

Efecto del carragenano sulfatado en la respuesta celular de la langosta  
*Panulirus interruptus*

Effect of sulfated carrageenan on the cellular response of the lobster  
*Panulirus interruptus*

Sonia Araceli Soto<sup>1a</sup>

María Teresa Viana<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> Facultad de Ciencias Marinas

<sup>2</sup> Instituto de Investigaciones Oceanológicas

Universidad Autónoma de Baja California

Apartado postal 453

Ensenada, CP 22860, Baja California, México

\*E-mail: [viana@uabc.mx](mailto:viana@uabc.mx)

Recibido en julio de 2002; aceptado en enero de 2003

## Resumen

En el presente trabajo se estimó la reacción de defensa celular en la langosta espinosa *Panulirus interruptus* después de inocular el polisacárido sulfatado carragenano. Se realizaron tres experimentos *in vivo* en los que se inyectaron 0.2 mg mL<sup>-1</sup> de carragenano a langostas adultas y se les tomaron muestras de hemolinfa a diferentes tiempos (0, 1, 3, 6, 12, 24, 36 y 48 h). Se registró el número total de hemocitos y sus diferentes tipos como hialocitos, granulocitos y granulocitos de gránulos grandes. Después de 24 h, el conteo total de hemocitos del grupo control fue menor que el observado en los grupos experimentales. Durante los experimentos *in vitro* se evaluó el porcentaje de fagocitosis por los hemocitos, utilizando *Escherichia coli* junto con suero de langosta. Se registró de 7.6% a 31.9% de fagocitosis en presencia de diferentes concentraciones de carragenano (0.0%, 0.05%, 0.1% y 0.5%), mientras que en los tratamientos de referencia en medio para hemolinfa de langosta, la respuesta fue de 6.2% a 22.2% a las mismas concentraciones del carragenano. Se concluye que las langostas, en presencia de un glucano sulfatado, presentaron una respuesta no específica que resultó en un incremento a nivel celular y una estimulación indirecta de la fagocitosis.

**Palabras clave:** langosta espinosa, respuesta no específica, hemocitos, carragenano.

## Abstract

In the present work, the cellular defense reaction of the spiny lobster *Panulirus interruptus* was studied after being inoculated with the sulfated polysaccharide carrageenan. Three *in vivo* experiments were undertaken, where 0.2 mg mL<sup>-1</sup> carrageenan were administered to adult lobsters and hemolymph samples were taken at different times (0, 1, 3, 6, 12, 24, 36 and 48 h). The total hemocyte count and the types, such as hyalocytes, granulocytes and large granule granulocytes, were recorded. After 24 h, the total hemocyte count in the control group was lower than that observed in the experimental group. During the *in vitro* experiments, the percentage of phagocytosis by lobster hemocytes was studied using the Gram-negative bacteria *Escherichia coli*. A phagocytosis of 7.6% to 31.9% was observed using various carrageenan concentrations (0.0%, 0.05%, 0.1% and 0.5%) in the presence of lobster serum, whereas in the reference treatment, *E. coli* incubated in artificial lobster hemocyte medium showed lower phagocytic activity (6.2% to 22.2%) at the same carrageenan concentrations. It is concluded that lobsters in the presence of a sulfated glycan had a nonspecific response, with the resulting increase in cellular level and indirect phagocytosis stimulation.

**Key words:** spiny lobster, nonspecific response, hemocytes, carrageenan.

---

<sup>a</sup> Dirección actual: Departamento de Biotecnología Marina, CICESE, Ensenada, CP 22860, Baja California, México.

## Introducción

Actualmente la langosta se comercializa viva y se obtiene por ella mejor precio que en cualquiera de sus presentaciones tradicionales. La metodología utilizada para ello ha implicado una serie de adaptaciones para el mantenimiento de las langostas en cautiverio y su transporte, el cual puede durar desde unas horas hasta un día empleando cajas térmicas y sistemas de empaque sofisticados (Vijayakumaran y Radhakrishnan, 1997). Sin embargo, las langostas en cautiverio son expuestas frecuentemente a factores que producen estrés que en la mayoría de los casos llevan a una supresión inmunológica con la consecuente presencia de infecciones (Paterson y Spanoghe, 1997). Durante el manejo de las langostas, el estrés asociado a éste, a su transportación, empaque, hacinamiento, cambios abruptos de temperatura durante la aclimatación, etc., favorece las condiciones necesarias para que las bacterias oportunistas invadan a los organismos, causando enfermedades infecciosas (Paterson y Spanoghe, 1997; Spanoghe y Bourne, 1997).

A diferencia de los vertebrados que pueden producir anticuerpos para resistir las infecciones, los invertebrados poseen un sistema inmunológico no específico (Söderhall y Cerenius, 1992). El sistema inmunológico de crustáceos como la langosta está relacionado directamente con la hemolinfa y las células sanguíneas o hemocitos. Los hemocitos son los principales responsables de reacciones celulares como la fagocitosis de microorganismos invasores, su inmovilización en nódulos, la encapsulación de cuerpos extraños y la reparación de heridas, acompañada de una inmediata coagulación de la hemolinfa (Hose *et al.*, 1990; Söderhall y Cerenius, 1992). En crustáceos, antígenos de la superficie microbiana como los lipopolisacáridos y  $\beta$ -glucanos (componentes estructurales de la pared celular de las levaduras) son capaces de activar las funciones celulares directamente. Los  $\beta$ -glucanos son moléculas de poliglucosa de cadena larga unidas por enlaces  $\beta$ , con ramificaciones de una sola molécula de glucosa o cadenas de glucosa. Tales glucanos pueden existir en varias formas estructurales, desde oligómeros solubles en agua hasta macromoléculas insolubles o partículas (Raa, 1996). Estos productos microbianos, utilizados como inmunoestimulantes, trabajan en el sistema inmunológico no específico y resultan una alternativa al uso de antibióticos, e incluso como agentes profilácticos, en la prevención de enfermedades. Así, la administración de un inmunoestimulante antes de una infección debería estimular las defensas del animal y proveer protección contra posibles infecciones severas o letales (Raa, 1996). Actualmente existe una tendencia al uso de inmunoestimulantes en la acuicultura, donde los más utilizados en peces son los  $\beta$ -glucanos (Nikl *et al.*, 1991; Yano *et al.*, 1991; Engstad y Robertsen, 1994; Robertsen *et al.*, 1994; Vadstein, 1997). Para crustáceos decápodos existen varios reportes sobre el uso de glucanos para activar su sistema inmunológico (Unestam y Söderhall, 1977; Kakinuma *et al.*, 1981; Morita *et al.*, 1981; Söderhall y Cerenius, 1992; Song *et al.*, 1997; Chang *et al.*, 2000; Campa-Córdova *et al.*, 2002). Se cree que la

## Introduction

The marketing of live lobsters has expanded in recent years as their commercial value has increased relative to other product forms. This has led to changes and improvements in the technology for handling lobsters in captivity and their transportation, which can last from a few hours to one day by using insulated boxes and sophisticated packing systems (Vijayakumaran and Radhakrishnan, 1997). However, lobsters in captivity are frequently exposed to factors that produce stress, in most cases leading to immune suppression and, consequently, infection (Paterson and Spanoghe, 1997). During the handling of lobsters, the stress produced as a result of the transportation, packing, crowding, abrupt changes in temperature during acclimatization, etc., creates the necessary conditions for opportunistic bacteria to invade and infect the organisms (Paterson and Spanoghe, 1997; Spanoghe and Bourne, 1997).

Unlike vertebrates that can produce antibodies to fight infections, invertebrates have a nonspecific immune system (Söderhall and Cerenius, 1992). The immune system of crustaceans, such as lobsters, is directly related to the hemolymph and blood cells or hemocytes. The hemocytes are primarily responsible for cellular mechanisms, such as phagocytosis of invading microorganisms, their immobilization in nodules, the encapsulation of foreign bodies and wound recovery accompanied by the immediate coagulation of the hemolymph (Hose *et al.*, 1990; Söderhall and Cerenius, 1992). In crustaceans, microbial surface antigens, such as lipopolysaccharides and  $\beta$ -glucans (structural components of the cell wall of yeast), are able to activate the cellular mechanisms directly.  $\beta$ -glucans are long-chain polyglucose molecules joined by  $\beta$  linkages with ramifications of a single glucose molecule or glucose chains. These glucans are present in several structural forms, such as water-soluble oligomers, insoluble macromolecules or particles (Raa, 1996). These microbial products, used as immunostimulants, work in the nonspecific immune system and resulting as an alternative to antibiotics or as prophylactic agents in the prevention of diseases. Thus, the use of an immunostimulant prior to an infection should stimulate the animal's defences to provide protection against possible severe or lethal infections (Raa, 1996). At present, there is a tendency to use them in aquaculture and the most widely administered to fishes are the  $\beta$ -glucans (Nikl *et al.*, 1991; Yano *et al.*, 1991; Engstad and Robertsen, 1994; Robertsen *et al.*, 1994; Vadstein, 1997). There are several studies on the use of glucans to activate the immune system of decapod crustaceans (Unestam and Söderhall, 1977; Kakinuma *et al.*, 1981; Morita *et al.*, 1981; Söderhall and Cerenius, 1992; Song *et al.*, 1997; Chang *et al.*, 2000; Campa-Córdova *et al.*, 2002). The stimulation of the immune system by glucans is probably due to the activation of the prophenoloxidase system, which represents the main component of a complex cascade of enzymes during the recognition of a foreign agent (Söderhall and Cerenius, 1992; Song *et al.*, 1997; Sung *et al.*, 1998). On the other hand,

estimulación del sistema inmunológico por glucanos se debe a la activación del sistema profenoloxidasa que representa el componente principal de un complejo enzimático de cascada durante el reconocimiento de material extraño (Söderhall y Cerenius, 1992; Song *et al.*, 1997; Sung *et al.*, 1998). Por otro lado, los glicanos (polisacáridos que contienen azúcares diferentes a la glucosa) han mostrado interacción con los macrófagos de ratones, e inducen una cascada de eventos celulares y bioquímicos comparables a los reportados para los  $\beta$ -1,3 glucanos (Williams *et al.*, 1989). Estos glicanos, como el agar y el carragenano, son comúnmente encontrados en las macroalgas marinas. El carragenano es un polisacárido sulfatado de la pared celular de las algas rojas constituido por unidades alternantes de D-galactopiranosas unidas por enlaces  $\alpha$ -1,3 y  $\beta$ -1,4 (Painter, 1983), que ha sido ampliamente utilizado como irritante en la simulación de inflamaciones en animales, o para disminuir selectivamente a los macrófagos de mamíferos (Takeda *et al.*, 1998), e incluso, en estudios de adhesión celular en macrófagos de ratones (Chong y Parish, 1985). No obstante, existen diferencias en cuanto a los resultados obtenidos con diversos tipos de inmunoestimulantes en distintas especies acuáticas (Robertsen *et al.*, 1994; Raa, 1996), por lo que se sospecha que la selección de un compuesto como éste, en particular, dependerá de su solubilidad, ruta de administración, tipo de organismo, dosis, etc. (Raa, 1996).

