clarkii.

En el pereión se encuentra básicamente un par de ojos pedunculados, un par de anténulas unirrámeas y un par de antenas birrámeas. Ventralmente se observan las mandíbulas, las maxilulas, y las maxilas que tienen una función trófica. En seguida, se encuentran tres pares de maxilípedos que corresponden a los tres primeros segmentos fusionados del pereión, los cuales los toracópodos han perdido su función ambulatoria y se han transformado en alimentadores. Detrás de estos últimos, se observan cinco pares de apéndices locomotores llamados pereiópodos, que son además portadores de las branquias.

La siguiente sección, el pleón, posee seis segmentos que llevan un par de apéndices por segmento denominados pleópodos (a excepción del último segmento), y que puede funcionar para la natación. En el caso de los machos, el primer par se transforma en gonópodos o petasmas, que son órganos copuladores, y en las hembras, del segundo al quinto par pueden desarrollarse para llevar los huevecillos. Sin embargo, de acuerdo a los hábitos que tenga el organismo estos apéndices pueden estar modificados de diversas formas.

Por último, se encuentra un par de apéndices birrámeos muy desarrollados denominados urópodos, localizados en el último segmento del pleón y que sirven para la propulsión junto con el telson.

El acocil se encuentra en las aguas dulces de todos los continentes. En el mundo, existen más de 300 especies de estos; la variación es muy extensa en cuanto a color y tamaño, se encuentran acociles con diversas tonalidades, de amarillo, azul, rojo o verde. Igualmente extensa es la variación en cuanto a tamaño.

La temporada de reproducción del acocil generalmente ocurre a fines de Mayo o principios de Junio, en aguas abiertas como arroyos y ríos. En el medio silvestre, un acocil puede crecer cerca de 8 mm en cada muda, y son 11 mudas para madurar completamente lo que significa un tamaño máximo de 8 a 10 cm.

Los acociles son omnívoros, es decir, comen materia vegetal o animal, viva o muerta. Prefieren la carne fresca y se usa frecuentemente como carnada. Generalmente, cerca del 20 % de la dieta del acocil consiste en gusanos, larvas de insectos y otro tipo de materia relativamente inactiva. El material vegetal también contiene grandes cantidades de organismos microscópicos, particularmente cuando esta en proceso de descomposición y durante el proceso, el contenido de proteínas es considerablemente más alto debido a este material animal.

Los países con mayor demanda de acociles son Francia y Estados Unidos, y en éste Louisiana es el área de mayor producción y consumo (Davis 1987).

La especie de *Procambarus clarkii* pertenece a la clase malacostraca, orden decápoda, suborden pleocymata e infraorden astacidea. Dentro de este orden se encuentran muchos organismos de importancia comercial como los camarones, las jaibas, las langostas, los langostinos, etc; estas especies constituyen una fuente alternativa de alimento, empleos, y divisas para beneficio de nuestro país.

La respuesta inmunitaria con sus características de especificidad, inducibilidad, memoria y transferibilidad, es exclusiva de los vertebrados. Estas características, son el producto de cambios del sistema inmune a través del tiempo.

Se sugiere, que el origen de este sistema ocurrió durante la evolución de protozoarios a metazoarios, cuando las células de estos últimos adquieren la capacidad de unirse entre sí por receptores para determinantes propios (Kolb 1975). Por otro lado, Rotenberg (citado por Cooper 1982) considera que la inmunidad comienza con la habilidad de las células fagocíticas para distinguir lo propio de lo extraño, y este reconocimiento es regulado por carbohidratos que se encuentran en la superficie de las células.

Los invertebrados poseen respuestas de tipo humoral y celular, si bien no podemos hablar de verdadera respuesta inmune, pues no son específicas ni inducibles. La respuesta humoral se lleva a cabo en los artrópodos por la presencia en su hemolinfa, de diversas sustancias capaces de aglutinar, opsonizar y lisar eritrocitos.

Es muy poco lo que se sabe de las características de la hemolinfa de los acociles. Los estudios realizados por Lanz y Ramírez (1988), muestran que posee capacidad para aglutinar eritrocitos humanos tipos A, B, O, y de ratón, rata, conejo y cobayo, con diferente intensidad. Estudios de absorción realizados por los mismos autores muestran, la existencia de más de una aglutinina sin determinar el número total de estas.

Hasta la fecha, no hay ningún reporte o estudio general sobre la flora bacteriana presente en este acocil, lo que hace a esta labor totalmente original y de suma importancia, ya que estos organismos son considerados como una fuente alterna de alimentación para el hombre, y aún no se sabe si presenta flora patógena para ellos para el ser humano, y si tienen mecanismos de defensa efectivos contra dicha flora.

## ANTECEDENTES

Dado que es muy escasa la información que se tiene acerca de la flora bacteriana e inmunidad de los acociles, se debe recurrir a otros trabajos realizados con diferentes artrópodos.

En 1964 Gingrich demostró, que el hemíptero *Ancolpitus faciatius* puede producir una lisina para *Pseudomonas aeruginosa*, después del reto con una dosis simple de antígeno preparado con la bacteria muerta por calor.

En 1970 Mc. Kay y Jenkin, fueron los primeros que analizaron la capacidad fagocítica de las células sanguíneas (hemocitos) del acocil *Parachaeraps bicarinatus* in vitro, demostrando que la fagocitosis dependía de factores que se encontraban en la superficie de los hemocitos o presentes en la hemolinfa.

En 1972 Stang-Voss estudió las características ultraestructurales de las células hialinas y granulares en el acocil europeo *Astacus astacus*, en el que se observan células carentes de granulaciones en el citoplasma (hialinas), a las que se les atribuyen funciones fagocíticas y células con gránulos de diferentes tamaños que podrían participar en la coagulación y liberación de lectinas.

En 1972 Fingerman, menciona que el exoesqueleto de algunos crustáceos actúa como una barrera funcional contra el ataque de bacterias patógenas.

En 1973 Manning realizó estudios de la fagocitosis en amibas, las cuales pueden reconocer y no agredir individuos de su misma especie, y sin embargo fagocitan células extrañas. En este mismo año Tyson al igual que Prowse (1969) estudiaron la fagocitosis en anélidos, moluscos e insectos y observaron que la fagocitosis se ve incrementada por la presencia en la hemolinfa de sustancias opsonizantes.

En 1975 Tripp menciona que muchos invertebrados contienen en su hemolinfa factores capaces de lisar bacterias, protozoarios y eritrocitos de diferentes vertebrados. En 1975 Sloan, trabajó con el acocil *Procambarus clarkii*, demostrando que éste puede reconocer y eliminar de la circulación diferentes proteínas.

