



Latin American Journal of Aquatic Research

E-ISSN: 0718-560X

lajar@ucv.cl

Pontificia Universidad Católica de Valparaíso
Chile

González, Marcelo; Arenas, Gloria

Modificación de los parámetros inmunitarios hemolinfáticos en el ostión del norte (*Argopecten purpuratus* Lamarck, 1819) afectados por el cuadro de retracción del manto

Latin American Journal of Aquatic Research, vol. 35, núm. 1, 2007, pp. 3-12

Pontificia Universidad Católica de Valparaíso
Valparaíso, Chile

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=175020737001>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica

Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal

Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

VERSIÓN IMPRESA ISSN 0716-1069

VERSIÓN ELECTRÓNICA ISSN 0717-7178

INVESTIGACIONES MARINAS

www.scielo.cl

www.investigacionesmarinas.cl

Investigaciones Marinas publica Artículos y Notas Científicas originales y opcionalmente, Revisiones, relacionados con ciencia y tecnología del mar, en los siguientes tópicos: oceanografía biológica, química, física y geológica, contaminación marina, pesquerías, acuicultura y manejo costero, realizados preferentemente frente a las costas de Latinoamérica. Los documentos concernientes a investigaciones multidisciplinarias son particularmente bienvenidos.

Investigaciones Marinas publishes papers as Articles, Short Communications and optionally, Reviews, on marine sciences and technology, including the following fields: biological, chemical, physical and geological oceanography, marine pollution, fisheries, aquaculture and coastal management, mainly addressed to solve problems off Latinoamerican coasts. Papers concerning multidisciplinary research are particularly welcomed.

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE VALPARAÍSO
FACULTAD DE RECURSOS NATURALES
ESCUELA DE CIENCIAS DEL MAR

www.ecm.ucv.cl

EVALUADORES DE LOS TRABAJOS PUBLICADOS EN ESTE NÚMERO

Raúl Castro <i>Universidad de Antofagasta, Antofagasta, Chile</i>	Gloria Collantes <i>Universidad de Valparaíso, Reñaca, Chile</i>
María Berta Cousseau <i>Universidad Nacional de Mar del Plata Buenos Aires, Argentina</i>	Luis Cubillos <i>Universidad de Concepción Concepción, Chile</i>
Mario Edding <i>Universidad Católica del Norte, Coquimbo, Chile</i>	Nora Eslava <i>Universidad de Oriente, Isla de Margarita, Venezuela</i>
José Espinoza <i>Instituto del Mar de Perú, Callao, Perú</i>	Claudio Gatica <i>Instituto de Investigación Pesquera, Talcahuano, Chile</i>
Carlos Hurtado <i>Pontificia Universidad Católica de Valparaíso Valparaíso, Chile</i>	Gustavo Lovrich <i>Centro Austral de Investigaciones Científicas Ushuaia, Argentina</i>
Ismael Kong <i>Universidad de Antofagasta, Antofagasta, Chile</i>	Georgina Lembeye <i>Subsecretaría de Pesca, Valparaíso, Chile</i>
Karin Lohrmann <i>Universidad Católica del Norte Coquimbo, Chile</i>	Carlos Martínez <i>Universidad de São Paulo, Ribeirão Preto São Paulo, Brasil</i>
Vivian Montecino <i>Instituto de Fomento Pesquero, Valparaíso, Chile</i>	Jaime Montes <i>Universidad de Barcelona, Barcelona, España</i>
Armando Mujica <i>Universidad Católica del Norte, Coquimbo, Chile</i>	Sergio Neira <i>Universidad de Concepción, Concepción, Chile</i>
Germán Pequeño <i>Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile</i>	Gemita Pizarro <i>Instituto de Fomento Pesquero, Punta Arenas, Chile</i>
Bruno Preski <i>Cámara de Armadores de Pesqueros Congeladores de la Argentina, Argentina</i>	Luciano Rodríguez <i>Universidad del Mar Chile</i>
Sergio Salinas <i>Pontificia Universidad Católica de Valparaíso Valparaíso, Chile</i>	Stephen Smith <i>Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, México</i>
Jorge Tam Málaga <i>Instituto del Mar de Perú, Callao, Perú</i>	Martín Thiel <i>Universidad Católica del Norte, Coquimbo, Chile</i>
Paulina Uribe <i>Fundación Ciencia para la Vida Santiago, Chile</i>	Eleuterio Yáñez <i>Pontificia Universidad Católica de Valparaíso Valparaíso, Chile</i>
Manuel Zettina <i>Instituto Politécnico Nacional de Baja California Baja California, México</i>	

Modificación de los parámetros inmunitarios hemolinfáticos en el ostión del norte (*Argopecten purpuratus* Lamarck, 1819) afectados por el cuadro de retracción del manto

Marcelo González¹ & Gloria Arenas¹

¹Laboratorio de Genética e Inmunología Molecular, Instituto de Biología
Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Casilla 4059, Valparaíso, Chile

RESUMEN. En el ostión del norte *Argopecten purpuratus* se caracterizó la variación de algunos parámetros inmunitarios de la hemolinfa frente al cuadro patológico descrito como retracción del manto y se estableció, mediante microscopía de luz y electrónica de transmisión, una relación entre la reacción hemocítica de encapsulación y esa sintomatología. La comparación cuantitativa del número de hemocitos, la capacidad fagocítica de estas células frente a levaduras y la citotoxicidad de la hemolinfa en ejemplares con y sin retracción del manto, demostró que los ostiones que presentaron retracción del manto tienen una respuesta diferencial en los hemocitos y en el suero. Cuando hay retracción del manto el número de hemocitos circulantes disminuye. En cambio, el suero aumentó su capacidad citotóxica frente a eritrocitos. Por otra parte, cuando las levaduras fueron previamente incubadas en este suero disminuyó la capacidad fagocítica de los hemocitos. Los resultados obtenidos muestran que el cuadro patológico denominado retracción del manto del ostión del norte determina una variación significativa de los componentes inmunitarios celulares y humorales de la hemolinfa, y una respuesta de encapsulación frente a la presencia de cuerpos coalescentes en el manto.