En Baja California, México, existen pocos recursos naturales explotables y éstos constituyen la base de la economía del estado, en la que la langosta, el abulón y las macroalgas son probablemente los productos marinos más importantes y, por ende, es importante realizar estudios para su mejor aprovechamiento y para el desarrollo de productos biotecnológicos. Por lo anterior, el propósito de este estudio fue probar el efecto del carragenano sulfatado sobre el incremento celular de los hemocitos en la hemolinfa y de la capacidad fagocítica de la langosta espinosa *Panulirus interruptus* Randall, 1840, ya que este tipo de respuestas están consideradas como parámetros o indicadores de la condición física e inmunológica de estas especies (Evans *et al.*, 2000; Jussila *et al.*, 2000).

## Materiales y métodos

### Condiciones experimentales

Se transportaron 40 langostas espinosas (*P. interruptus*) suministradas por la Cooperativa Bahía Tortugas (México), al laboratorio húmedo del Instituto de Investigaciones Oceanológicas de la UABC. En el laboratorio, las langostas fueron mantenidas en tres estanques rectangulares de fibra de vidrio con sistema de flujo abierto y aireación constante, en los que se colocaron trozos de tubo negro ABS (20 cm de largo por 15 cm de diámetro) como refugio para las langostas y se controlaron las condiciones experimentales como temperatura, salinidad, pH y oxígeno disuelto. Las langostas fueron alimentadas cuatro veces a la semana con trozos de pescado y calamar descongelados. Durante las tres semanas de aclimatación se

glicanos (polysaccharides that contain sugars other than glucose) have been shown to interact with mice macrophages and induce a cascade of cellular and biochemical events comparable to those reported for  $\beta$ -1,3 glucans (Williams *et al.*, 1989). These glycanes, such as agar and carrageenan, are usually found in marine macroalgae. Carrageenan is a sulfated polysaccharide from the cell wall of red algae, composed of alternating D-galactopyranose units joined by  $\alpha$ -1,3 and  $\beta$ -1,4 linkages (Painter, 1983); it has been widely used as an irritant to stimulate inflammation in animals or to selectively deplete macrophages in mammals (Takeda *et al.*, 1998), and even in studies of cell adhesion in mice macrophages (Chong and Parish, 1985). However, differences have been found in the results of the use of different immunostimulants in diverse aquatic species (Robertsen *et al.*, 1994; Raa, 1996), so the selection of a particular compound will depend on its solubility, mode of administration, type of organism, dose, etc. (Raa, 1996).

Baja California, Mexico, has few exploitable natural resources and they form the basis of the state's economy. The lobster, abalone and macroalgae are probably the most important marine products, and studies conducive to their proper exploitation and development of biotechnological products are necessary. Therefore, the aim of the present study is to evaluate the effect of sulfated carrageenan on the cellular increase of hemocytes in the hemolymph and phagocytic capacity of the spiny lobster *Panulirus interruptus* Randall, 1840, since these responses are considered parameters or indicators of the physical and immunological condition of this species (Evans *et al.*, 2000; Jussila *et al.*, 2000).

## Material and methods

### Experimental conditions

Forty spiny lobsters (*P. interruptus*), supplied by the Bahía Tortugas Cooperative (Mexico), were transported to the Instituto de Investigaciones Oceanológicas of the Universidad Autónoma de Baja California (UABC). The lobsters were kept in three rectangular fiberglass tanks, with open flow system and constant aeration; black ABS tubes (20 cm long, 15 cm diameter) were placed as shelter for the animals. The experimental conditions, such as temperature, salinity, pH and dissolved oxygen, were controlled. The lobsters were fed four times a week with pieces of fish and squid. During the three weeks of acclimatization, each lobster was examined and those found to have visible injuries or apparent signs of disease were removed. The lobsters were tagged, weighed, measured and sexed. Prior to each experiment, the intermolt stage was determined according to Aiken (1980); only the animals in intermolt stage (stage C) were used.

The water temperature of the culture and hemocyte count were recorded monthly to determine the values under conditions of captivity. Hemolymph samples were taken from the first abdominal segment of the lobsters, previously disinfected

revisó cada langosta y se separaron todas las que presentaban daños visibles o signos aparentes de enfermedad. Las langostas fueron marcadas, pesadas, medidas y sexadas, y antes de cada experimento se determinó su estado de intermuda de acuerdo con el esquema de Aiken (1980), utilizando en los experimentos únicamente animales en estadio de intermuda (estadio C).

Se llevó a cabo un registro mensual de la temperatura del agua de cultivo y del número de hemocitos para determinar sus valores en condiciones de cautiverio. Se tomaron muestras de hemolinfa a partir del primer segmento abdominal de las langostas, previa desinfección con etanol, utilizando una jeringa de 1 mL (aguja No. 27) con 0.3 mL de formol frío en agua de mar al 10%. Los hemocitos se contaron en una cámara Neubauer a un aumento de 600× y éstos se reportaron como conteo total de hemocitos (CTH). La clasificación de los hemocitos se realizó de acuerdo con sus características morfológicas (Cornick y Stewart, 1978) en muestras frescas, fijadas, y frotis teñidos con las tinciones de Wright, Giemsa y eosina-policromo. A partir de este análisis se obtuvo el porcentaje de cada tipo de célula o conteo diferencial de hemocitos.

#### *Experimentos in vivo*

Considerando los grupos experimentales más un grupo control, se realizaron en total tres experimentos. En el primero las langostas se mantuvieron libres, mientras que en el segundo se confinaron en jaulas. Se recurrió a un tercer experimento debido a la gran variación individual en cuanto a la concentración de hemocitos por mililitro de hemolinfa en las langostas. En él cada langosta sirvió como control, utilizando su mismo conteo de hemocitos en hemolinfa como control antes de administrar el carragenano y poder comparar contra el número de hemocitos después de suministrar el carragenano.

#### Experimento 1: langostas libres

Las langostas del grupo experimental (cuatro) fueron inyectadas en el primer segmento abdominal de acuerdo con su peso individual, como lo refieren Smith y Söderhall (1983), con 0.2 mg de  $\lambda$ -carragenano (Sigma Chemical Co.<sup>TM</sup>) por mililitro de hemolinfa. El volumen de hemolinfa fue calculado de acuerdo con Bauchau (1981), quien considera que el 20% del peso de las langostas corresponde a hemolinfa. El  $\lambda$ -carragenano usado en todos los experimentos se preparó a partir de una solución al 1% (Smith y Söderhall, 1983) en medio artificial para hemocitos de langosta (MAHL) estéril, constituido por  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  (1.0 g L<sup>-1</sup>), NaCl (28.4 g L<sup>-1</sup>),  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (2.0 g L<sup>-1</sup>),  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  (2.25 g L<sup>-1</sup>), KCl (0.7 g L<sup>-1</sup>), dextrosa (0.5 g L<sup>-1</sup>), aminoácidos esenciales + glutamina (50×) (20.0 mL L<sup>-1</sup>), solución de vitaminas (100×) (10.0 mL L<sup>-1</sup>),  $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$  (0.125 g L<sup>-1</sup>), bicarbonato de sodio (3.0 g L<sup>-1</sup>) y agua destilada (1.0 L) a un pH de 7.6 (Paterson y Stewart, 1974). El grupo control de langostas (cuatro) fue inyectado con MHAL estéril. A los tiempos 0 (tiempo cero), 1, 3, 6, 12, 24, 36 y 48 h se tomaron muestras

with ethanol, with a 1-mL syringe (No. 27 needle) containing 0.3 mL of cold formalin in seawater (10%). The hemocytes were counted in a Neubauer chamber (600×) and will be referred to as total hemocyte count (THC). The hemocytes were classified according to their morphological characteristics (Cornick and Stewart, 1978) in fresh samples, fixed and stained with Wright, Giemsa and eosin-polychrome stains. The percentage of each type of cell, or differential hemocyte count, was then obtained.

#### *In vivo experiments*

Three experiments were conducted. In the first, the lobsters were allowed to be free, whereas in the second, they were confined to cages, using an experimental and control group in each. In the third, due to the large individual variation in the concentration of hemocytes per millilitre of hemolymph, each lobster served as control, using their hemocyte count before administering the carrageenan as control to compare with the number of hemocytes after administering the carrageenan.