En 1981 Soderhall observó que en ocasiones, la activación del sistema profenol oxidasa (PpO) da como resultado la melanización del material extraño. La melanina inhibe a las quitinasas y proteasas microbianas y protege al animal contra la luz ultravioleta. Al siguiente año, mostró que la activación del sistema PpO también da como resultado la generación de proteínas opsonizantes que se pegan a la superficie del material extraño, funcionando como marcadores de superficie.

Fuke en 1982 y Buscena, Lackie y Langlet en 1983, Trabajaron sobre el reconocimiento de lo propio y extraño en invertebrados como protozoarios, esponjas, corales, anélidos y tunicados.

En 1984 Rouger reportó que las lectinas que se encuentran comprometidas en la defensa de los invertebrados, son capaces de aglutinar diferentes tipos celulares como eritrocitos, bacterias y espermatozoides, y su función puede ser inhibida con carbohidratos. En 1985 Cameron menciona que algunos crustáceos secretan cera en su cutícula, que les proporciona protección contra ataques bacterianos.

En 1985 Ratcliffe, reportó que la lisozima, lisina de invertebrados, rompe la pared celular de diferentes bacterias. Además, inyectó a la pupa de la polilla *Hyalophora cecropia* dosis bajas de bacterias no patógenas, y detectó 15 proteínas nuevas en la hemolinfa.

En 1985 Ravindranath *et al.* proponen que las lectinas participan en la fagocitosis de bacterias que presentan ácido siálico en su superficie, pues observó que el suero de *C. antennarius* podía aglutinar una variante de la cepa *Escherichia coli* K1 que tenía en su superficie ácido siálico, pero no aglutinaba a la variante que no la presentaba.

En 1988 Lanz y Ramírez realizaron un trabajo sobre la actividad de la hemolinfa de *Procambarus clarkii* para aglutinar eritrocitos de diversas especies, y encontraron que la aglutinación es selectiva para algunos de ellos.

En 1988 Vázquez observó en la hemolinfa de *Cambarellus sp.* *Procambarus clarkii* y *Macrobrachium rosenbergii* la presencia de lectinas con especificidad para el ácido siálico.

## JUSTIFICACION

En México, la especie *Procambarus clarkii* es poco conocida y por lo tanto su explotación y comercialización, aunque ya se lleva a cabo, es muy baja debido a la escasa información que se tiene respecto a las cualidades alimenticias.

Cuando una nueva especie de crustáceos es considerada apta para el cultivo, se debe desarrollar un sistema adecuado para su producción y no olvidar el riesgo de aparición de epizootias (Bardach 1986, Bautista 1987).

Los acociles son organismos de fortaleza evidente. Su resistencia a las enfermedades es superior a la de muchos otros animales (Davis 1987).

Las enfermedades no son las únicas dificultades que se pueden presentar en los cultivos, si no que también algunos de los productos y compuestos utilizados en el tratamiento y control de las infecciones, como la furazolidona, nitrofluorazona y cloramfenicol pueden ser tóxicos para el hombre, ya que la mayoría de los productos obtenidos a través de la acuicultura son destinados al consumo humano (Bardach 1986, Bautista 1987).

Los estudios del efecto de la hemolinfa sobre los eritrocitos de diversas especies son un antecedente útil, pero poco representativo de los sistemas de defensa del acocil.

Es evidente que las bacterias son antígenos mucho más naturales que los eritrocitos, pues se encuentran en su organismo y el medio ambiente en que se desenvuelve, por lo que es importante estudiar la flora bacteriana presente en *Procambarus clarkii* y la acción ejercida contra ella por la hemolinfa.

Esto en comparación con la aglutinación ejercida contra otro tipo de bacterias no relacionadas con las anteriores, a fin de analizar como se defiende esta especie, de los retos bacterianos.

Es necesaria la investigación sobre los mecanismos de defensa (respuesta inmune) de invertebrados decápodos, para obtener conocimientos que sirvan como base a las posibles soluciones de los problemas mencionados y aumentar los conocimientos sobre la aparición y desarrollo de la respuesta inmunitaria.

En el presente trabajo, se determina el tipo de bacterias presentes en el acocil, se detecta la actividad aglutinante de la hemolinfa sobre dichas bacterias, se estudia su capacidad para aglutinar, lisar o inhibir el desarrollo bacteriano.

Esto dara una idea del grado del desarrollo de la respuesta inmune en estos animales, en comparación con la ya conocida de algunos otros artrópodos, y así tener una visión más amplia y completa, de la evolución de la respuesta inmunitaria.

En caso de encontrar capacidad bacteriolítica en la hemolinfa de *Procambarus clarkii*, esto abriría un nuevo campo en el estudio de los reactivos biológicos, ya que se puede tratar de la existencia de un nuevo bacteriostático o inclusive un antibiótico. En este caso también podría servir como reactivo para identificar ciertas bacterias, como sucede con *Limulus polyphemus* cuya hemolinfa sirve para detectar la presencia de pirógenos.

## OBJETIVOS

- 1) Determinar la identidad de las bacterias presentes en:
  - a) Cutícula.
  - b) Branquias.
  - c) Hepatopáncreas.
  - d) Intestino.
  
- 2) Detectar la capacidad aglutinante de la hemolinfa de *Procambarus clarkii* sobre bacterias propias.
  
- 3) Detectar la capacidad aglutinante de la hemolinfa de *Procambarus clarkii* sobre bacterias no propias.
  
- 4) Estudiar la capacidad de la hemolinfa, para inhibir el desarrollo de cepas bacterianas propias y no propias.
  
- 5) Investigar la capacidad de la hemolinfa, para regular la infección del acocil por bacterias propias y ajenas.

## MATERIALES Y METODOS

### ANIMALES.

Se utilizaron acociles adultos de aproximadamente 8 a 10 cm de longitud, originarios del río Conchos, Chihuahua, donados por el CINVESTAV (Figura 2).

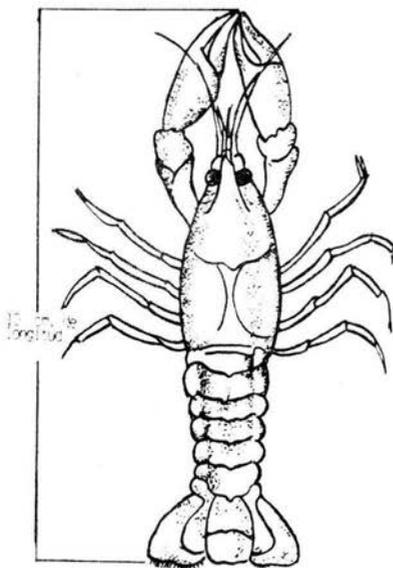


Figura 2. Acocili adulto que mide aproximadamente de 8 a 10 cm. de longitud.