Palabras clave: moluscos, inmunidad innata, hemocitos, ostión, *Argopecten purpuratus*.

Modification of hemolymphatic immune parameters in the scallop (*Argopecten purpuratus* Lamarck, 1819) affected by mantle retraction

ABSTRACT. The scallop *Argopecten purpuratus* is characterized by variations in some immunity parameters of the hemolymph when faced with the pathology known as mantle retraction. A relationship between the hemocytic reaction of encapsulation and this pathology was established with light and electronic transmission microscopy. The quantitative comparison of the number of hemocytes, the phagocytic capacity of these cells in the presence of yeasts, and the cytotoxicity of the hemolymph in specimens with and without mantle retraction showed that the hemocytes and serum of scallops with mantle retraction respond differently. When mantle retraction is observed, the number of circular hemocytes decreases. In exchange, the serum increases its cytotoxic capacity when faced with erythrocytes. On the other hand, when the yeasts were previously incubated in this serum, the phagocytic capacity of the hemocytes decreased. The results show that the pathology known as mantle retraction in the scallop determines a significant variation in cellular immunity and the humoral components of the hemolymph, and an encapsulation response in the presence of coalescent bodies in the mantle.

Key words: mollusks, innate immunity, hemocytes, scallop, *Argopecten purpuratus*.

Autor correspondiente: Marcelo González (mgonzalez@inach.cl).

Dirección actual: Departamento Científico, Instituto Antártico Chileno. Plaza Muñoz Gamero 1055, Punta Arenas, Chile.

INTRODUCCIÓN

La respuesta inmune en moluscos está mediada por factores celulares y humorales y se ha demostrado que existe una estrecha vinculación entre estos dos componentes. Los hemocitos son células capaces de generar cambios de forma por la emisión de

seudopodios, actividad fagocítica, citotoxicidad y encapsulación de partículas de gran tamaño (Roch, 1999). Estas células circulantes están presentes en la hemolinfa, pero también son capaces de salir de la circulación y migrar a otros tejidos del animal donde pueden agregarse para restringir la infección o alguna lesión tisular (Bachère *et al.*, 2004). Su ca-

pacidad de fagocitosis es una de las funciones esenciales de los hemocitos para eliminar agentes exógenos como bacterias o protozoos (Bayne, 1990), en este caso se induce la producción de especies reactivas de oxígeno (Nappi & Ottaviani, 2000; Lambert *et al.*, 2003). En bivalvos pectínidos la capacidad fagocítica se ha evaluado en *Pecten maximus* con diversos tipos de bacterias y levaduras (Lambert & Nicolas, 1998).

La encapsulación permite la inmovilización de partículas de tamaño superior al de los hemocitos, esta respuesta comprende la formación de capas concéntricas, formadas por hemocitos. La formación de cápsulas de origen hemocitario frente a protozoos parásitos ha sido estudiada en detalle en la ostra *C. virginica* (Cheng, 1996) y en las almejas *Tapes semidecussatus* (Montes *et al.*, 1995) y *Mercenaria mercenaria* (Smolowitz *et al.*, 1998). El modelo más estudiado en la respuesta inmune innata de hemocitos frente a las larvas de tremátodos de *Schistosoma mansoni* ha sido el molusco gastrópodo *Biomphalaria glabrata* (Mollusca: Pulmonata) (Bayne *et al.*, 2001), donde se ha demostrado que el parásito tiene un efecto modulador sobre varios parámetros hemocitarios, como la supresión de la fagocitosis, cambio de la movilidad, variación en el número de hemocitos, citoadherencia y capacidad metabólica (Noda & Loker, 1989; Fryer & Bayne, 1990; Noda & Sato, 1990).

En el ostión del norte (*Argopecten purpuratus*) se han caracterizado los componentes de su sistema de defensa en relación al número y tipos de hemocitos, capacidad fagocítica, citotóxica y de producción de especies reactivas de oxígeno (González & Arenas, 2002). Sin embargo, no se ha descrito un tipo de respuesta inmune que tome en cuenta estos diversos parámetros hemolinfáticos frente a un síntoma patológico. En este trabajo se evalúan los mecanismos de la respuesta inmune en ostiones que presentan un cuadro denominado retracción del manto, descrito para ostiones cultivados por Campalans *et al.* (1997). Este cuadro patológico se caracteriza por la deformación de valvas, deposición de material oscuro característico al interior de éstas, retracción del borde externo del manto y presencia de un número variable de cuerpos ovoides coalescentes. Esta anomalía se ha observado en los principales centros de cultivo del sur de Chile, desde Calbuco a Chiloé.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los ostiones fueron obtenidos desde el centro comercial de cultivo localizado en Horcón (32°42'04"S, 71°28'45"W), al norte de Valparaíso, Chile. Se escogieron 250 ostiones de 49 a 92 mm de longitud de valva, que se utilizaron para estudios morfológicos, de fagocitosis y de citotoxicidad. Los ostiones se observaron bajo lupa y se clasificaron según el cuadro de retracción del manto (RM), tomando en cuenta las principales características morfológicas descritas en la introducción. Posteriormente, se estabilizaron en estanques de 40 L en agua de mar a 17°C por 24 h. Los ejemplares que no presentaron esta sintomatología constituyeron el grupo control.

Caracterización morfológica a nivel de microscopía de luz (ML) y electrónica de transmisión (MET) del manto en ejemplares con retracción

Del total de 250 ejemplares se seleccionaron 10 ostiones con RM y 10 ostiones control. De cada ejemplar se obtuvieron tres muestras de diferentes regiones del manto. Para ML el tejido fue fijado en Bouin, deshidratado en alcoholes de gradación creciente, embebidos en Histosec y cortados en un micrótom. Los cortes de 5 µm se tiñeron con hematoxilina-eosina y se analizaron con un microscopio, con equipo fotográfico.