#### Experiment 1: free lobsters

The lobsters of the experimental group (four) were injected in the first abdominal segment, based on their individual weight, with 0.2 mg of  $\lambda$ -carrageenan (Sigma Chemical Co.<sup>TM</sup>) per millilitre of hemolymph (Smith and Söderhall, 1983). The volume of hemolymph was calculated according to Bauchau (1981), who reported that the hemolymph accounted for 20% of the lobster's weight. The  $\lambda$ -carrageenan used in all the experiments was prepared from a 1% solution (Smith and Söderhall, 1983) in a sterile artificial lobster hemolymph medium (ALHM), consisting of  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  (1.0 g L<sup>-1</sup>), NaCl (28.4 g L<sup>-1</sup>),  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (2.0 g L<sup>-1</sup>),  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  (2.25 g L<sup>-1</sup>), KCl (0.7 g L<sup>-1</sup>), dextrose (0.5 g L<sup>-1</sup>), essential amino acids + glutamine (50×) (20.0 mL L<sup>-1</sup>), vitamin solution (100×) (10.0 mL L<sup>-1</sup>),  $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$  (0.125 g L<sup>-1</sup>), sodium bicarbonate (3.0 g L<sup>-1</sup>) and distilled water (1.0 L) at a pH of 7.6 (Paterson and Stewart, 1974). The lobsters of the control group (four) were injected with sterile ALHM. A sample of hemolymph was drawn at intervals of 0, 1, 3, 6, 12, 24, 36 and 48 h, and fixed in cold formalin (4% in seawater). The samples were analyzed in the following 24 h and the THC recorded for each sampling time.

#### Experiment 2: confined lobsters, with external control group

In order to reduce stress, the lobsters of the control group (four) and of the experimental group (six) were individually confined in hard plastic cages (25 × 30 × 40 cm) and kept in rectangular tanks. The same procedure as in experiment 1 was followed and the THC was recorded for each sampling time.

de hemolinfa que se fijaron en formol frío (al 4% en agua de mar). Los análisis de las muestras se realizaron en las siguientes 24 h y se registró el CTH en la muestra tomada en cada tiempo.

#### Experimento 2: langostas confinadas con grupo control externo

En este experimento, con el objeto de disminuir el estrés, las langostas del grupo control (cuatro) y las del grupo experimental (seis) fueron confinadas individualmente en jaulas (25 × 30 × 40 cm) construidas con una malla de plástico rígido y mantenidas en estanques rectangulares. Con estas langostas se realizó el mismo procedimiento descrito en el experimento 1, registrando el CTH para cada tiempo.

#### Experimento 3: langostas confinadas con grupo control interno

En este experimento se usaron diez langostas individualmente confinadas en jaulas. En la primera etapa (control), se les inyectó MAHL estéril, se les tomaron muestras de hemolinfa a los mismos intervalos de tiempo que en el experimento 1 y se registraron los respectivos CTHs. Después de dos semanas se tomaron tres langostas al azar y se evaluó su CTH para asegurarse de que el nivel de hemocitos era similar al nivel inicial. En la segunda etapa (grupo experimental), a estas mismas langostas se inyectaron 0.2 mg mL<sup>-1</sup> de carragenano y, después de transcurridos los mismos intervalos de tiempo descritos anteriormente, se procedió al conteo de hemocitos.

Debido a la gran variación existente a nivel individual en la concentración de hemocitos en la hemolinfa de las langostas, para el análisis se tomó en cuenta el incremento en el número de hemocitos. Éste se estimó como  $CTH_{n+1} - CTH_n$ , donde  $n$  es el tiempo a la toma de muestras (0, 1, 3, 6, 12, 24, 36 y 48 h).

#### Análisis estadístico

El análisis estadístico consistió en una prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov y una prueba  $t$  de Student entre los datos de los incrementos ( $CTH_{n+1} - CTH_n$ ) del grupo control y del grupo experimental para cada tiempo muestreado ( $\alpha = 5\%$ ), utilizando el programa estadístico SigmaStat™ 2.03.

#### Experimentos in vitro

Se incubó una cepa pura de *Escherichia coli* (suministrada por el laboratorio de microbiología de la Facultad de Ciencias, UABC) en caldo de lauril triptosa a 37°C durante 24 h, y se ajustó la densidad bacteriana a  $2.0 \times 10^7$  cél mL<sup>-1</sup>, según lo recomendado por Smith y Söderhall (1983).

Para el conteo de hemocitos, se extrajo en MAHL estéril la hemolinfa de las langostas visiblemente saludables, usando

#### Experiment 3: confined lobsters, with internal control group

In this experiment, ten lobsters were individually confined in cages. In the first stage (control group), they were injected with sterile ALHM, and samples of hemolymph were drawn at the same sampling times as in experiment 1 and the THC recorded. After two weeks, three lobsters were chosen at random and the THC was determined to ensure that the level of hemocytes was similar to the initial one. In the second stage (experimental group), these same lobsters were injected with 0.2 mg mL<sup>-1</sup> of carrageenan and the THC recorded for each sampling time.

Due to the large individual variation in the concentration of hemocytes in the hemolymph of lobsters, the increase in the number of hemocytes was taken into account for the analysis and estimated as follows:  $THC_{n+1} - THC_n$ , where  $n$  is the sampling time (0, 1, 3, 6, 12, 24, 36 and 48 h).

#### Statistical analysis

The statistical analysis consisted of a Kolmogorov-Smirnov normality test and Student's  $t$  test for the  $THC_{n+1} - THC_n$  data of the control group and experimental group for each sampling time ( $\alpha = 5\%$ ), using the SigmaStat™ 2.03 statistical program.

#### In vitro experiments

A pure strain of *Escherichia coli* (supplied by the microbiology laboratory of the Facultad de Ciencias, UABC) was incubated in lauryl tryptose broth at 37°C for 24 h. The bacterial density was  $2.0 \times 10^7$  cells mL<sup>-1</sup>, as recommended by Smith and Söderhall (1983).

For the hemocyte counts, the hemolymph was removed from the healthy lobsters in sterile ALHM, using L-cysteine (40 mg mL<sup>-1</sup>) as anticoagulant. The hemocytes were collected at 4°C by centrifugation (700  $G$  per 10 min) and washed twice with ice-cooled ALHM; the density was then adjusted to  $1.5-2.0 \times 10^5$  cells mL<sup>-1</sup> (Paterson and Stewart, 1974). Cellular viability was assessed every 10 min, using the trypan blue test described by Phillips (1973).

#### Preparation of monolayers

Of the previously described hemocyte suspension, 100  $\mu$ L were placed on a pyrogen-free slide (22 × 22 mm). The slides were placed on sterile plastic plates and left for 15 min at 20°C to allow the cells to extend and adhere to the glass surface. Each slide was then washed with two volumes of 2.5 mL of filtered (0.22  $\mu$ m) sterile ALHM.

L-cisteína ( $40 \text{ mg mL}^{-1}$ ) como anticoagulante. Los hemocitos fueron recolectados a  $4^\circ\text{C}$  por centrifugación ( $700 G$  por  $10 \text{ min}$ ) y lavados dos veces con MAHL enfriado en hielo; posteriormente, se ajustó la densidad a  $1.5\text{--}2.0 \times 10^5 \text{ cél mL}^{-1}$  (Paterson y Stewart, 1974). La viabilidad celular se evaluó midiendo cada  $10 \text{ min}$  aplicando la prueba de azul tripano descrita por Phillips (1973).

#### Preparación de las monocapas

Se colocaron  $100 \mu\text{L}$  de la suspensión de hemocitos anteriormente descrita sobre un cubreobjetos ( $22 \times 22 \text{ mm}$ ) libre de pirógenos. Los cubreobjetos se colocaron sobre placas de plástico estériles con multiposos y se dejaron reposar durante  $15 \text{ min}$  a  $20^\circ\text{C}$  para permitir la extensión y adherencia de las células en la superficie del vidrio. Luego, cada cubreobjetos se lavó con dos volúmenes de  $2.5 \text{ mL}$  de MAHL estéril filtrado ( $0.22 \mu\text{m}$ ).

#### Tratamiento de las monocapas con carragenano

Para observar el efecto del glicano sobre los hemocitos de langosta, las monocapas recién preparadas se cubrieron con  $100 \mu\text{L}$  de  $0.0\%$ ,  $0.05\%$ ,  $0.1\%$  y  $0.5\%$  de  $\lambda$ -carragenano por triplicado y, como referencia, algunas monocapas se cubrieron con  $100 \mu\text{L}$  de MAHL estéril filtrado. Todas las monocapas se incubaron en una cámara húmeda por  $1 \text{ h}$  a  $15 \pm 0.5^\circ\text{C}$  sobre un agitador orbital (MultiMixer Mistral, Lab-Line, Instr. Inc.). Finalmente, las monocapas se fijaron en glutaraldehído al  $2.5\%$  en MAHL y se examinaron bajo un microscopio de contraste de fases (American Optical).

#### Actividad fagocítica

Para evaluar el efecto del suero de langosta en la actividad fagocítica se mezclaron, por triplicado,  $100 \mu\text{L}$  de *E. coli* con  $100 \mu\text{L}$  de suero de langosta previamente preparado, según Smith y Ratcliffe (1978), en tubos estériles de  $1.5 \text{ mL}$  y, como referencia, muestras con MAHL. Los tubos fueron entonces preincubados durante  $1 \text{ h}$  a  $15 \pm 0.5^\circ\text{C}$  con agitación constante. Posteriormente, se mezclaron  $100 \mu\text{L}$  de cada tratamiento (bacterias incubadas en suero y en MAHL esteril) con el mismo volumen de  $0.05\%$ ,  $0.1\%$  y  $0.5\%$  de carragenano en MAHL. De estos tratamientos,  $100 \mu\text{L}$  se colocaron sobre monocapas de hemocitos recién preparadas que se incubaron por  $1 \text{ h}$  a  $15 \pm 0.5^\circ\text{C}$  sobre un agitador orbital. Después de este tiempo, las monocapas se fijaron en glutaraldehído al  $2.5\%$  en MAHL y se examinaron bajo un microscopio de contraste de fases.