Para determinar el tipo de flora presente en *Procambarus clarkii* se utilizaron 30 acociles, para detectar la capacidad aglutinante de la hemolinfa y estudiar la inhibición del desarrollo bacteriano se sangraron 40 acociles y en el caso de la inoculación de bacterias se utilizaron 36 acociles.

#### MEDIOS DE CULTIVO.

Se disolvió agar BHI en agua destilada, y se esterilizó en autoclave; después se pasaron 10 mL en cajas Petri estériles de plástico desechables, de 90 mm de diámetro, hasta gelificación. Lo mismo se hizo con el agar Nutritivo. Para la prueba de esterilidad de los medios de cultivo, la mitad de las cajas Petri, se colocaron en la estufa a 37° C y la otra mitad a temperatura ambiente, dejando pasar un lapso de 2 a 3 días para ver si había desarrollo de bacterias y de 4 a 5 días para el caso de hongos.

#### TOMA Y SIEMBRA DE MUESTRAS.

Para sembrar las muestras de cutícula se utilizó al organismo vivo, y con asa metálica estéril se tomó muestra en la parte dorsal del organismo (caparazón). Se sembró por duplicado en cajas Petri (Figura 3).

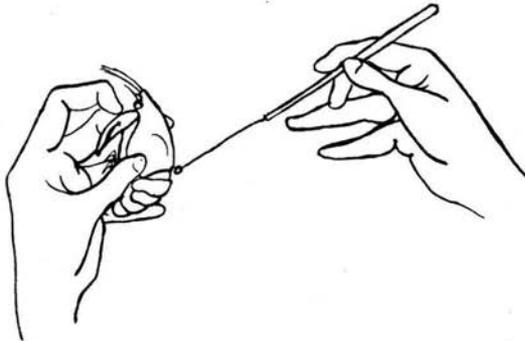


Figura 3. Toma de la muestra de bacterias presentes en cutícula por medio de una asa de siembra estéril y sembrada posteriormente en agar BHI



Figura 4. Toma de la muestra de bacterias presentes en branquias mediante una asa de siembra estéril. En el diagrama se muestra las branquias una vez separado el pericón.

Después se sacrificó al organismo y se quitó parte del caparazón, para tomar la siguiente muestra que fué la de las branquias la cual se realizó de la misma manera que en cutícula (Figura 4).

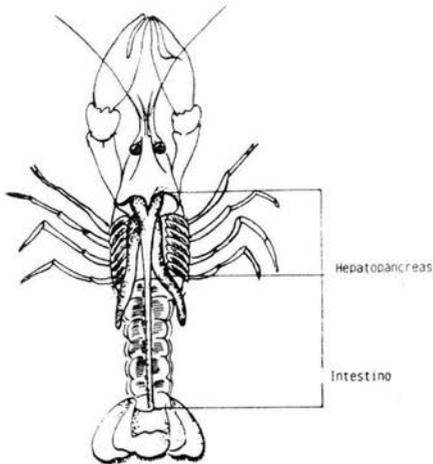


Figura 5. Diagrama del hepatopáncreas e intestino en estos órganos se tomaron las muestras para cultivo bacteriano.

En seguida se realizó la disección con la ayuda de pinzas y tijeras estériles, quitando primero todo el caparazón para levantar parte del tejido y localizar el hepatopáncreas e intestino (Figura 5).

La muestra del hepatopáncreas se tomó y se sembró igual que las de cutícula y branquias. En seguida, se extrajo todo el intestino que mide aproximadamente 3 cm y se colocó en un homogenizador de tejidos estéril con 10 mL de solución salina amortiguadora de fosfatos estéril (PBS). Se homogeniza con el émbolo y se pasó el líquido a un tubo de ensayo estéril con tapón de rosca, y se centrifugó a 5,000 rpm durante 5 minutos. Después se tomó la muestra del sobrenadante y se sembró, se tiró el sobrenadante y se tomó muestra de la pastilla que también se sembró. La pastilla fue resuspendida con PBS estéril y se volvió a centrifugar igual, para sembrar de nuevo.

La mitad de las cajas con muestra de cutícula, branquias, hepatopáncreas e intestino, se incubaron a temperatura ambiente, y la otra mitad de cajas se colocaron en frascos grandes de vidrio, con boca ancha y tapa, metiendo trescajas Petri y una vela encendida por frasco, sellando con plastilina, para que se consumiera el mayor oxígeno posible, y poder crear un ambiente microaerofílico. Se describió la morfología macroscópica a las 24, 48 y 72 horas.

Dichas colonias se aislaron y se volvieron a incubar otras 72 horas, a cuyo término se sembraron en gelosa sangre para su identificación y pruebas bioquímicas, y después se conservaron en el refrigerador.

Las bacterias se ajustaron en PBS estéril a una concentración de  $0.3 \times 10^8$  UFC/mL determinada mediante el Nefelómetro de Mc.Farland. Dicha concentración se usó para las pruebas de aglutinación.

Las bacterias no propias del organismo, utilizadas en los estudios comparativos de aglutinación fueron: *Bacillus subtilis*, *Candida sp.*, *Enterobacter aerógenes*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus sp.*, *Pseudomonas*, *Salmonella thyphimurum*, *Streptococcus aureus* cepas 100-A, 204, SEA y MS-76,, *Streptococcus pyogenes* B-hemolítico y *Lactobacillus*. Donadas por el departamento de Microbiología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas y de Los Laboratorios El Chopo, obtenidas de pacientes con diversos cuadros clínicos de infecciones, ajustadas a las mismas concentraciones que las anteriores.

#### OBTENCION DE LA HEMOLINFA.

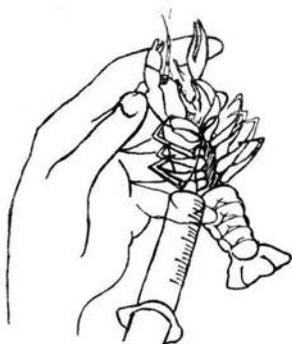


Figura 6. Obtención de la hemolinfa. Se utiliza jeringa de 3 mL con aguja del # 22 que se inserta en la articulación proximal de la quela. Aquí se localiza una membrana, la cual se perfora y se extrae de 0.5 a 1.5 mL de hemolinfa en los ejemplares más grandes.

Se usaron jeringas desechables estériles, con agujas del número 22, que se insertaron en la articulación proximal de las quelas, y se obtuvo la hemolinfa (Figura 6). Se colocó en un homogenizador de tejidos estéril, hasta tener una cantidad considerable de hemolinfa (dependiendo de cada organismo, se obtuvo aproximadamente 0.5 a 1.5 mL), y se dejó coagular. Se maceró el coágulo y se filtró. Se hicieron alícuotas que se conservaron en el refrigerador para utilizarse antes de 1 semana.