Para MET, las muestras se fijaron en glutaraldehído al 3% en 0,1 M de tampón cacodilato de sodio (pH 7,4) conteniendo 0,1 M de sacarosa, por 3 h a temperatura ambiente. Las muestras fueron postfijadas en tetróxido de osmio al 1% en tampón cacodilato 0,1 M. Se tiñeron en bloque con acetato de uranilo, se deshidrataron en grados crecientes de alcohol y luego se incluyeron en Epon. Se obtuvieron cortes de 1 µm en un ultramicrotomo Reichert y se tiñeron con azul de toluidina al 1% como control. Los cortes ultrafinos se montaron en grillas de cobre y se tiñeron con acetato de uranilo. Los cortes seleccionados se observaron en un microscopio electrónico de transmisión Zeiss EM 900.

Número de hemocitos totales en la hemolinfa

El número de hemocitos se evaluó mensualmente entre mayo y septiembre, utilizando 30 individuos en cada estado. Desde el músculo aductor de cada individuo se obtuvo entre 1,0 y 1,5 mL de hemolinfa con una jeringa de 5 mL que contenía 0,5 mL de tampón Tris buffer salino (TBS). Se tomó una alícuota de 50 µL, se diluyó con tampón TBS y se contó en una cámara de Neubauer.

Capacidad fagocítica *in vitro* de los hemocitos frente a levaduras

La hemolinfa extraída del músculo aductor de cada grupo (20 individuos por estado) se centrifugó a 400 g por 15 min para separar los hemocitos del suero. Los hemocitos se lavaron dos veces con tampón TBS por centrifugación a 400 g por 15 min, y luego se utilizaron en los ensayos de fagocitosis. Como grupo control se utilizó la hemolinfa de ostiones que no presentaban el cuadro de retracción del manto.

Para los ensayos de fagocitosis se utilizó la levadura comercial *Saccharomyces cerevisiae* que fue previamente suspendida en tampón TBS y esterilizada a 120°C por 15 min. Se lavó dos veces el stock con tampón TBS por centrifugación y se contó el número de levaduras con una cámara de Neubauer.

Para detectar la capacidad opsonizadora del suero de ostiones con RM y SRM, una cantidad de levaduras ($5 \cdot 10^6$) se resuspendió en 1 mL de suero que se obtuvo recuperando el sobrenadante resultante de la centrifugación de la hemolinfa y se incubó durante 40 min a 20°C con el suero de esos ejemplares. Después se centrifugó a 10.000 g por 10 s, el sobrenadante se descartó y las levaduras opsonizadas se lavaron dos veces en TBS por centrifugación. Finalmente, como control suplementario, el suero en ambas condiciones fue sustituido por TBS.

Se prepararon monocapas de hemocitos sobre portaobjetos de vidrio, para esto una alícuota de 100 μ L de suspensión que contenía 40.000 hemocitos se dejó adherir durante 30 min en cámara húmeda a temperatura ambiente (20°C). A las monocapas se les agregó un volumen conteniendo una cantidad de levaduras que mantuviera la relación 10:1 (levaduras: hemocitos), la incubación se realizó durante 30 min, las levaduras no fagocitadas se removieron por un lavado con 100 μ L TBS. Las preparaciones se fijaron por 20 min con glutaraldehído al 2% en TBS conteniendo 1% de sacarosa. Se lavó dos veces con TBS para retirar el fijador y se tiñó con Giemsa por 10 min. Se lavó con alcohol, se secó la preparación al aire y se montó.

La fagocitosis se cuantificó con un microscopio de contraste de fase con aumento 400 x y se contaron 200 hemocitos por preparación. El resultado se expresó como porcentaje de hemocitos que fagocitaron las levaduras y cada experimento se realizó en triplicado.

Capacidad citotóxica de la hemolinfa

Para evaluar la citotoxicidad de los hemocitos se emplearon eritrocitos de rata, que se lavaron tres veces con tampón TBS y contaron en cámara de Neubauer para obtener una concentración final de $2 \cdot 10^6$ eritrocitos \cdot mL⁻¹ para efectuar los ensayos. Mientras que para evaluar la citotoxicidad del suero se utilizaron eritrocitos a una concentración de $3 \cdot 10^7$.

Una suspensión de 500.000 hemocitos \cdot mL⁻¹ en TBS provenientes de 20 individuos por estado, se mezcló con eritrocitos ($2 \cdot 10^6$), llevando la muestra a un volumen final de 800 μ L con el mismo tampón. Para evaluar la citotoxicidad del suero frente a $3 \cdot 10^7$ de eritrocitos, se utilizaron las proteínas totales de la hemolinfa a una concentración de 1 mg \cdot mL⁻¹ cuantificada por el método del ácido bicinonínico (Brown *et al.*, 1989), completando con TBS un volumen final de 800 μ L. Como control se utilizó la hemolinfa de ostiones que no presentaba la retracción del manto.

Las muestras se incubaron en agitación continua y moderada a 37°C por 1 h en baño térmico. Se detuvo la reacción agregando 2 mL de TBS frío que contenía 5 mM EDTA. Se centrifugó a 2.800 g por 5 min para precipitar los restos celulares y en los mismos tubos, la hemoglobina (Hb) liberada se determinó a 541 nm utilizando un espectrofotómetro Spectronic 21-D. El porcentaje de hemólisis se calculó de acuerdo a la fórmula propuesta por Parrinello *et al.* (1993):

$$\%Hb = \frac{\text{liberación de ensayo} - \text{liberación espontánea}}{\text{liberación máxima} - \text{liberación espontánea}}$$

La liberación máxima de hemoglobina se obtuvo preparando los eritrocitos en una suspensión de agua destilada. Para evaluar la liberación espontánea de Hb de los eritrocitos, se suspendieron en tampón TBS pH 8,0 e incubaron bajo las mismas condiciones experimentales.