#### Cuantificación de la fagocitosis

El porcentaje de actividad fagocítica se estimó contando el número de hemocitos que contenían una o más bacterias intracelulares, distinguiéndolos de las formas extracelulares

#### Treatment of the monolayers with carrageenan

To observe the effect of glycan on the lobster hemocytes, the recently prepared monolayers were covered with  $100 \mu\text{L}$  of  $0.0\%$ ,  $0.05\%$ ,  $0.1\%$  and  $0.5\%$  of  $\lambda$ -carrageenan in triplicate. As reference, some monolayers were covered with  $100 \mu\text{L}$  of filtered sterile ALHM. All the monolayers were incubated in a humidity chamber for  $1 \text{ h}$  at  $15 \pm 0.5^\circ\text{C}$  on a rocking platform (MultiMixer Mistral, Lab-Line, Instr. Inc.). Finally, the monolayers were fixed in  $2.5\%$  glutaraldehyde in ALHM and examined under a phase contrast microscope (American Optical).

#### Phagocytic activity

To determine the effect of lobster serum on the phagocytic activity,  $100 \mu\text{L}$  of *E. coli* and  $100 \mu\text{L}$  of lobster serum, previously prepared according to Smith and Ratcliffe (1978), were mixed, in triplicate, in  $1.5\text{-mL}$  sterile tubes, and samples with ALHM were used as reference. The tubes were preincubated for  $1 \text{ h}$  at  $15 \pm 0.5^\circ\text{C}$  with constant agitation. Then,  $100 \mu\text{L}$  of each treatment (bacteria incubated in serum and in ALHM) were mixed with the same volume of  $0.05\%$ ,  $0.1\%$  and  $0.5\%$  of carrageenan in ALHM. Of these treatments,  $100 \mu\text{L}$  were placed on recently prepared hemocyte monolayers and incubated for  $1 \text{ h}$  at  $15 \pm 0.5^\circ\text{C}$  on a rocking platform. Afterwards, the monolayers were fixed in  $2.5\%$  glutaraldehyde in ALHM and examined under a phase contrast microscope.

#### Quantification of phagocytosis

The percentage of phagocytic activity was estimated by counting the number of hemocytes containing one or more intracellular bacteria, which were distinguished from the adherent extracellular forms using the criteria described by Smith and Ratcliffe (1978). The phagocytosed particles were always observed under phase contrast optics, in the same focal plane as the cytoplasm, where the bacteria were less refractive than the extracellular forms.

#### Results

Water temperature varied between  $24^\circ\text{C}$  and  $17^\circ\text{C}$  throughout the year, and between March and July, THC ranged from  $9.4$  to  $16.1 \times 10^6 \text{ cells mL}^{-1}$ , respectively. No significant correlation was found between the variation of temperature and THC (Pearson correlation coefficient,  $r = 0.279$ ,  $n = 11$ ,  $P > 0.05$ ). Salinity, pH and oxygen were kept at normal levels:  $32\text{--}34 \text{ g L}^{-1}$ ,  $7.9\text{--}8.1$ , and  $6.8\text{--}7.01 \text{ mg L}^{-1}$ , respectively.

Three types of hemocytes were found in the lobster *P. interruptus* (table 1): hyalocytes, granulocytes and large granule granulocytes (fig. 1). The most abundant hemocytes were the hyalocytes ( $83\%$ ), whereas large granule granulocytes only occurred in  $1.8\%$  of the THC. The most important stain-related characteristics were the condensation and colour

adherentes usando el criterio descrito por Smith y Ratcliffe (1978). Las partículas fagocitadas siempre fueron observadas bajo una óptica de contraste de fases en el mismo plano focal que el citoplasma, donde las bacterias fueron menos refráctiles que las formas extracelulares.

## Resultados

La temperatura del agua a lo largo del año osciló entre 24°C y 17°C, mientras que el CTH varió de 9.4 a  $16.1 \times 10^6$  cél mL<sup>-1</sup> entre marzo y julio, respectivamente. No se encontró una correlación significativa entre la variación de temperatura y el CTH (coeficiente de correlación de Pearson,  $r = 0.279$ ,  $n = 11$ ,  $P > 0.05$ ). Salinidad, pH y oxígeno se mantuvieron en niveles normales: 32 a 34 g L<sup>-1</sup>, 7.9 a 8.1, y 6.8 a 7.01 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente.

En la langosta *P. interruptus* se observaron tres tipos de hemocitos (tabla 1): hialocitos, granulocitos y granulocitos de gránulos grandes (fig. 1). Los hemocitos más abundantes fueron los hialocitos (83%), mientras que los granulocitos de gránulos grandes representaron sólo un 1.8% del CTH. Las características de tinción más importantes fueron la condensación e intensidad de color del núcleo, así como el tamaño y número de gránulos del citoplasma. Sin embargo, empleando microscopía de contraste de fases, el grado de granulación y los detalles nucleares descritos anteriormente fueron más distintivos, en comparación con muestras de hemolinfa fijadas sin teñir.

### Experimentos in vivo

En el experimento 1, el número de hemocitos en el grupo control varió de 11.28 a  $28.23 \times 10^6$  cél mL<sup>-1</sup>, mientras que en el grupo experimental fue de 11.28 a  $20.051 \times 10^6$  cél mL<sup>-1</sup>. El comportamiento de los incrementos ( $CTH_{n+1} - CTH_n$ ), tanto en el grupo control como en el grupo experimental, fue muy similar (fig. 2a), pero este último tuvo siempre mayor producción de hemocitos a lo largo del tiempo. Se observaron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre el grupo control y el experimental en todos los tiempos muestreados.

En el experimento 2, el CTH en el grupo control fue de 12.78 a  $26.08 \times 10^6$  cél mL<sup>-1</sup>, mientras que en el experimental, éste osciló entre 9.80 y  $15.11$  cél mL<sup>-1</sup>. El comportamiento de los incrementos también fue similar en ambos grupos (fig. 2b) y, de la misma manera, los organismos sujetos a tratamiento presentaron mayor producción de hemocitos hasta las 36 h, siendo otra vez similares en ambos grupos a las 48 h. En este caso se observaron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre el grupo control y el experimental a los tiempos 3, 6, 12, 24 y 36 h.

En el experimento 3, el CTH en el grupo control fue de 10.18 a  $19.128 \times 10^6$  cél mL<sup>-1</sup>, mientras que para el experimental, éste osciló de 9.68 a  $15.29 \times 10^6$  cél mL<sup>-1</sup>. Se detectaron diferencias entre ambos grupos ( $P < 0.05$ ) hasta las 24 h y, posteriormente, los cambios en el CTH resultaron similares a las 36 y 48 h (fig. 2c).

intensity of the nucleus, and the size and number of granules of the cytoplasm. However, with phase-contrast microscopy, the degree of granulation and nuclear details were clearer, compared to the unstained hemolymph samples.

### In vivo experiments

In experiment 1, the number of hemocytes ranged from 11.28 to  $28.23 \times 10^6$  cells mL<sup>-1</sup> for the control group and from 11.28 to  $20.051 \times 10^6$  cells mL<sup>-1</sup> for the experimental group. The behaviour of the  $THC_{n+1} - THC_n$  data was similar for both groups (fig. 2a), but the experimental group always presented greater production of hemocytes. Significant differences were found ( $P < 0.05$ ) between the control and the experimental group for all the sampling times.

In experiment 2, the THC for the control group ranged from 12.78 to  $26.08 \times 10^6$  cells mL<sup>-1</sup> and for the experimental group, from 9.80 to  $15.11 \times 10^6$  cells mL<sup>-1</sup>. The behaviour of the  $THC_{n+1} - THC_n$  data was also similar for both groups (fig. 2b) and the latter again presented greater production of hemocytes up to 36 h, being again similar in both groups at 48 h. Significant differences ( $P < 0.05$ ) were found between both groups at 3, 6, 12, 24 and 36 h.

In experiment 3, the THC for the control group ranged from 10.18 to  $19.128 \times 10^6$  cells mL<sup>-1</sup> and for the experimental group, from 9.68 to  $15.29 \times 10^6$  cells mL<sup>-1</sup>. Significant differences ( $P < 0.05$ ) were found between both groups up to 24 h, but at 36 and 48 h the changes in THC were similar (fig. 2c).

### In vitro experiments

The phase-contrast microscopy showed that as the concentration of carrageenan increased, the degree of degranulation was affected in granulocytes and large granule granulocytes, whereas in the reference treatments with ALHM, these differences occurred but to a lesser extent.

The hemocyte monolayers incubated with *E. coli* and pre-incubated in lobster serum showed agglutinated bacteria and an increase in the interconnection among hemocytes by the extension of their phylopods. During the phagocytosis tests with *E. coli*, the phagocytic activity of the hemocytes increased from 7.60% to 31.90% (table 2) for the different concentrations of carrageenan (from 0% to 0.5%); however, lower percentages were obtained for the reference treatments incubated in ALHM, from 6.20% to 22.20% of phagocytosis.

## Discussion

The individual variations in THC of *P. interruptus* are not related to the changes in temperature during the experiment, since considerable individual variation was observed in the lobsters kept under the same laboratory conditions in the preliminary tests. The fluctuations observed are probably due to other factors, such as physiological condition, molting stage, gonadal maturity, monotony of the diet, etc. (Bauchau and

**Tabla 1.** Principales características de los tres tipos de hemocitos encontrados en la langosta espinosa *Panulirus interruptus*: hialocito (HIA), granulocito (GRA) y granulocito de gránulos grandes (GGG) (Hose *et al.*, 1990).