## AGLUTINACION.

Se hizo en placas de plástico, con 96 pozos con fondo en "U". En los primeros pozos de cada fila, se colocaron 200  $\mu\text{L}$  de la hemolinfa y en el resto de los pozos, se colocaron 100  $\mu\text{L}$  de PBS estéril (Figura 7).

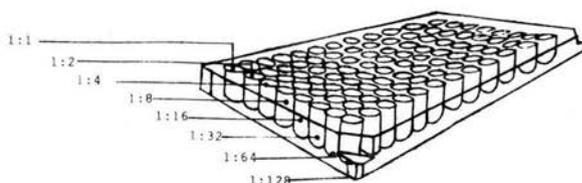


Figura 7. Placa de plástico con fondo en "U" con sus respectivas diluciones para hacer las pruebas de aglutinación.

Después se hizo una dilución seriada de la hemolinfa: 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, hasta 1:128. A cada pozo, se le agregaron 100  $\mu\text{L}$  de una concentración de  $0.3 \times 10^8$  UFC/mL de bacterias propias y no propias diluidas en PBS estéril. A cada bacteria se le hizo su respectivo control, colocando sólo la bacteria sin hemolinfa en los pozos, para ver que no hubiera una autoaglutinación. Se cubrió la placa con papel egapak, y se conservó en refrigeración para leer al día siguiente.

## INHIBICION DEL DESARROLLO BACTERIANO.

Las bacterias propias y no propias del acocil se diluyeron en PBS estéril a una concentración final de  $3.0 \times 10^9$  UFC/mL. Se tomó una alícuota de 5  $\mu$ L que se agregó a 5  $\mu$ L de hemolinfa en los pozos de la placa de cultivo. Como grupo control a las bacterias en lugar de hemolinfa se le agregaron 5  $\mu$ L de PBS estéril. De estas suspensiones se tomó una muestra con una asa estéril y se sembró en agar BHI a temperatura ambiente. Se revisó el crecimiento a las 24, 48 y 72 horas y se comparó con el grupo control.

## INOCULACION DEL ACOCIL CON BACTERIAS PROPIAS Y AJENAS.

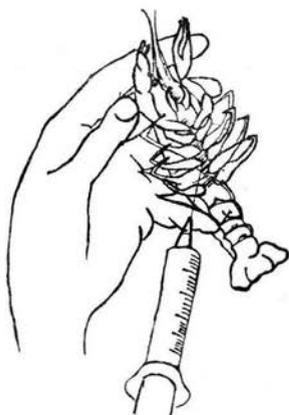


Figura 8 Inoculación de bacterias. Se inyectaron 0.5 mL de las diferentes bacterias en el espacio linfático. Previamente se extraen 0.5 mL de hemolinfa para evitar sobrecarga de líquidos.

Se tomaron 0.5 mL de bacterias patógenas para el hombre las cuales fueron: *S. aureus* cepas SEA y MS-76, y *S. pyogenes* ( $\beta$ -hemolítico); y 0.5 mL de bacterias presentes en el acocil las cuales fueron: *A. hydrophila*, *C. tritici* y *E. agglomerans*. Dichas bacterias fueron diluidas en PBS estéril a las siguientes concentraciones: 1)  $0.3 \times 10^8$  UFC/mL, 2)  $0.6 \times 10^8$  UFC/mL y 3)  $0.9 \times 10^8$  UFC/mL, inyectando cada concentración a dos acociles respectivamente (Figura 8). Al grupo control, sólo se le inoculó 0.5 mL de PBS estéril, y se anotó la sobrevivencia de los acociles a las 24, 48 y 72 horas.

## RESULTADOS

Flora bacteriana presente en *Procambarus clarkii*.

Las especies de bacterias que predominaron en cutícula fueron: *Enterobacter aerogenes* y *Klebsiella pneumoniae*, y para branquias fué *Enterobacter agglomerans*. En branquias las especies *Acinetobacter polymorpha*, *Enterobacter hafniae* y *Haemophilus aphrophilus*, se encontraron una sólo vez en un mismo acocil (Cuadros 1 y 2).

Cuadro 1. Bacterias presentes en cutícula.

Especies	No. de veces encontrada
<i>Enterobacter aerogenes</i>	30
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	30
<i>Enterobacter cloacae</i>	23
<i>Corynebacterium kutscheri</i>	20
<i>Corynebacterium violaceum</i>	20
<i>Bacillus sphaericus</i>	17
<i>Aeromonas hydrophila</i>	5

Cuadro 2. Bacterias presentes en branquias.

Especies	No. de veces encontrada
<i>Enterobacter agglomerans</i>	30
<i>Enterobacter aerogenes</i>	24
<i>Corynebacterium tritici</i>	20
<i>Corynebacterium kutscheri</i>	19
<i>Corynebacterium violaceum</i>	15
<i>Aeromonas hydrophila</i>	5
<i>Acinetobacter polymorpha</i>	1 Δ
<i>Enterobacter hafniae</i>	1 Δ
<i>Haemophilus aphrophilus</i>	1 Δ

Δ Especie de bacteria encontrada en un mismo acocil.

En hepatopáncreas e intestino, predominaron tres especies de bacterias, teniendo en común a *Enterobacter agglomerans* y *Escherichia coli*. La especie *Enterobacter cloacae* sólo se encontró en hepatopáncreas, mientras que *Bacillus sphaericus*, *Micrococcus roseus* y *Sarcina rubidae*, se encontraron una sólo vez en un mismo acocil (Cuadros 3 y 4).

Cuadro 3. Bacterias presentes en hepatopáncreas.

Especies	No. de veces encontrada
<i>Enterobacter agglomerans</i>	30
<i>Enterobacter cloacae</i>	30
<i>Escherichia coli</i>	30
<i>Corynebacterium tritici</i>	19
<i>Acinetobacter polymorpha</i>	12
<i>Aeromonas hydrophila</i>	5
<i>Bacillus sphaericus</i>	1 Δ
<i>Micrococcus roseus</i>	1 Δ
<i>Sarcina rubidae</i>	1 Δ

Δ Especie de bacteria encontrada en un mismo acocil.

Cuadro 4. Bacterias presentes en intestino.

Especies	No. de veces encontrada
<i>Enterobacter aerogenes</i>	30
<i>Enterobacter agglomerans</i>	30
<i>Escherichia coli</i>	30
<i>Enterobacter cloacae</i>	22
<i>Corynebacterium violaceum</i>	18
<i>Corynebacterium tritici</i>	15
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	12
<i>Aeromonas hydrophila</i>	5
<i>Bacillus sphaericus</i>	1 Δ
<i>Micrococcus roseus</i>	1 Δ
<i>Sarcina rubidae</i>	1 Δ

Δ Especie de bacteria encontrada en un mismo acocil.