La significancia de las diferencias entre los promedios de las mediciones de fagocitosis, citotoxicidad y número de hemocitos se determinaron por pruebas no paramétricas de comparación múltiple tipo Tukey (Zar, 1984).

RESULTADOS

En los animales con retracción del manto es posible observar, a nivel de microscopía de luz, una reacción inflamatoria multifocal en el epitelio cilíndrico

y en su tejido conjuntivo, consistente en una activa encapsulación que contiene en su interior cuerpos oscuros coalescentes que varían entre 10 y 65 μm . En la formación de la cápsula es característica la presencia de células alargadas con núcleo ovoide que participan activamente en la formación de capas concéntricas que rodean al conjunto de estos cuerpos (Fig. 1a). La observación de la reacción de encapsulación por medio de MET revela la presencia de cuerpos fusiformes (Figs. 1b y 1c), que en su interior contienen unas estructuras lamelares y otras semejantes a núcleo, y además, en el tejido afectado se distinguen células alargadas similares a miofibroblastos que rodean la cápsula (Fig. 1b). Las células que participan en la formación de capas concéntricas tienen un núcleo con forma elipsoidal,

que contiene dos tipos de cromatina, una electro-densa localizada preferentemente en la superficie interna de la envoltura nuclear y otra menos densa distribuida por todo el nucleoplasma. Estas células abarcan la región interna de la cápsula y están en contacto con un conjunto de estructuras celulares y subcelulares (Figs. 1b y 1c). Adicionalmente, por esta misma técnica se pudo observar una respuesta fagocítica de hemocitos tisulares, donde pseudópodos generados por la célula rodean un cuerpo electrodenso similar al de la cápsula (Fig. 2).

Al interior de los vasos hemolinfáticos se puede apreciar una reacción intensa de agregación, donde participan hemocitos circulantes que aíslan los cuerpos coalescentes (Fig. 3).

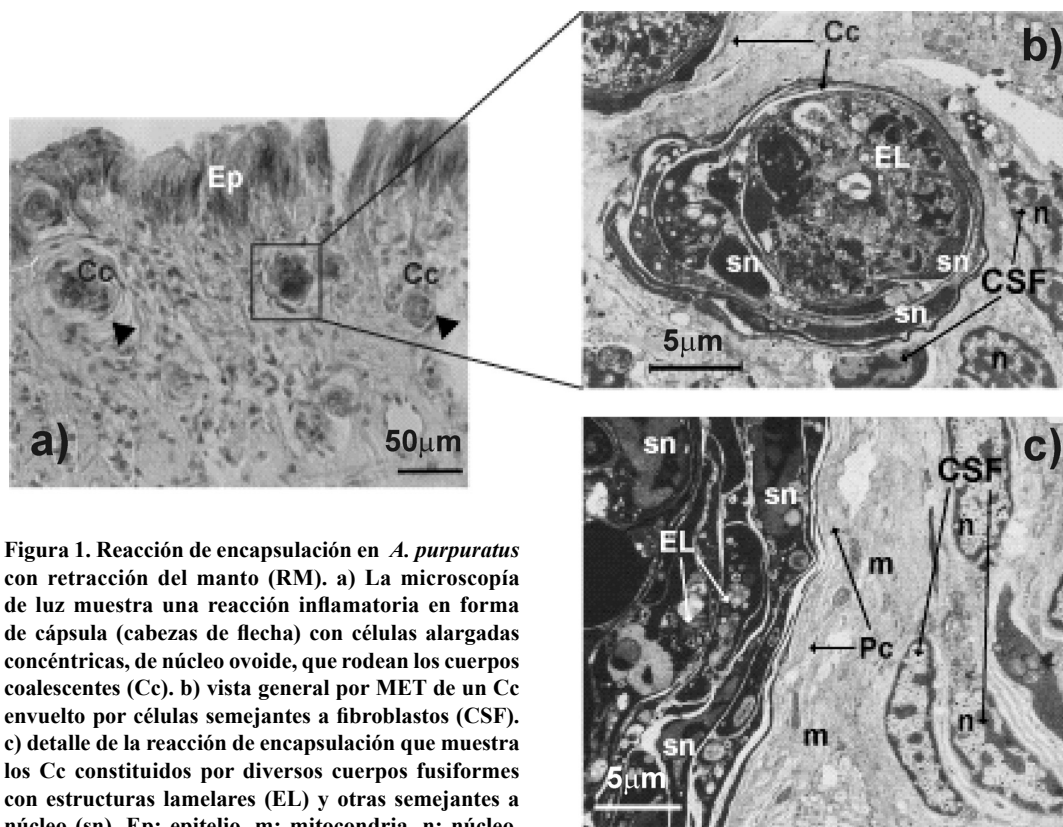


Figura 1. Reacción de encapsulación en *A. purpuratus* con retracción del manto (RM). a) La microscopía de luz muestra una reacción inflamatoria en forma de cápsula (cabezas de flecha) con células alargadas concéntricas, de núcleo ovoide, que rodean los cuerpos coalescentes (Cc). b) vista general por MET de un Cc envuelto por células semejantes a fibroblastos (CSF). c) detalle de la reacción de encapsulación que muestra los Cc constituidos por diversos cuerpos fusiformes con estructuras lamelares (EL) y otras semejantes a núcleo (sn). Ep: epitelio, m: mitocondria, n: núcleo, Pc: pared cápsula.

Figure 1. Encapsulation reaction in mantle from *A. purpuratus* with mantle retraction (RM). a) Light microscopy shows inflammatory reaction formed by a capsule (arrow head) with large concentric cell layers, with ovoid nucleus surrounding the coalescent bodies (Cc). b) general view by MET from Cc wrapped by fibroblast-like cells (CSF) that participate in the capsule formation. c) magnified view of encapsulation reaction that shows the Cc formed by fusiform bodies with lamellar structures and others nucleus-like. Ep: epithelia, m: mitochondria, n: nucleus, Pc: capsule wall.