**Table 1.** Main characteristics of the three types of hemocytes found in the spiny lobster *Panulirus interruptus*: hyalocyte (HIA), granulocyte (GRA) and large granule granulocyte (GGG) (Hose *et al.*, 1990).

Hemocitos <i>Hemocytes</i>	Porcentaje <sup>1</sup> <i>Percentage</i> <sup>1</sup>	Dimensiones <sup>2</sup> <i>Dimensions</i> <sup>2</sup> ( $\mu\text{m}$ )	Descripción de muestras fijadas en formol al 10% <i>Samples fixed in 10% formalin</i>	Descripción de muestras teñidas con eosina-policromo <i>Samples stained with eosine-polychrome</i>
HIA	83.0 $\pm$ 0.29	12.7–17.49 $\pm$ 0.15	La mayoría de las células son ovoides, algunas esféricas y en forma de huso, no refráctiles; sin gránulos en el citoplasma y cuando están presente son pequeños. <i>Most cells are ovoid, some spherical and spindle-shaped, not refracted; without granules in the cytoplasm and, if present, they are small.</i>	Los gránulos del citoplasma son basofílicos; el citoplasma se tiñe de azul. El núcleo condensado se tiñe de azul claro. <i>Granules in cytoplasm are basophylic; cytoplasm stains pale blue. Condensed nucleus stains light blue.</i>
GRA	15.4 $\pm$ 0.29	22.24 $\pm$ 0.17	Se observaron dos tipos: (a) en forma de huso y ovoides, refráctiles con medianos y pocos gránulos en el citoplasma. (b) Células de formas variadas, la mayoría ovoides, refráctiles con numerosos gránulos grandes. <i>Two types are observed: (a) spindle and ovoid in shape, refracted with few, small granules in the cytoplasm. (b) Varied shapes, most cells ovoid, refracted with numerous large granules.</i>	(a) El citoplasma es eosinófilo con núcleo no muy condensado que tiñe de azul oscuro. (b) Núcleo altamente condensado que tiñe azul oscuro; el citoplasma tiñe azul claro con gránulos basófilos. <i>(a) Cytoplasm is eosinophylic with nucleus not very condensed that stains dark blue. (b) Nucleus highly condensed and stains dark blue; cytoplasm stains light blue with basophylic granules.</i>
GGG	1.8 $\pm$ 0.07	19.80 $\pm$ 0.13	La mayoría de las células son ovoides y refráctiles; citoplasma completamente lleno de gránulos grandes. El núcleo no es siempre evidente. <i>Most cells are ovoid and refracted; cytoplasm completely full of large granules. The nucleus is not always evident.</i>	El núcleo, cuando es evidente, está altamente condensado y tiñe de azul oscuro; el citoplasma es eosinófilo con gránulos basófilos. <i>The nucleus, when evident, is highly condensed and stains dark blue; the cytoplasm is eosinophylic with basophylic granules.</i>
Total	100%			

<sup>1</sup> Porcentaje promedio ( $n = 32$  langostas  $\pm$  DE)./Average percentage ( $n = 32$  lobsters  $\pm$  SD).

<sup>2</sup> Promedio de 182, 367, 372 y 280 determinaciones  $\pm$  DE para los HIA, GRA y GGG a partir de 20 langostas. Medidas tomadas del eje mayor de la célula./Mean of 182, 367, 372 and 280 determinations  $\pm$  SD for HIA, GRA and GGG for 20 lobsters. Measurements taken from the cell's largest axis.

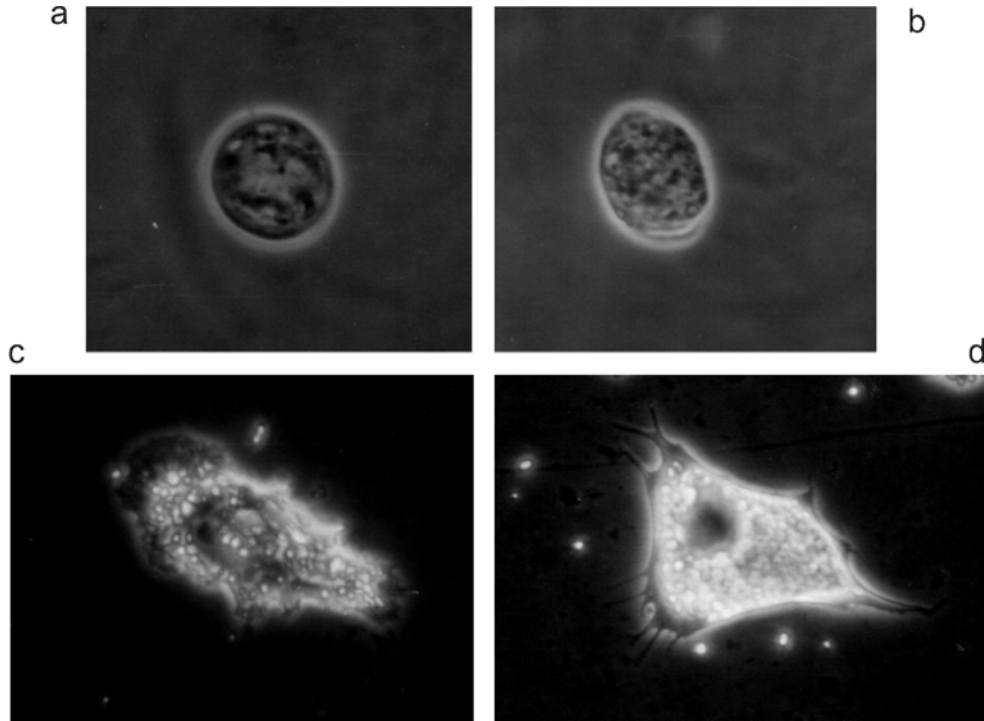
### Experimentos in vitro

Mediante la observación cualitativa en microscopio de contraste de fases se observó que, a medida que la concentración de carragenano aumentaba, el grado de desgranulación se vio afectado en los granulocitos y granulocitos de gránulos grandes, mientras que en los tratamientos de referencia con MAHL también se presentaron dichas diferencias aunque aparentemente en menor cantidad.

En las monocapas de hemocitos incubadas con *E. coli* que fueron preincubadas en suero de langosta, se observó aglutinación de bacterias y un aumento en la interconexión

Plaquet, 1973; Bauchau, 1981; Tsing *et al.*, 1989). Regarding the THC of *P. interruptus*, the values ( $9\text{--}16 \times 10^6$  cells  $\text{mL}^{-1}$ ) were higher than those reported for the same species ( $4.79 \times 10^6$  cells  $\text{mL}^{-1}$ ) by Gómez-Jiménez *et al.* (2000) and for *Panulirus cygnus* ( $4\text{--}8 \times 10^6$  cells  $\text{mL}^{-1}$ ) by Jussila *et al.* (2000). In contrast, the THC was lower compared with the number of hemocytes ( $13\text{--}28 \times 10^6$  cells  $\text{mL}^{-1}$ ) reported for the lobster *Homarus americanus* (Stewart *et al.*, 1967; Cornick and Stewart, 1978; Stewart *et al.*, 1983). These differences are probably due to an intra- and interspecific variability in the number of hemocytes of decapod crustaceans (Tsing *et al.*, 1989; Hautton *et al.*, 1997; Gargioni and Barraco, 1998).





**Figura 1.** Microfotografías de contraste de fases (60×) de los hemocitos de *Panulirus interruptus*. Muestras de hemolinfa fijadas en formol frío al 4%. (a y b) Hemocitos hialinos, (c) hemocito granular y (d) hemocito de gránulos grandes. Observar los filopodios extendidos de los hemocitos granulares.  
**Figure 1.** Phase-contrast microphotographs (60×) of the hemocytes of *Panulirus interruptus*. Hemolymph samples fixed in 4% cold formalin. (a and b) Hyaline hemocytes, (c) granular hemocyte, and (d) large granule hemocyte. Note the extended phylopodos of the granular hemocytes.

entre hemocitos mediante la extensión de sus filopodios. Durante los ensayos de fagocitosis con *E. coli* se observó que la actividad fagocítica de los hemocitos aumentó de 7.60% a 31.90% (tabla 2) para las diferentes concentraciones de carragenano (de 0% a 0.5%); en contraste, los tratamientos de referencia incubados en MAHL mostraron porcentajes menores, con 6.20% a 22.20% de fagocitosis.

**Tabla 2.** Porcentaje de fagocitosis de *Escherichia coli* por hemocitos de *Panulirus interruptus* expuestos a diferentes concentraciones de carragenano, incubados en suero de langosta y, como referencia, en medio artificial para hemocitos de langosta (MAHL).

**Table 2.** Percentage of phagocytosis of *Escherichia coli* by *Panulirus interruptus* hemocytes exposed to different concentrations of carrageenan, incubated in lobster serum and, as reference, in artificial lobster hemocyte medium (MAHL).

Concentración de carragenano (%)	Fagocitosis (%)	
	Grupo experimental: hemocitos incubados en suero de langosta	Grupo de referencia: hemocitos incubados en MAHL
0.00	7.60	6.20
0.05	16.90	9.20
0.10	23.10	14.80
0.50	31.90	22.20

Three types of hemocytes were found: hyalocytes, granulocytes and large granule granulocytes, according to the classical scheme, in which the cell measurements correspond to the values reported for hemocytes in crustacean decapods (Wood and Visentin, 1967; Cornick and Stewart, 1978; Hose *et al.*, 1990; Jussila *et al.*, 1997; Gargioni and Barraco, 1998; van de Braak *et al.*, 2000). In this study, the hyalocytes (80%) were the most abundant in *P. interruptus*, as reported by Hose *et al.* (1990) for this same species. They were also the most abundant in *H. americanus* (Cornick and Stewart, 1978), crabs (Bauchau and Plaquet, 1973; LaPeyre and Chu, 1990) and penaeid shrimp (Martin and Graves, 1985; Gargioni and Barraco, 1998).