### Aglutinación:

Las pruebas de aglutinación con las bacterias presentes en el acocil resultaron negativas en todos los casos, incluyendo a *Aeromonas hydrophila* la cual es la única especie patógena encontrada (Cuadro 5).

Cuadro 5. Aglutinación con bacterias presentes en el acocil.

Especies	Aglutinación (*)
<i>Aeromonas hydrophila</i>	(—)
<i>Acinetobacter polymorpha</i>	(—)
<i>Bacillus sphaericus</i>	(—)
<i>Corynebacterium diversus</i>	(—)
<i>Corynebacterium kutscheri</i>	(—)
<i>Corynebacterium violaceum</i>	(—)
<i>Enterobacter aerogenes</i>	(—)
<i>Enterobacter agglomerans</i>	(—)
<i>Enterobacter cloacae</i>	(—)
<i>Enterobacter hafniae</i>	(—)
<i>Escherichia coli</i>	(—)
<i>Haemophilus aphrophilus</i>	(—)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	(—)
<i>Micrococcus roseus</i>	(—)
<i>Sarcina rubidae</i>	(—)
(—) No hubo aglutinación.	

(\*) Todas las aglutinaciones se hicieron desde la dilución 1:1 hasta 1:128.

En el caso de las pruebas de aglutinación con bacterias no propias del acocil, aisladas de pacientes con cuadros clínicos de infección, la hemolinfa sólo aglutinó a: *Lactobacillus*, *Staphylococcus aureus* cepas 100-A y MS-76, y *Streptococcus pyogenes* ( $\beta$ -hemolítico) (Cuadro 6).

Cuadro 6. Aglutinación con bacterias patógenas del hombre.

Especies	Aglutinación
<i>Bacillus subtilis</i>	(—)
<i>Candida sp</i>	(—)
<i>Enterobacter aerogenes</i>	(—)
<i>Escherichia coli</i>	(—)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	(—)
<i>Proteus sp</i>	(—)
<i>Pseudomonas auruginosa</i>	(—)
<i>Salmonella thiphimurum</i>	(—)
<i>Staphylococcus aureus</i> cepa 204	(—)
<i>Streptococcus pyogenes</i> ( $\beta$ -hemolítico) gpo B	(—)
<i>Lactobacillus</i>	( + ) 1:128
<i>Streptococcus pyogenes</i> ( $\beta$ -hemolítico)	( + ) 1:32
<i>Staphylococcus aureus</i> cepa SEA	( + ) 1:128
<i>Staphylococcus aureus</i> cepa MS-76	( + ) 1:128
<i>Staphylococcus aureus</i> cepa 100-A	( + ) 1:128
(—) Especies de bacterias no aglutinadas	
( + ) Especies de bacterias aglutinadas hasta la dilución indicada.	

Inhibición del crecimiento bacteriano:

Las pruebas de inhibición del crecimiento bacteriano resultaron negativas, tanto para todas las bacterias presentes en el acocil como para todas las bacterias aisladas de pacientes con cuadros clínicos de infección (Cuadro 7).

Cuadro 7. Inhibición del crecimiento bacteriano.

Especies de bacterias	Inhibición
<i>Aeromonas hydrophila</i>	(—)
<i>Acinetobacter polymorpha</i>	(—)
<i>Bacillus sphaericus</i>	(—)
<i>Bacillus subtilis</i>	(—)
<i>Candida sp</i>	(—)
<i>Corynebacterium diversus</i>	(—)
<i>Corynebacterium kutscheri</i>	(—)
<i>Corynebacterium tritici</i>	(—)
<i>Corynebacterium violaceum</i>	(—)
<i>Enterobacter aerogenes</i>	(—)
<i>Enterobacter agglomerans</i>	(—)
<i>Enterobacter cloacae</i>	(—)
<i>Enterobacter hafniae</i>	(—)
<i>Escherichia coli</i>	(—)
<i>Haemophilus aphrophilus</i>	(—)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	(—)
<i>Lactobacillus sp</i>	(—)
<i>Micrococcus roseus</i>	(—)
<i>Proteus sp</i>	(—)
<i>Pseudomonas auruginosa</i>	(—)
<i>Sarcina rubidae</i>	(—)
<i>Staphylococcus aureus</i> cepa SEA	(—)
<i>Staphylococcus aureus</i> cepa MS-76	(—)
<i>Staphylococcus aureus</i> cepa 100-A	(—)
<i>Streptococcus pyogenes</i> ( $\beta$ -hemolítico) gpo. B	(—)
<i>Streptococcus pyogenes sp</i>	(—)
(—) No hubo inhibición del crecimiento bacteriano.	

Todas las bacterias tuvieron un desarrollo normal a las 24, 48 y 72 horas.

Inoculación de bacterias:

Las bacterias presentes en *P. clarkii* inoculadas fueron: *Aeromonas hydrophila*, *Enterobacter cloacae* y *Corynebacterium tritici*. De los 18 acociles utilizados para la inoculación de bacterias propias, sólo 4 acociles no pudieron regular la infección provocada por *Aeromonas hydrophila* (Cuadro 8).

Cuadro 8. Inoculación de bacterias presentes en *P. clarkii*.

Especie	Dosis inoculada	Sobrevivencia en horas		
		24	48	72
<i>Aeromonas hydrophila</i>	1) $0.3 \times 10^8$ UFC/mL	Δ	Δ	Δ
	2) $0.6 \times 10^8$ UFC/mL	Δ	†	
	3) $0.9 \times 10^8$ UFC/mL	†		
<i>Enterobacter agglomerans</i>	1) $0.3 \times 10^8$ UFC/mL	Δ	Δ	Δ
	2) $0.6 \times 10^8$ UFC/mL	Δ	Δ	Δ
	3) $0.9 \times 10^8$ UFC/mL	Δ	Δ	Δ
<i>Corynebacterium tritici</i>	1) $0.3 \times 10^8$ UFC/mL	Δ	Δ	Δ
	2) $0.6 \times 10^8$ UFC/mL	Δ	Δ	Δ
	3) $0.9 \times 10^8$ UFC/mL	Δ	Δ	Δ
Δ	Acociles vivos.			
†	Acociles muertos.			

Las bacterias no propias de *P. clarkii* inoculadas fueron: *Staphylococcus aureus* cepas SEA y MS-76, y *Streptococcus pyogenes* ( $\beta$ -hemolítico). Los 18 acociles inoculados sobrevivieron a las dosis inoculadas (Cuadro 9).

Cuadro 9. Inoculación de bacterias no propias de *P. clarkii*.