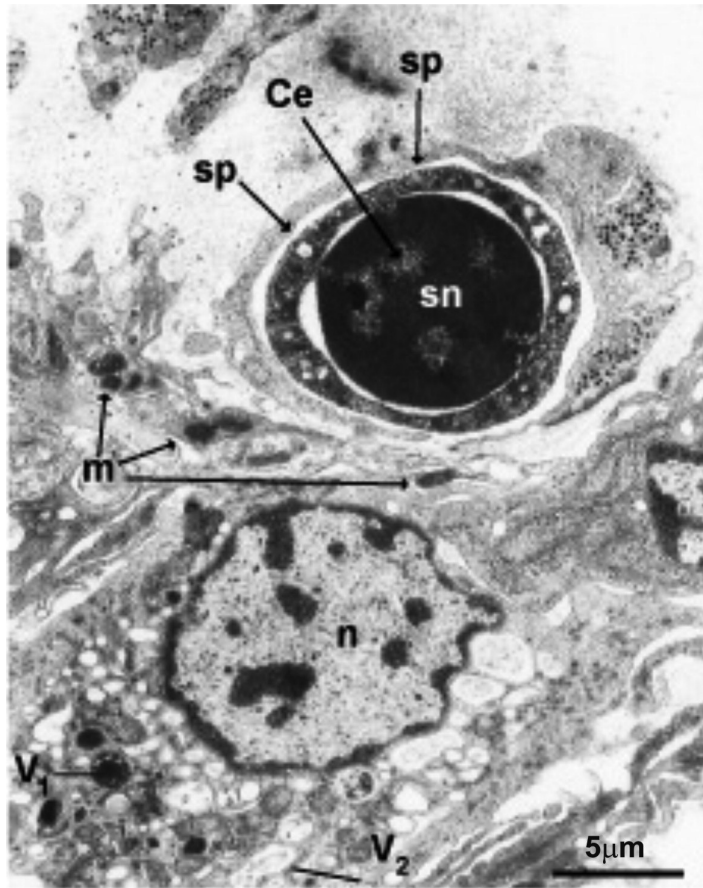


Figura 2. Por MET se observa un hemocito granular fagocitando un cuerpo electrodenso (Ce) muy similar en constitución a los que forman los cistos. En este proceso de fagocitosis se observan pseudópodos (sp) que han sido generados por el hemocito. Éste presenta dos tipos de vesículas: unas con material electrodenso (V_1) y otras de menor electrodensidad (V_2). Se observan varias mitocondrias (m) preferentemente ubicadas en los pseudopodios, n: núcleo.

Figure 2. Transmission electron microscopy of granular hemocytes phagocytosing a dense body (Ce) that is similar to a cyst. In this process the hemocytes produce the pseudopodia. Different types of vesicles are present in the cytoplasm of the hemocyte. Vesicles with large electron-dense materials (V_1) and few electron-dense materials (V_2). Several mitochondria (m) are observed, located in the pseudopodia, n: nucleus.

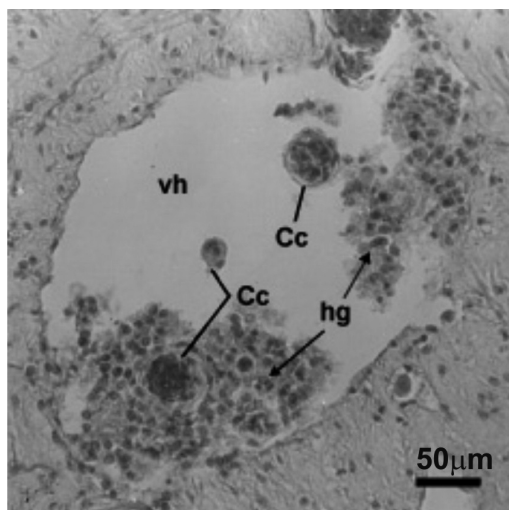


Figura 3. Reacción de encapsulación en los vasos hemolinfáticos de *A. purpuratus*. Hemocitos circulantes se agregan rodeando los cuerpos coalescentes en el interior del vaso. Vh: vaso hemolinfático, hg: hemocitos granulares, Cc: cuerpos coalescentes.

Figure 3. Reaction of encapsulation in the hemolymph vessel of *A. purpuratus*. Circulating hemocytes forming aggregate surrounding the coalescent bodies inside the vessel. Vh: hemolymph vessel, hg: granular hemocytes, Cc: coalescent bodies.

Al comparar el número de hemocitos circulantes en la hemolinfa de los ostiones con RM y SRM, se destacó que el número de hemocitos en los ostiones con RM fue siempre significativamente menor ($p < 0,05$), de este modo la condición de retracción del manto estaría asociada a la disminución del número de hemocitos. El factor mes influyó en la variación del número de hemocitos en ambos casos. En los ostiones con RM y en el control, el valor menor correspondió a junio con 995.550 y $2.014.280$ hemocitos·mL⁻¹ respectivamente, mientras que en agosto se observó un aumento del número de hemocitos circulantes, en ambos grupos con un promedio de $3.423.330$ y $4.513.330$ hemocitos·mL⁻¹ respectivamente (Fig. 4).

La capacidad fagocítica de los hemocitos de individuos con RM y SRM frente a levaduras incubadas con TBS (sin opsonizar) no presentó diferencias significativas, siendo el porcentaje de fagocitosis ($8,3 \pm 3,4\%$) y ($3,4 \pm 0,8\%$) respectivamente (Fig. 5a). Cuando las levaduras se incubaron con el suero de ejemplares SRM, aumentó significativamente ($p < 0,05$) el valor de la capacidad fagocítica de los hemocitos extraídos de ambos grupos. Esto demuestra el efecto opsonizador de moléculas del suero provenientes de individuos SRM ($27,0 \pm 3,5\%$) respecto de los individuos con RM ($24,1 \pm 2,8\%$) (Fig. 5b). Cuando las levadu-

ras se incubaron con suero de ostiones con RM, en ambos grupos se observó una disminución significativa ($p < 0,05$) de la fagocitosis (Fig. 5c).