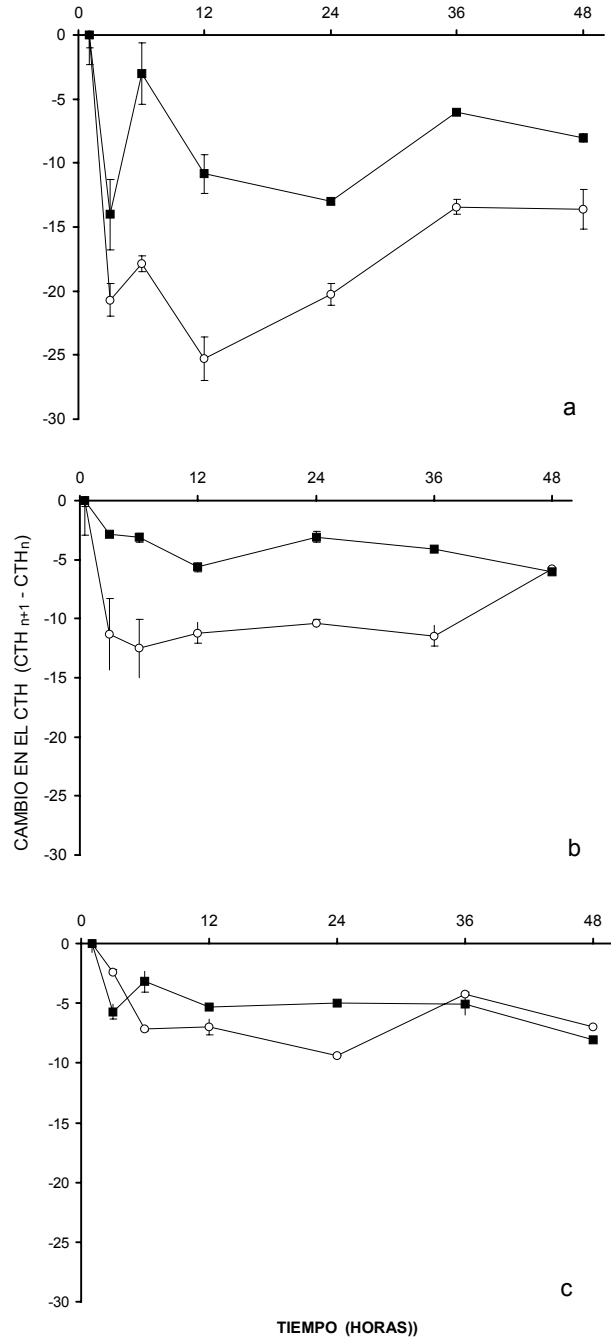
The time series of the *in vivo* experiments consistently shows less change in the number of hemocytes of the control groups. The handling of the organisms in experiment 1 caused stress, as indicated by the more drastic changes in the THC (fig. 2a). In experiment 2, designed to reduce stress, the differences were smaller (fig. 2b), and in experiment 3, even smaller (fig. 2c). These experiments clearly show that carrageenan produces a significant ( $P < 0.05$ ) hemocytic reaction (non-specific) during the first 36 h. The three experiments produced similar results: a decrease in the change of THC, followed by stabilization towards higher levels, which can be interpreted as cellular recuperation. An initial reduction in the number of hemocytes has been observed in decapod crustaceans subjected

## Discusión

Las variaciones individuales en el CTH de *P. interruptus* no están asociadas con los cambios de temperatura durante el experimento, ya que en las pruebas preliminares se observó una gran variación individual en el CTH de las langostas mantenidas bajo las mismas condiciones de laboratorio. Es probable que las fluctuaciones observadas estén asociadas con otro tipo de factores, tales como condición fisiológica, ciclo de muda, madurez gonadal, monotonía de la dieta, etc. (Bauchau y Plaquet, 1973; Bauchau, 1981; Tsing *et al.*, 1989). En cuanto al CTH de *P. interruptus*, los valores encontrados fueron mayores ( $9$  a  $16 \times 10^6$  cél  $\text{mL}^{-1}$ ) que los reportados para la misma especie ( $4.79 \times 10^6$  cél  $\text{mL}^{-1}$ ) por Gómez-Jiménez *et al.* (2000) y para *Panulirus cygnus* ( $4$  a  $8 \times 10^6$  cél  $\text{mL}^{-1}$ ) por Jussila *et al.* (2000). En contraste, el CTH de *P. interruptus* encontrado fue menor que el de la langosta *Homarus americanus*, de  $13$ – $28 \times 10^6$  cél  $\text{mL}^{-1}$  (Stewart *et al.*, 1967; Cornick y Stewart, 1978; Stewart *et al.*, 1983). Estas diferencias posiblemente se deben a una variabilidad intra e interespecífica en el número de hemocitos de los crustáceos decápodos (Hautton *et al.*, 1997; Tsing *et al.*, 1989; Gargioni y Barraco, 1998).

Se encontraron tres tipos de hemocitos: hialocitos, granulocitos y granulocitos de gránulos grandes, de acuerdo con el esquema clásico, en donde las medidas celulares corresponden a los valores reportados para hemocitos de crustáceos decápodos (Wood y Visentin, 1967; Cornick y Stewart, 1978; Hose *et al.*, 1990; Jussila *et al.*, 1997; Gargioni y Barraco, 1998; van de Braak *et al.*, 2000). En este estudio, los hialocitos (80%) resultaron ser los más abundantes en *P. interruptus*, como lo reportan para esta misma especie Hose *et al.* (1990). En forma similar, los hialocitos han resultado más abundantes en *H. americanus* (Cornick y Stewart, 1978), en cangrejos (Bauchau y Plaquet, 1973; LaPeyre y Chu, 1990) y en camarones peneidos (Martin y Graves, 1985; Gargioni y Barraco, 1998).

La serie de tiempo de los experimentos *in vivo* muestra consistentemente un menor cambio en el número de hemocitos en los grupos control. Se observó que el manejo de los organismos en el experimento 1 causó estrés, denotado por cambios más drásticos en el CTH (fig. 2a). En el experimento 2, diseñado para reducir este estrés, las diferencias fueron menores (fig. 2b), y aún menores en el experimento 3 (fig. 2c). Estos experimentos muestran claramente que el carragenano produce una reacción hemocítica (no específica) significativa ( $P < 0.05$ ) durante las primeras 36 h. El resultado de los tres experimentos fue similar: una reducción en el cambio del CTH seguida por una estabilización hacia niveles normales, la cual se puede interpretar como una recuperación celular. En crustáceos decápodos sujetos a vacunación e infecciones subletales se ha observado una reducción inicial en el número de hemocitos. Por ejemplo, *Carcinus maenas* reduce significativamente el número de hemocitos circulantes después de la inoculación



**Figura 2.** Experimentos *in vivo*. Cambio en el conteo total de hemocitos (CTH) de los grupos control (○) y experimental (■), después de la inoculación con  $\lambda$ -carragenano. (a) Experimento 1, (b) experimento 2 y (c) experimento 3. Las barras indican la desviación estándar.

**Figure 2.** *In vivo* experiments. Change in the total hemocyte count (CTH) of the control (○) and experimental (■) groups after inoculation with  $\lambda$ -carrageenan. (a) Experiment 1, (b) experiment 2 and (c) experiment 3. The bars indicate standard deviation.

to vaccination and sublethal infections. For example, there is a significant reduction in the number of circulating hemocytes in *Carcinus maenas* after inoculation with *Listonella* (= *Vibrio*) *anguillarum*, *Moraxella* spp. and *Bacillus cereus* (Smith and Ratcliffe, 1978; Hautton *et al.*, 1997), similar to that observed

con *Listonella* (= *Vibrio*) *anguillarum*, *Moraxella* spp. y *Bacillus cereus* (Smith y Ratcliffe, 1978; Hautton *et al.*, 1997), de manera similar a lo observado con *Scyonia ingentis* (Martin *et al.*, 1993). El CTH de *Litopenaeus vannamei* decrece en las primeras 24 h después de la exposición a  $\beta$ -glucanos y polisacáridos sulfatados, para después incrementar el número de hemocitos a niveles normales (Campa-Córdova *et al.*, 2002). Probablemente esta reducción inicial en el cambio del CTH se deba a que las partículas de carragenano son activamente fagocitadas, disminuyendo el número de células hialinas responsables de la fagocitosis (Johansson *et al.*, 2000). En diferentes trabajos sobre el uso de endotoxinas bacterianas como inmunoestimulantes, se ha observado que los crustáceos decápodos inyectados muestran una proliferación en el número de hemocitos circulantes durante dos a cuatro días (McKay y Jenkin, 1970; Johnson *et al.*, 1981; Stewart *et al.*, 1983; Goarant y Boglio, 2000).

Los experimentos *in vivo* trataron de emular las condiciones de estrés (manejo y exposición al aire) que sufren las langostas durante su transporte en vivo. De acuerdo con los resultados, el carragenano amortigua la reducción del cambio en el número de hemocitos, durante 36 h, tiempo en el que las langostas estuvieron expuestas a un estrés similar al producido durante el manejo y transporte en vivo. Existe evidencia de que las langostas, confinadas durante el transporte, reducen drásticamente el CTH (Jussila *et al.*, 1997); por lo tanto, es posible que este tipo de glicano tenga potencial como agente profiláctico o estimulante de tiempo corto. Se podría inducir una reducción inicial en el CTH inoculando carragenano en las langostas, dejando sentir su efecto un mínimo de 24 h, después de lo cual los organismos deberían tener un mecanismo de defensa no específico reforzado. Esto último puede aminorar la debilidad y muerte de langostas debidas al manejo y transporte en vivo. Sin embargo, se requiere de una mayor investigación para evaluar si el carragenano administrado en el alimento puede tener en el sistema inmunológico no específico el mismo efecto observado en este estudio.