Especies	Dosis inoculadas	Sobrevivencia en horas		
		24	48	72
<i>S. aureus</i> cepa SEA	1) $0.3 \times 10^8$ UFC/mL	Δ	Δ	Δ
	2) $0.6 \times 10^8$ UFC/mL	Δ	Δ	Δ
	3) $0.9 \times 10^8$ UFC/mL	Δ	Δ	Δ
<i>S. aureus</i> cepa MS-76	1) $0.3 \times 10^8$ UFC/mL	Δ	Δ	Δ
	2) $0.6 \times 10^8$ UFC/mL	Δ	Δ	Δ
	3) $0.9 \times 10^8$ UFC/mL	Δ	Δ	Δ
<i>S. pyogenes</i> ( $\beta$ -hemolítico)	1) $0.3 \times 10^8$ UFC/mL	Δ	Δ	Δ
	2) $0.6 \times 10^8$ UFC/mL	Δ	Δ	Δ
	3) $0.9 \times 10^8$ UFC/mL	Δ	Δ	Δ
Δ Acociles vivos.				

## DISCUSION

Especies de bacterias presentes en *Procambarus clarkii*.

El acocil utilizado en el presente trabajo habita en el río Conchos, Chihuahua, ambiente dulceacuícola que presenta un gran contenido de nutrimentos, debido a la presencia de organismos fotosintetizadores que utilizan energía de la luz para la producción inicial de materia orgánica; dichos organismos se denominan productores primarios. Los productores primarios determinan el rendimiento de producción de los ríos. En este río en particular existe una abundante producción natural de estos acociles.

El cuerpo del acocil *Procambarus clarkii* proporciona un ambiente favorable para el desarrollo de microorganismos, ya que es rico en nutrimentos orgánicos y factores de crecimiento requeridos por los heterótrofos. Suministra condiciones relativamente constantes de pH y presión osmótica. Sin embargo este ambiente no es uniforme. Cada región y órgano del acocil como cutícula, branquias, hepatopáncreas e intestino, difieren en su química y física, y por lo tanto suministran distintos ambientes donde ciertos tipos de bacterias son favorecidos y otros no.

El primer sitio elegido para la toma de muestra, fué la cutícula, la cual es de una gran importancia por formar parte del exoesqueleto que se encuentra endurecido por el depósito de sales calcáreas, y se caracteriza por su alto contenido de quitina. Aquí se da el primer contacto directo del acocil con su medio ambiente exterior.

El siguiente órgano, las branquias, se localiza en los apéndices locomotores llamados pereiópodos, mediante los cuales se lleva a cabo la respiración. Este proceso se efectúa por medio de la filtración del agua, y debido a esto, los microorganismos presentes en ella se concentran en las branquias. Otro de los órganos estudiados fué el hepatopáncreas, el cual forma parte del aparato digestivo del acocil. Su función es la producción de enzimas, absorción, y almacenamiento del alimento. Se localiza en la parte anterior del intestino, y presenta una gran concentración de bacterias que entran por vía oral. El último órgano seleccionado fué el intestino medio y posterior, que al igual que el hepatopáncreas forma parte del sistema digestivo del organismo, teniendo como funciones la absorción de agua y otros elementos, así como el almacenamiento de desechos que posteriormente se eliminan.

Las bacterias presentes en cutícula, no parecen dañar al organismo, y quizá actúen evitando la implantación de bacterias patógenas. También es posible que el exoesqueleto actúe como una barrera anatómica contra dichas bacterias (Fingerman 1985).

Como antecedente a esta aseveración, hay datos que mencionan que algunos crustáceos secretan cera en su cutícula, que les proporciona protección contra ataques bacterianos (Cameron 1985). El acocil presenta 11 mudas hasta alcanzar su talla máxima, que es aproximadamente de 8 a 10 cm. Quizá entre muda y muda presente un ambiente propicio para el desarrollo de otro tipo de bacterias. Sin embargo, al alcanzar su talla máxima donde sus condiciones químicas ya no cambian, quizá se convierta en un medio más estable para un sólo tipo de flora bacteriana. El encontrar ciertas especies una sólo vez en branquias como *Acinetobacter polymorpha*, *Corynebacterium diversus*, *Enterobacter hafniae* y *Haemophilus aphrophilus*, puede ser debido a que estas bacterias no son capaces de desarrollarse en el medio ambiente interno del acocil.

En el caso de las especies encontrados en el hepatopáncreas, es de suponer que son aquellas capaces de resistir secreciones digestivas y por lo tanto se almacenan en este sitio. Algunos crustáceos secretan enzimas digestivas que determinan un pH gástrico ácido, evitando la implantación de agentes infecciosos ingeridos con los alimentos (Ratcliffe 1985). Probablemente, también funcione como una barrera para la implantación de otro tipo de bacterias.

En el intestino medio y posterior, las bacterias que se encuentran se pueden considerar como parte de la flora de estos animales, por ser el conducto por donde pasan los alimentos para su almacenamiento y eliminación; y porque se encuentran en todos los animales estudiados.

Las bacterias presentes en hepatopáncreas e intestino, podrían sintetizar otros elementos necesarios, como lo son las vitaminas en el caso de los mamíferos (Jawets, E. et al. 1990).

Las especies *Micrococcus roseus* y *Sarcina rubidae* son las únicas que tienen forma de cocos de todas las bacterias reportadas. Quizá el hepatopáncreas e intestino sean los únicos sitios donde puedan permanecer los cocos, aunque por poco tiempo; posiblemente por no encontrar en otros sitios las condiciones apropiadas para su implantación, siendo eliminadas por los sistemas de defensa del acocil.

Dado que el río es un sistema abierto en el cual se descargan cantidades considerables de materia fecal y desechos orgánicos, con un continuo reciclaje de agua dependiendo de la época del año, resulta lógica la presencia de bacterias entéricas como grupo predominante, típico de cuerpos de agua, lo que explica también las diferentes especies encontrados.

La posibilidad de encontrar otras bacterias, podría ser producto de la contaminación del río con desechos industriales o aguas negras, o bien, por desastres naturales como inundaciones.

Posiblemente, este último caso explica la presencia de la especie *Aeromonas hydrophila*, que con frecuencia produce procesos patológicos en animales marinos de sangre fría y animales de agua dulce, y que en el hombre causa neumonías y gastroenteritis leves o graves.

Este género se encuentra comunmente en el agua y suelo, y se encontró en todos los órganos muestreados en 5 acociles, pero conviene aclarar que estos organismos fueron colectados después de que hubo una gran inundación en el Estado de Chihuahua, por lo que el río Conchos tuvo una gran contaminación de todo tipo de desechos.

A pesar de ser patógena, al parecer los sistemas de defensa del acocil pueden manejar la infección por *Aeromonas hydrophila*, si es de magnitud pequeña, pues los organismos que la albergaron llegaron vivos hasta el laboratorio. Sin embargo, no parece ser capaz de manejar infecciones masivas, como se verá más adelante.