Los hemocitos del grupo control y del grupo con RM tienen capacidad hemolítica sobre eritrocitos de rata (Fig. 6). En promedio, los hemocitos de los ostiones control provocaron un ($38,01 \pm 8,7\%$) de hemólisis, mientras que en los ostiones con RM el porcentaje fue de ($41,44 \pm 10,6\%$) no observándose diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$). Al evaluar la capacidad hemolítica del suero se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos. En los ostiones con RM la actividad hemolítica del plasma fue significativamente mayor ($50,76 \pm 12,6\%$) que en los ostiones control ($22,64 \pm 12,5\%$) (Fig. 6).

DISCUSIÓN

Las observaciones realizadas por microscopía de luz y electrónica en el tejido del manto de ejemplares de *A. purpuratus*, provenientes de Horcón, que presentaron el cuadro denominado retracción del manto, revelaron una notoria respuesta de encapsulación que muestra un patrón similar al de ejemplares provenientes de la bahía de Tongoy, tanto de cultivos como de poblaciones naturales (Lohrmann *et al.*,

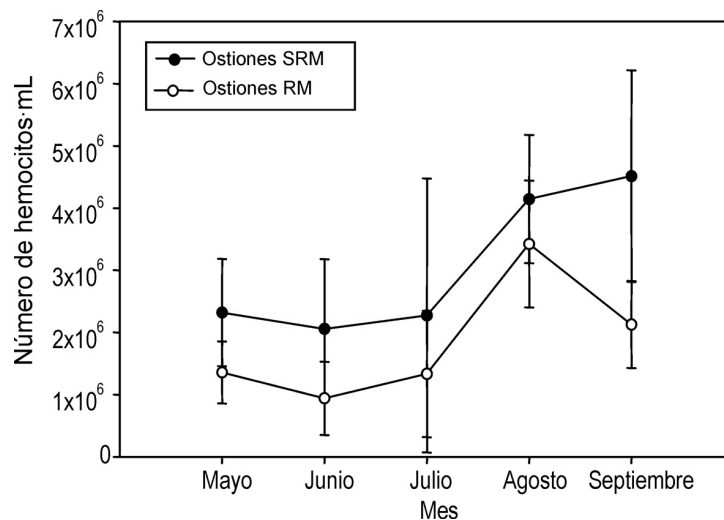


Figura 4. Variación del número de hemocitos en *A. purpuratus* en ejemplares con RM y SRM. Los ejemplares con RM tuvieron menor número de hemocitos circulantes ($p < 0,05$) durante todo el tiempo del muestreo.

Figure 4. Monthly variation of *A. purpuratus* hemocytes, from RM and SRM scallops. The scallops with RM showed decreased of numbers of circulating hemocytes ($p < 0.05$) at all sampling times.

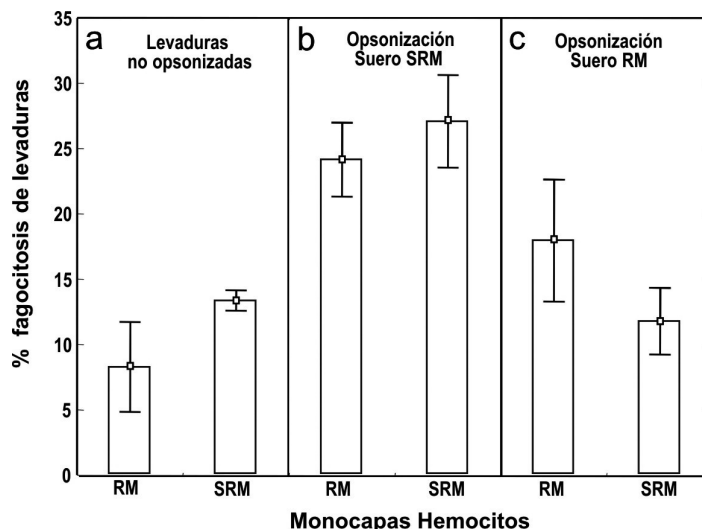


Figura 5. Efecto de la opsonización de levaduras sobre el porcentaje de fagocitosis de hemocitos. a) Levaduras control preincubadas en TBS, b) preincubadas con el suero de ostiones SRM, c) preincubadas con el suero de ostiones RM. El suero de los ejemplares con RM tiene un menor efecto sobre la capacidad fagocítica de los hemocitos de individuos con RM y SRM.

Figure 5. Effect of opsonization of yeasts on phagocytic capacity in hemocytes. a) Control yeast preincubated in TBS, b) yeast preincubated with plasma from SRM scallops, c) yeast preincubated with plasma from RM scallops. The plasma of RM scallops has a minor effect on phagocytic capacity compared with the hemocytes of RM and SRM scallops.

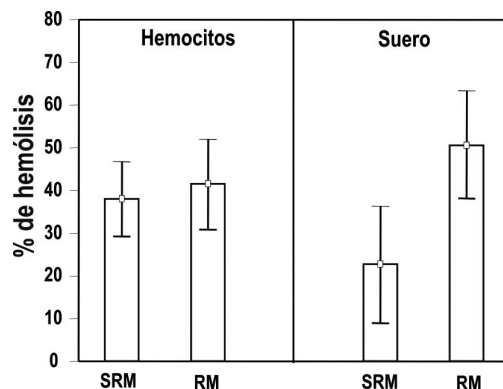


Figura 6. Citotoxicidad *in vitro* de los hemocitos y el suero de *A. purpuratus* contra eritrocitos de rata. La citotoxicidad de los hemocitos de ejemplares con RM y SRM no presenta diferencias significativas ($p < 0.05$), por el contrario está aumentada significativamente en el suero de ostiones con RM ($p < 0.05$).