La aglutinación de *E. coli* incubadas en suero de langosta muestra que el suero contiene factores que estimulan o activan la agregación de células o partículas extrañas, lo cual pudiera facilitar su fagocitosis. En langostas se han caracterizado algunas opsoninas, las cuales son sustancias que facilitan el proceso de fagocitosis (McKay y Jenkin, 1970; Fuller y Doolittle, 1971; Cornick y Stewart, 1973; Hall y Rowlands, 1974; Goldenberg y Greenberg, 1983; Holmbland y Söderhall, 1999). La desgranulación observada en los hemocitos demuestra la facilidad de lisis celular (Gargioni y Barraco, 1998), aspecto importante que debe considerarse en experimentos *in vitro* con hemocitos. Los ensayos de fagocitosis mostraron un incremento en la actividad fagocítica al aumentar la concentración de carragenano, tanto en los incubados en suero como los incubados con MAHL, lo que demuestra que el carragenano puede activar algunos factores involucrados en la fagocitosis

en *Scyonia ingentis* (Martin *et al.*, 1993). Likewise, there is a decrease in the THC of *Litopenaeus vannamei* in the first 24 h after exposure to  $\beta$ -glucans and sulfated polysaccharides, after which the number of hemocytes increases to normal levels (Campa-Córdova *et al.*, 2002). This initial reduction in the change of THC probably occurs because carrageenan particles are actively phagocytosed, decreasing the number of hyaline cells responsible for phagocytosis (Johansson *et al.*, 2000). In different studies on the use of bacterial endotoxins as immunostimulants, it has been found that inoculated decapod crustaceans show a proliferation in the number of circulating hemocytes for two to four days (McKay and Jenkin, 1970; Johnson *et al.*, 1981; Stewart *et al.*, 1983; Goarant and Boglio, 2000).

The *in vivo* experiments tried to emulate the stress conditions (handling and exposure to air) experienced by the lobsters during live transportation. According to the results, carrageenan lessens the decrease in the number of hemocytes during 36 h, time in which the lobsters were exposed to a similar stress as that produced during live transportation and handling. Lobsters confined during transport have been found to significantly reduce THC (Jussila *et al.*, 1997); therefore, this type of glycan may have potential as a short-term prophylactic or stimulating agent. An initial reduction in THC could be induced by inoculating the lobsters with carrageenan, with a minimum effect of 24 h; after this, the organisms should have a strengthened nonspecific defense mechanism. This could reduce weakness and death in the lobsters due to live transport and handling. However, further research is needed to determine if the carrageenan administered in the food can have the same affect on the nonspecific immune system observed in this study.

The agglutination of *E. coli* incubated in lobster serum indicates that the serum has factors that stimulate or activate the binding of cells or foreign particles that could induce phagocytosis. Some opsonins (substances that promote phagocytosis) have been characterized in lobsters (McKay and Jenkin, 1970; Fuller and Doolittle, 1971; Cornick and Stewart, 1973; Hall and Rowlands, 1974; Goldenberg and Greenberg, 1983; Holmbland and Söderhall, 1999). The degranulation observed in the hemocytes shows the facility of cellular lysis (Gargioni and Barraco, 1998), an important aspect that should be considered during *in vitro* experiments with hemocytes. The phagocytosis tests showed an increase in phagocytic activity with the corresponding increase in carrageenan concentration, for the organisms incubated in serum as well as ALHM; this indicates that carrageenan can activate some factors involved in phagocytosis (Söderhall, 1992). However, greater phagocytosis was observed in the group incubated in lobster serum than in the group with ALHM, indicating that other factors are involved in phagocytosis, such as the above-mentioned opsonins.

In decapod crustaceans, the  $\beta$ -1,3 glucans activate the hemocytes (Unestam and Söderhall, 1977; Morita *et al.*, 1981; Kakinuma *et al.*, 1981). Paterson *et al.* (1976) reported that

(Söderhall, 1992). Sin embargo, en el grupo incubado en suero de langosta se observó una mayor fagocitosis que en el grupo incubado en MAHL, lo que demuestra que hay otros factores involucrados en la fagocitosis, como son las opsoninas antes mencionadas.

En crustáceos decápodos, los  $\beta$ -1,3 glucanos tienen la propiedad de activar a los hemocitos (Unestam y Söderhall, 1977; Morita *et al.*, 1981; Kakinuma *et al.*, 1981). Paterson *et al.* (1976) reportaron que los hemocitos de *H. americanus* fagocitaron el doble de eritrocitos incubados en suero de langosta, mientras que, en cangrejos, la fagocitosis de *Moraxella* sp. se incrementó del 5.6% al 18.5% con la adición de laminarin (Smith y Söderhall, 1983); estos autores atribuyen este resultado a que el glicano activa el sistema profenoloxidasa que se encuentra en los hemocitos granulares. Chang *et al.* (2000) encontraron un incremento en la actividad fagocítica de los hemocitos de *Penaeus monodon*, a los cuales se les administró  $\beta$ -1,3 glucanos en su dieta.

El uso de un glicano como el carragenano puede activar el sistema celular de defensa de las langostas, tanto la proliferación celular como la fagocitosis. Por tanto, la administración de este glicano a las langostas puede reforzar sus defensas y elevar la supervivencia bajo condiciones de estrés.

De esta manera, se concluye que el carragenano estimula tanto la proliferación celular como la fagocitosis; sin embargo, se recomienda hacer mayores estudios en los que se pueda analizar el efecto de la administración de este compuesto por otras vías como, por ejemplo, en la alimentación, para poder dar una recomendación más práctica para su uso.

## Agradecimientos

Los autores agradecen a Rafael Solana su ayuda en el análisis estadístico de los resultados y a Neil Duncan sus valiosos comentarios. Se reconoce ampliamente el apoyo financiero de CONACYT, México (proyecto 11925-B). El primer autor recibió una beca del CONACYT para completar su programa de maestría en ciencias.

## Referencias

Aiken, D.E. (1980). Molting and growth. In: J.S. Cobb and B.F. Phillips (eds.), *The Biology and Management of Lobsters*, Vol. I. Physiology and Behavior. Academic Press, New York, pp. 57–70.

Bauchau, A.G. (1981). Crustaceans. In: N.A. Ratcliffe and A.F. Rowley (eds.), *Invertebrate Blood Cells*. Vol. 2. Academic Press, New York, pp. 385–420.

Bauchau, A.G. and Plaquet, J.C. (1973). Variation du nombres des hémocytes chez les crustacés brachyours. *Crustaceana*, 24: 215–223.

Campa-Córdova, A.I., Hernández-Saavedra, N., Phillips, R.D. and Ascencio, F. (2002). Generation of superoxide anion and SOD activity in haemocytes and muscle of American white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) as a response to  $\beta$ -glucan and sulphated polysaccharide. *Fish Shellfish Immunol.*, 12: 353–366.

hemocytes of *H. americanus* phagocytosed double the erythrocytes incubated in lobster serum, whereas in crabs, phagocytosis in *Moraxella* sp. increased from 5.6% to 18.5% when laminarin was added (Smith and Söderhall, 1983); according to these authors, this occurs because glycan activates the profenoloxidase system found in granular hemocytes. Chang *et al.* (2000) found an increase in phagocytic activity of the hemocytes of *Penaeus monodon* when  $\beta$ -1,3 glucans were included in their diet.

The use of a glycan such as carrageenan can activate the cellular defense system of lobsters, such as cellular proliferation and phagocytosis. Hence, the administration of this glycan to lobsters could strengthen their defenses and increase survival under these conditions.

It is therefore concluded that carrageenan stimulates cellular proliferation as well as phagocytosis; however, further research is recommended to study the effect of administering this compound in other ways, such as in food, in order to be able to give a more practical recommendation for its use.

## Acknowledgements

The authors thank Rafael Solana for his help with the statistical analysis and Neil Duncan for his valuable comments. This study received financial support from CONACYT, Mexico (project 11925-B). The first author received a scholarship from CONACYT to complete the M.Sc. program.

English translation by Christine Harris.

Chang, C.F., Chen, H.Y., Su, M.S. and Liao, I.C. (2000). Immunomodulation by dietary  $\beta$ -1,3-glucan in the brooders of the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Fish Shellfish Immunol.*, 10: 505–514.

Chong, A.S. and Parish, C.R. (1985). Nonimmune lymphocyte-macrophage interaction. II. Evidence that interaction involves sulfated polysaccharides recognition. *Cell. Immunol.*, 92: 277–289.

Cornick, J.W. and Stewart, J.E. (1973). Partial characterization of a natural agglutinin in the hemolymph of the lobster, *Homarus americanus*. *J. Invertebr. Pathol.*, 21: 225–263.

Cornick, J.W. and Stewart, J.E. (1978). Lobster (*Homarus americanus*) hemocytes: Classification, differential counts, and associated agglutinin activity. *J. Invertebr. Pathol.*, 31: 194–203.

Engstad, R.E. and Robertsen, B. (1994). Specificity of a  $\beta$ -glucan receptor on macrophages from Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Dev. Comp. Immunol.*, 18: 397–408.

Evans, L.H., Fotedar, S., Jussila, J., McBride, S. and Tsvetnenko, E. (2000). Immunological measures of stress in spiny lobster (*Panulirus cygnus* George). *J. Shellfish Res.*, 19: 678–679.

Fuller, M. and Doolittle, R.F. (1971). Studies of invertebrate fibrinogen. I. Purification and characterization of fibrinogen of the spiny lobster. *Biochem.*, 10: 1305–1310.

Gargioni, R. and Barraco, M.A. (1998). Hemocytes of the palaemonids *Macrobrachium rosenbergii* and *M. acanthurus*, and of the penaeid *Penaeus paulensis*. *J. Morphol.*, 236: 209–221.