### Aglutinación:

El acocil *Procambarus clarkii* posee respuestas de tipo celular y humoral, aunque no son específicas ni inducibles. La respuesta celular se lleva a cabo mediante la fagocitosis por medio de sus células denominadas leucocitos o celomocitos, cuya capacidad fagocítica se ve incrementada por la presencia de sustancias opsonizantes presentes en la hemolinfa (Tripp 1975). En la respuesta humoral actúan el sistema profenol oxidasa (PpO), lisinas, aglutininas, y en algunas especies factores del complemento, presentes en la hemolinfa.

En el presente trabajo se realizaron las pruebas de aglutinación con bacterias presentes en el acocil, resultando negativas dichas aglutinaciones en todos los casos. Probablemente esto se deba a: (a) que las bacterias presentes no sean patógenas para el acocil y por lo tanto su defensa no se dirige contra ellas; (b) por la ausencia de carbohidratos específicos reconocibles por las aglutininas, ya que estas se caracterizan por unirse selectivamente a cierto carbohidrato; c) por componentes presentes en la membrana o pared celular de las bacterias que inhiban su unión a las aglutininas.

En las pruebas de aglutinación con bacterias aisladas de pacientes con cuadros patológicos, la hemolinfa aglutinó sólo a: *Lactobacillus*, *Streptococcus pyogenes* ( $\beta$ -hemolítico) y *Stapylococcus aureus* cepas SEA, 100-A y MS-76.

Posiblemente estas bacterias sean patógenas para el acocil, por lo tanto, las aglutininas presentes en su sistema de defensa humoral actúen aglutinándolas o bien, estas bacterias no tienen nada que ver con la patología de esta especie de crustáceo, pero su hemolinfa es capaz de reconocer algún (os) carbohidrato (s) presentes en dichas bacterias que quizá crucen con las que si son patógenas para ellas.

Como antecedente a lo anterior podemos mencionar que la respuesta humoral se lleva a cabo en los artrópodos por la presencia en su hemolinfa, de diversas sustancias capaces de aglutinar, opsonizar, y lisar eritrocitos, bacterias y protozoarios de diversos vertebrados (Tripp 1975). También se puede mencionar los trabajos hechos por Lanz y Ramírez (1988) con la hemolinfa de *Procambarus clarkii* sobre la aglutinación de eritrocitos de diversas especies. Por otra parte, se tienen reportes en *Cambarellus sp*, *Procambarus clarkii* y *Macrobrachium rosenbergii*, de la presencia de lectinas con afinidad para el ácido O-acetil siálico (Vázquez 1988); también se propone que el papel biológico es el de participar en la fagocitosis de bacterias que presentan ácido siálico en su superficie (Ravindranath et al 1985).

#### Inhibición bacteriana.

La prueba de la inhibición del crecimiento bacteriano mostró que la hemolinfa no afecta el desarrollo de las bacterias propias y no propias del acocil.

Posiblemente esto se debe a que la hemolinfa pierde su capacidad bacteriostática ó bactericida al ser extraída, pues se inactiva la profenol oxidasa, o bien, al incubar las bacterias con la hemolinfa sólo se aumenta la fagocitosis, pero no la aglutinación. Se podría pensar que al dejar coagular la hemolinfa y eliminar el coágulo, también se elimina su capacidad bactericida.

#### Inoculación bacteriana.

Las especies de bacterias presentes en *Procambarus clarkii* inoculadas fueron: *Corynebacterium tritici*, *Enterobacter agglomerans* y *Aeromonas hydrophila*. Esta última (considerada como patógena para estos animales), fué la única capaz de matar a los organismos inoculados con las concentraciones de  $0.9 \times 10^8$  UFC/mL y  $0.6 \times 10^8$  UFC/mL, sobreviviendo sólo los acociles que habían sido inoculados con una concentración de  $0.3 \times 10^8$  UFC/mL.

Esto hace pensar, que posiblemente estos organismos sean capaces de evitar infecciones siempre y cuando la especie patógena se encuentre en concentraciones menores pues cuando penetra en concentraciones elevadas, su sistema de defensa se ve incapacitado para enfrentar dicho ataque.

Por otro lado la inoculación de *Streptococcus pyogenes* (B-hemolítico) y *Staphylococcus aureus* cepas SEA y MS-76, bacterias no propias del acocil, no provocaron la muerte de ningún organismo a ninguna de las concentraciones suministradas, es decir, el acocil es capaz de regular infecciones provocadas por otro tipo de bacterias ajenas totalmente a él, ya que comúnmente este tipo de bacterias no se encuentran en su medio ambiente. Esto es coherente con el hecho de que las aglutine *in vitro*, pues así favorecería su eliminación.

En resumen, el acocil cuenta con mecanismos de defensa que actúan en conjunto, como lo son las barreras anatómicas, fisiológicas y órganos filtradores, que evitan o inhiben la invasión del crecimiento bacteriano que le pueda causar algún daño. Sin embargo, presenta ciertas especies de bacterias que quizá le sean necesarios, para la síntesis de algunos elementos como vitaminas, y competencia con bacterias patógenas. La hemolinfa es capaz de aglutinar bacterias patógenas para el hombre, lo que indica que quizá también sea capaz de aglutinar bacterias patógenas para él, y protegerlo de infecciones letales.

## CONCLUSIONES

Todas las especies de bacteria encontradas en *Procambarus clarkii* habitan normalmente en fuentes naturales de agua, suelo y no se consideran patógenas, a excepción de *Aeromonas hydrophila*.

El sistema de defensa humoral no aglutina ninguna de las bacterias presentes en el acocil, pero sí a algunas patógenas para el hombre.

La (s) aglutinina (s) de la hemolinfa no tienen afinidad por algún género de bacteria en especial.

La hemolinfa no inhibe el crecimiento de ninguna de las bacterias estudiadas.

El acocil es capaz de evitar infecciones provocadas por inoculación de todas las bacterias probadas, excepto la especie *Aeromonas hydrophila*.

## BIBLIOGRAFIA

Anderson, R.S. 1975. Phagocytosis by invertebrate cells in vitro: Biochemical events and other characteristics compared with vertebrates phagocytic system. En: Invertebrate Immunity. Ed. Maramorosch, K. y Shope, R.E. Academic Press. USA. pp. 153.

Austin, B. 1965. Marine Decapod of the Carolinas. Fishery Bulletin:65.

Barnes, R.D. 1986. Zoología de los Invertebrados. Ed. Interamericana. México, D.F. pp. 701-720.

Bardach, J.E. 1986. Acuicultura. Crianza y cultivo de organismos marinos y de agua dulce. Ed. AGT. México, D.F. pp. 482-613.

Bautista, C. 1987. Crustáceos. Tecnología de cultivo. Ed. Mundi-Prensa, Madrid, España. pp. 15-25, 93-126.