Figure 6. In vitro cytotoxicity of the hemocytes and the plasma of *A. purpuratus* against rat erythrocytes. The cytotoxicity of hemocytes with RM and SRM does not present significant differences ($p < 0.05$). However, the cytotoxic capacity was enhanced in the serum of scallops with RM ($p < 0.05$).

2002), que ha sido descrito como granulomas, sin especificar la naturaleza del agente causante. En *A. irradians* colectados en Canadá, afectados por el protozoo *Perkinsus karlssoni* se ha observado cuerpos oscuros coalescentes distribuidos en diferentes tejidos (Whyte *et al.*, 1993, 1994). Sin embargo, el conjunto de estructuras celulares y subcelulares observadas a nivel de MET no permite clarificar la taxonomía del agente asociado a esta reacción, lo que se podría explicar por la degradación celular del parásito, producto de la respuesta inmunitaria observada en el manto. Esta idea está respaldada por Goggin *et al.* (1996) que han considerado que los resultados obtenidos por Whyte *et al.* (1994), no son consistentes para considerar este agente como una especie de *Perkinsus*, lo que sustenta la dificultad para determinar de manera precisa la clasificación de organismos incorporados en estructuras capsulares. En general, los moluscos bivalvos generan un mecanismo celular de encapsulación, frente a un cuerpo extraño cuyo tamaño excede la posibilidad de ser fagocitado. En las almejas *Ruditapes decussatus* y *Tapes semidecussatus* se ha descrito encapsulación frente al protozoo *Perkinsus* sp. (Montes *et al.*, 1995, 1997; Villalba *et al.*, 2004) y en el metacés-

todo *Tylocephalum* sp. que parasita a *Crassostrea virginica*. En esta respuesta se ha descrito la formación de varias capas concéntricas, constituidas por fibras secretadas por los hemocitos (Feng, 1988) y la participación de células semejantes a fibroblastos del tejido conjuntivo. En el caso de *A. purpuratus* ocurre una respuesta equivalente porque existe una encapsulación de tipo celular, donde células presentes en el tejido conjuntivo del manto, probablemente fibroblastos, participan en la encapsulación. No se puede confirmar la existencia de fibras secretadas por hemocitos como ocurre en la ostra, sin embargo cuando se observan los cuerpos coalescentes circulando en los vasos hemolinfáticos, es notoria la participación de hemocitos que podrían migrar al tejido y modificar su morfología como lo señalan Montes *et al.* (1995) en otro molusco bivalvo.

El número de hemocitos circulantes ha sido utilizado para evaluar el efecto de ciertos parásitos sobre la condición fisiológica de los moluscos (Robledo *et al.*, 1995; Carballal *et al.*, 1998; Allam *et al.*, 2001; Cochenne-Laureau *et al.*, 2003). La disminución en el número de hemocitos circulantes que se observan en los ostiones con RM, responde al patrón determinado para otros moluscos parasitados (Fryer & Bayne, 1990; Noda & Sato, 1990; Ford *et al.*, 1993), lo que se explicaría por su infiltración a los tejidos y/o a su agregación en la hemolinfa.

Los ensayos de fagocitosis *in vitro* se han utilizado para evaluar la respuesta celular inmunitaria. Particularmente, en moluscos bivalvos se ha estudiado la fagocitosis en los hemocitos de la almeja *Tapes philippinarum* frente al género *Perkinsus* (Villalba *et al.* 2004), en los gastrópodos *Biomphalaria glabrata* (Fryer & Bayne, 1996; Matricón-Gondran & Letocart, 1999) y en *Lymnaea stagnalis* (Amen *et al.*, 1992; Zelck *et al.*, 2005), estos dos últimos se utilizan como modelos para estudiar la relación huésped-parásito. Los hemocitos de *A. purpuratus* tienen una capacidad fagocítica basal de 13,3% (González & Arenas, 2002), lo que se repite en otras especies de invertebrados con rangos que varían entre 11 y 28% (Fryer & Bayne, 1989; Kelly *et al.*, 1993; Ballarini *et al.*, 1994; Blanco *et al.*, 1995). En este trabajo se ha demostrado que no existe diferencia significativa entre la capacidad fagocítica de los hemocitos circulantes de ostiones con RM respecto a los controles, lo que indica que estas células no se ven afectadas en esta función respecto a la presencia o ausencia del cuadro descrito. El porcentaje de fagocitosis aumentó significativamente en ambos

grupos cuando las levaduras se incubaron con suero de ejemplares SRM; al contrario, disminuyó significativamente con el suero de ostiones con RM, lo que indicaría que el suero de estos ejemplares carecería o tendría bajas concentraciones de moléculas con capacidad opsonizadora que facilitan la fagocitosis. Resultados similares han sido reportados en el caracol *Biomphalaria glabrata* parasitado con *Schistosoma mansoni*, frente a levaduras opsonizadas y no opsonizadas (Fryer & Bayne, 1989). Estas moléculas podrían corresponder a proteínas que se asocian a lipopolisacáridos y beta-glucanos como las descritas para los pectínidos *Chlamys farrieri* y *Argopecten irradians* (Su *et al.*, 2004; Ni *et al.*, 2007).