- Goarant, C. and Boglio, E. (2000). Changes in hemocyte counts in *Litopenaeus stylirostris* subjected to sublethal infection and to vaccination. *J. World Aquacult. Soc.*, 31: 123–129.
- Goldenberg, A.Z. and Greenberg, A.H. (1983). Functional heterogeneity of carbohydrate-binding hemolymph proteins: Evidence of nonagglutinating opsonin in *Homarus americanus*. *J. Invertebr. Pathol.*, 42: 33–41.
- Gómez-Jiménez, S., Uglow, R.F. and Gollas-Galvan, T. (2000). The effects of cooling and emersion on total haemocyte count and phenoloxidase activity of the spiny lobster *Panulirus interruptus*. *Fish Shellfish Immunol.*, 10: 631–635.
- Hall, J.L. and Rowlands, D.T. (1974). Heterogeneity of lobster agglutinins. I. Purification and physicochemical characterization. *Biochem.*, 13: 821–832.
- Hautton, C., Williams, J.A. and Hawkins, L.E. (1997). The effects of a live *in vivo* pathogenic infection on aspects of the immunocompetence of the common shore crab, *Carcinus maenas* (L.). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 211: 115–128.
- Holmblom, T. and Söderhall, K. (1999). Cell adhesion molecules and antioxidative enzymes in a crustacean, possible role in immunity. *Aquaculture*, 172: 111–123.
- Hose, J.E., Martin, G.G. and Gerard, A.S. (1990). A decapod hemocyte classification scheme integrating morphology, cytochemistry, and function. *Biol. Bull.*, 178: 33–45.
- Johansson, M.W., Kallaya, P.K. and Söderhall, K. (2000). Crustacean haemocytes and haematopoiesis. *Aquaculture*, 191: 45–52.
- Johnson, P.T., Stewart, E.J. and Arie, B. (1981). Histopathology of *Aerococcus viridians* var. *homari* infection (gaffkemia) in the lobster, *Homarus americanus*, and a comparison with histological reactions to a gram-negative species, *Pseudomonas petroleus*. *J. Invertebr. Pathol.*, 38: 127–148.
- Jussila, J.J., Jago, E., Tsvetnenko, B., Dunstan, B. and Evans, L.H. (1997). Total and differential hemocyte counts in western rock lobsters (*Panulirus cygnus* George) under post-harvest stress. *Mar. Freshwater Res.*, 48: 863–867.
- Jussila, J., Tsvetnenko, E., Evans, L.H. and Jago, E. (2000). Post-harvest handling in western rock lobster: hemocytes' point of view. *J. Shellfish Res.* 19: 677.
- Kakinuma, A., Asano, T., Torri, H. and Sugino, Y. (1981). Gelation of *Limulus* amoebocyte lysate by an antitumor (1→3)- $\beta$ -D-glucan. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 101: 434–439.
- LaPeyre, J.F. and Chu, F.L. (1990). Blue crab hemocytes: A preliminary study. In: F.O. Perkins and T.C. Cheng (eds.), *Pathology in Marine Sciences*. Academic Press, San Diego, California, pp. 15–20.
- Martin, G.G. and Graves, B.L. (1985). Fine structure and classification of shrimp hemocytes. *J. Morphol.*, 185: 339–348.
- Martin, G.G., Poole, D., Poole, C., Hose, J.E., Arias, M., Reynolds, L., McKrell, N. and Whang, A. (1993). Clearance of bacteria injected into the hemolymph of the penaeid shrimp, *Scyonia ingentis*. *J. Invertebr. Pathol.*, 62: 308–315.
- McKay, D. and Jenkin, C.R. (1970). Immunity in the invertebrates. The role of the serum factors in phagocytosis of the erythrocytes by hemocytes of the freshwater crayfish (*Parachanna bicarinatus*). *Austr. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, 48: 609–617.
- Morita, T., Tanaka, S., Nakamura, T. and Iwanaga, S. (1981). A new (1→3)- $\beta$ -D-glucan-mediated coagulation pathway found in *Limulus* amoebocytes. *FEBS Lett.*, 129: 318–321.
- Nikl, L., Albright, L.J. and Evelyn, T.P. (1991). Influence of seven immunostimulants on the immune response of coho salmon to *Aeromonas salmonicida*. *Dis. Aquat. Org.*, 12: 7–12.
- Painter, T.J. (1983). Algal polysaccharides. In: G.O. Aspinall (ed.), *The Polysaccharides*. Vol. 2. Academic Press, New York, pp. 25–43.
- Paterson, B.D. and Spanoghe, P.T. (1997). Stress indicators in marine decapod crustaceans, with particular reference to the grading of western rock lobsters (*Panulirus cygnus*) during commercial handling. *Mar. Freshwater Res.*, 48: 829–834.
- Paterson, W.D. and Stewart, J.E. (1974). *In vitro* phagocytosis by hemocytes of the American lobster (*Homarus americanus*). *J. Fish. Res. Board Canada*, 31: 1051–1056.
- Paterson, W.D., Stewart, J.E. and Zwicker, B.M. (1976). Phagocytosis as a cellular immune response mechanism in the American lobster *Homarus americanus*. *J. Invertebr. Pathol.*, 27: 95–104.
- Phillips, H.J. (1973). Dye exclusion tests for cell viability. In: P.F. Kruse and M.K. Patterson (eds.), *Tissue Culture Methods and Applications*. Academic Press, New York, pp. 406–408.
- Raa, J. (1996). The use of immunostimulatory substances in fish and shellfish farming. *Rev. Fish. Sci.*, 4: 229–288.
- Robertsen, B., Engstad, R.E. and Jorgensen, J.B. (1994).  $\beta$ -Glucans as immunostimulants in fish. In: J.S. Stolen and T.C. Fletcher (eds.), *Modulators of Fish Immune Responses*. Vol. 1. SOS Publications. Fair Haven, New Jersey, pp. 83–99.
- Smith, V.J. and Ratcliffe, N.A. (1978). Host defense reactions of the shore crab *Carcinus maenas* (L.), *in vitro*. *J. Mar. Biol. Assoc. UK*, 58: 367–379.
- Smith, V.J. and Söderhall, K. (1983).  $\beta$ -1,3 glucan activation of crustacean hemocytes *in vitro* and *in vivo*. *Biol. Bull.*, 164: 299–314.
- Söderhall, K. (1992). Biochemical and molecular aspects of cellular communication in arthropods. *Biol. Bull.*, 59: 141–151.
- Söderhall, K. and Cerenius, L. (1992). Crustacean immunity. *Ann. Rev. Fish Dis.*, 3–23.
- Song, Y.L., Liu, J.J., Chan, L.L. and Sung, H.H. (1997). Glucan-induced disease resistance in tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Dev. Biol. Standar.*, 90: 413–421.
- Spanoghe, P.T. and Bourne, P.K. (1997). Relative influence of environmental factors and processing techniques on *Panulirus cygnus* morbidity and mortality during simulated live shipments. *Mar. Freshwater Res.*, 48: 839–844.
- Stewart, J., Cornick, J.W. and Dingle, J.R. (1967). An electronic method for counting lobster (*Homarus americanus* Milne Edwards) hemocytes and the influence of diet on hemocyte numbers and hemolymph proteins. *Can. J. Zool.*, 45: 291–304.
- Stewart, J.E., Arie, B. and Marks, L. (1983). Hemocyte patterns during gaffkemia infections and induction of resistance in *Homarus americanus*. *Intl. Comm. Sci. Exp. Med. Sea*, 182: 126–129.
- Sung, H.H., Chan, H.J., Her, C.H., Chan, J.C. and Song, Y.L. (1998). Phenoloxidase activity of hemocytes derived from *Penaeus monodon* and *Macrobrachium rosenbergii*. *J. Invertebr. Pathol.*, 71: 26–33.
- Takeda, K., Matsumoto, T. and Yamaguchi, K. (1998). Acute induction of interleukin-6 and biphasic changes of serum complement C3 by carrageenan in mice. *Med. Inflamm.*, 7: 221–223.
- Tsing, A., Arcier, J.M. and Bhehelin, M. (1989). Hemocytes of penaeid and palaemonid shrimps: Morphology, cytochemistry, and hemograms. *J. Invertebr. Pathol.*, 53: 64–77.

- Unestam, T. and Söderhall, K. (1977). Soluble fragments from fungal cell walls elicit defense reactions in crayfish. *Nature*, 265: 45–46.
- Vadstein, O. (1997). The use of immunostimulation in marine larviculture: Possibilities and challenges. *Aquaculture*, 155: 401–407.
- Van de Braak, C.B., Taverne, N., Botterblom, H.A., van der Knaap, W.P. and Rombout, J.H. (2000). Characterization of different morphological features of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) haemocytes using monoclonal antibodies. *Fish Shellfish Immunol.*, 10: 515–530.
- Vijayakumaran, M. and Radhakrishnan, E.V. (1997). Live transport and marketing of spiny lobsters in India. *Mar. Freshwater Res.*, 48: 823–828.
- Williams, D.L., Yaeger, R.G., Pretus, H.A., Browder, I.W., McNamee, R.B. and Jones, E.L. (1989). Immunization against *Trypanosoma cruzi*: adjuvant effect of glucan. *Intl. J. Immunopharm.*, 11: 403–410.
- Wood, P.J. and Visentin, L.P. (1967). Histological and histochemical observations of the haemolymph cells in the crayfish, *Oronconectes virilis*. *J. Morphol.*, 123: 559–568.
- Yano, T., Matsuyama, H. and Mangindaan, R.E. (1991). Polysaccharide-induced protection of carp, *Cyprinus carpio* L., against bacterial infection. *J. Fish Dis.*, 14: 577–582.