Bird, G. W. 1974. Invertebrate agglutinins in general. Ann. N.Y. Acad. Sci. 234: 51.

Brock, T. 1978. Biología de los Microorganismos. 2da. Edición. Ed. Omega, Barcelona. pp. 65, 419-438.

Buscena, M. y Van de Vyver, G. 1983. Variability of allograft rejection processes in *Axineta verrucosa*. Dev. Comp. Immunol. 7:613.

Cameron, J.N. 1985. La muda del Cangrejo azul. Investigación y Ciencia. 106: 50.

Colwell, R. 1962. The bacterial flora of Puget sound fish. J.appl. Bact. 25 (2), 147-158.

Cooper, E. L. 1981. Immunity in invertebrates. Critical Reviews in Immunology. 2: 1.

Cooper, E. L. 1982. General Immunology. Pergamon Press. USA. pp.290.

Cornik, J.W. y Stewart, J.E. 1973. Partial characterization of a natural agglutinin in the hemolymph of the lobster, *Homarus americanus*. J.Invert.Pathol. 21 : 255.

Davis, J. T. 1988. Biología y Antecedentes del Cultivo del Cangrejo de río. Ed. Fondepesca. Pub. Extensionismo. pp. 1-5.

Davis, J.T. y Kachtik, E.D. 1988. Producción de Cangrejo de río en el Noreste de México. Ed. Fondepesca. Pub. Extensionismo. pp. 1-5.

Davis, B. and Dulbecco, R. 1973. Microbiology. 2da. Edition. Ed. Harper International.

Fingerman, M. 1972. Evolución y diversidad zoológicas. Ed. Interamericana. México, D.F. pp. 1-24.

Fuke, M.T. y Namakunai, T. 1982. Allogenic cellular reaction between intra-specific types of a solitary ascidian, *Halocynthia roosei*. Dev. Comp. Immunol. 6: 253.

Howard, M. G. 1969. Phylogeny of Immunoglobulins. Advances in Immunology. Academic Press. New York and London. pp. 51-56.

Jawetz, E. et al. 1990. Microbiología Médica. Ed. El Manual Moderno. México, D:F: pp: 324.

Johnson, S. K. 1988. Calidad del agua en el Cultivo del Cangrejo de río. Ed. Fondepesca. Pub. Extensionismo. pp. 1-18.

Kaestner, A. 1970. Invertebrate Zoology. Vol. III Crustacea. Ed. Wiley Interscience.

Kolb, H. 1977. On the Phylogenetic Origin of the Immune system: a hypothesis. Dev. Comp. Immunol. 1 : 193.

Lackie, A.M. 1983. Immunological recognition of cuticular transplants in insects. Dev. Comp. Immunol. 7: 41

Langlet, C. y Bierne, J. 1983. Experimental evidence for cell mediated immune response to incompatible graft in *Lineus* (Nemertea). Dev. Comp. Immunol. 7: 617.

Lanz, M. H. 1988. Respuesta inmunitaria del acocil *Procambarus clarkii* (Crustacea Decápoda): Análisis de la capacidad aglutinante de su hemolinfa sobre eritrocitos de diversos vertebrados. Tesis. ENEP Iztacala. México.

Manning, J.M. y Turner, R.J. 1973. Comparative Immunobiology. Halted Press. USA. pp: 29-44.

Marchalonis, J.J. 1976. Comparative Immunology. Blackwell Scientific Publications. Osney Mead, Oxford. pp. 2-6.

Marchalonis, J.J. 1972. Immunity in Evolution. Harvard University Press. Cambridge Massachusetts. USA. pp. 45-48.

Mc. Lauglin, P.A. 1980. Comparative Morphology of Recent Crustacea. Ed. W.H. Freeman and Company U.S.A.

Mc. Key, D. and Jenkin, C. R. 1970. Immunity in the invertebrates. The role of serum factors in phagocytosis of erythrocytes by hemocytes of the freshwater crayfish *Parachaeraps bicarinatus*. Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci. 40 : 139.

Prowse, R.H. y Tait, N.N. 1969. In vitro Phagocytosis by amoebocytes from the hemolymph of *Helix aspersa* (Muller). *Immunology*, 17: 437.

Ratcliffe, N. A. 1985. Invertebrate Immunity-A primer for the non specialist. *Immunol. Lett.* 10 : 253.

Ravindranath, M. H. 1985. Purification and characterization of an O-acetyl sialic acid-specific lectin from a marine crab *Cancer antennarius*. *J. Biol. Chem.* 260 : 8850.

Rouger, W. y Uhlenbrunck, G. 1984. Invertebrate lectins: The biological role of a biological rule. *Dev. Comp. Immunol. Supplement 3*: 159.

Rosales, A. 1987. Evolución del Sistema Inmune. En: Avances en Antropología física. Tomo II. Ed. I.N.A.H. México, D.F. PP.11-139.

Savage, J.M. 1977. Evolución. Ed. CECSA. México, D.F. pp. 32-33.

Sharon, N. 1977. Lectins. *Scientific American*. 236 : 108.

Sloan, B. et al. 1975. Recognition of self from non-self in crustaceans. *Nature*. 258 : 521.

Stites, D. et al. 1990. *Inmunología Básica y Clínica*. Ed. El Manual Moderno. México, D.F. pp: 201-225.

Söderhall, K. 1981. Fungal cell wall beta 1,3-glucans induce clotting and phenoloxidase attachment to foreign surface of crayfish hemocyte lysate. *Dev. Comp. Immunol.* 5: 565.

Söderhall, K. 1982. Prophenoloxidase activating system and melanization. A recognition mechanism of Arthropods. A review. *Dev. Comp. Immunol.* 6 : 601.

Stang-Voss, Ch. 1971. Zur Ultrastruktur der Blutzellen wirbelloser Tiere. V. Über die Hämozyten von *Astacus astacus*. (L.). (Crustacea). *Z. Zellforsch.* 122 : 68.

Tizard, I. 1989. *Inmunología Veterinaria*. Ed. Interamericana. México, D.F. pp: 208-224.

Tripp, M.R. 1975. Humoral factors and molluscan immunity. En: *Invertebrate Immunity*. Ed. Maramorosch, K. y Shope, R.E.. Academic Press. New York. USA. pp: 202-210.

Tyson, C.J. and Jenkin, C.R. 1974. Phagocytosis of bacteria *in vitro* by hemocytes from the crayfish *Parachanna bicarinatus*. *Aust. J. Exp. Bio. Med. Sci.* 52 : 341.

Vázquez, L. et al. 1988. Especificidad de las aglutininas de los crustáceos de agua dulce por ácido siálico. XVII Congreso Nacional de Bioquímica. Oaxaca, México. pp. 97.