Otros parámetros utilizados para indicar el efecto de parásitos sobre el huésped, son las reacciones de citotoxicidad, que han sido reportadas en numerosas especies de invertebrados (Roch, 1999). Estas reacciones citotóxicas pueden estar mediadas por células de la hemolinfa o por factores hemolíticos del suero. Uno de los modelos experimentales más utilizados para medir la citotoxicidad de hemocitos o del suero, es la cuantificación de la hemoglobina liberada por eritrocitos de vertebrados (Parrinello *et al.*, 1995). La actividad citotóxica basal ha sido determinada en el suero y en los hemocitos de *A. purpuratus* (González & Arenas, 2002), en el caso del suero de ostiones con RM se demostró que poseen una mayor capacidad de hemólisis, lo que sugiere que en el suero existe una mayor variedad o mayor concentración de moléculas biológicamente activas que podrían ser equivalentes a las presentes en otros invertebrados. Esto indicaría que familias de moléculas han sido altamente conservadas en la evolución del sistema inmune de estos organismos (Wonaka & Yoshizaki, 2004). Actualmente, estamos realizando trabajos que incorporan técnicas bioquímicas y moleculares para una caracterización más detallada del sistema inmune de moluscos bivalvos nativos.

Finalmente, se puede señalar que los resultados obtenidos contribuyen al conocimiento de la respuesta inmune del ostión del norte, frente a un cuadro patológico de retracción del manto que se presenta habitualmente en centros de cultivo chilenos. La caracterización taxonómica del parásito sería útil para adoptar las estrategias que mitiguen las consecuencias epizooticas del patógeno en la industria ostionera.

AGRADECIMIENTOS

A la Dirección de Investigación de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso (PUCV) y a la Profesora Mariel Campalans de la Escuela de Ciencias del Mar (PUCV) por su colaboración en la obtención y procesamiento de las muestras para microscopía electrónica.

REFERENCIAS

- Allam, B., K.A. Ashton-Alcox & S.E. Ford. 2001. Haemocyte parameters associated with resistance to brown ring disease in *Ruditapes* spp. clams. *Dev. Comp. Immunol.*, 25: 365-375.
- Amen, R.I., J.M. Baggen, P.D. Bezemer & M. de Jong-Brink. 1992. Modulation of the activity of the internal defense system of the pond snail *Lymnaea stagnalis* by the avian schistosome *Trichobilharzia ocellata*. *Parasitology*, 104: 33-40.
- Bachère, E., Y. Gueguen, M. Gonzalez, J. de Lorge-ril, J. Garnier & B. Romestand. 2004. Insights into the anti-microbial defense of marine invertebrates: the penaeid shrimps and the oyster *Crassostrea gigas*. *Immunol. Rev.*, 198: 149-168.
- Bayne, C.J. 1990. Phagocytosis and non-self recognition in invertebrates. Phagocytosis appears to be an ancient line of defence. *Bioscience*, 40: 723-731.
- Bayne, C.J., U.K. Hahn & R.C. Bender. 2001. Mechanisms of molluscan host resistance and of parasite strategies for survival. *Parasitology*, 123(7): 159-167.
- Ballarin, L., F. Cima & A. Sabbadin. 1994. Phagocytosis in the colonial ascidian *Botryllus schlosseri*. *Develop. Comp. Immunol.*, 18(6): 467-481.
- Blanco, G., E. Alvarez, A. Amor & S. Hajos. 1995. Phagocytosis of yeast by coelomocytes of the sipunculan worm *Themistes petricola*: opsonization by plasma components. *J. Invertebr. Pathol.*, 66: 39-45.
- Brown, R., K. Jarving & K. Hylan. 1989. Protein measurement using bicinchoninic acid: elimination of interfering substances. *Anal. Biochem.*, 180: 136-139.
- Campalans, M., P. Rojas, J. Sepúlveda, J. Pascual, I. Guerrero, C. Riquelme & R. Castro. 1997. Desarrollo de un programa de detección y tratamiento de enfermedades en moluscos cultivados de Chile. *Estud. Doc., Univ. Católica Valparaíso*, 22: 250 pp.
- Carballal, M.J., A. Villalba & C. López. 1998. Seasonal variation and effects of age, food availability, size, gonadal development, and parasitism on hemogram of *Mytilus galloprovincialis*. *J. Invertebr. Pathol.*, 72(3): 304-312.
- Cheng, T.C. 1996. Hemocytes: forms and functions. En: V.S. Kennedy, R.I.E. Newell & A.F. Eble (eds.). *The eastern oyster*. College Park, Md: Maryland Sea Grant College, University of Maryland System, pp. 299-333.
- Cochennec-Laureau, N., M. Auffret, T. Renault & A. Langlade. 2003. Changes in circulating and tissue-infiltrating hemocyte parameters of European flat oysters, *Ostrea edulis*, naturally infected with *Bonamia ostreae*. *J. Invertebr. Pathol.*, 83: 23-30.
- Feng, S.Y. 1988. Cellular defense mechanisms of oysters and mussels. En: W.S. Fischer (ed.). *Disease processes in marine bivalve molluscs*. Am. Fish. Soc. Special Pub., 18: 74-92.
- Ford, S.E., S.A. Kanaley & D.T. Littlewood. 1993. Cellular response of oysters infected with *Haplosporidium nelsoni*: changes in circulating and tissue-infiltrating hemocytes. *J. Invertebr. Pathol.*, 61(1): 49-57.
- Fryer, S.E. & C.J. Bayne. 1989. Opsonization of yeast by the plasma of *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda): a strain-specific, time-dependent process. *Parasite Immunol.*, 11: 269-278.
- Fryer, S.E. & C.J. Bayne. 1990. *Schistosoma mansoni* modulation of phagocytosis in *Biomphalaria glabrata*. *J. Parasitol.*, 76(1): 45-52.
- Fryer, S.E. & C.J. Bayne. 1996. Phagocytosis of latex beads by *Biomphalaria glabrata* hemocytes is modulated in a strain-specific manner by adsorbed plasma components. *Develop. Comp. Immunol.*, 20: 23-37.
- Goggin, C.L., S.E. McGladdery, S.K. Whyte & R.J. Cawthorn. 1996. An assessment of lesions in bay scallops *Argopecten irradians* attributed to *Perkinsus karlssoni* (Protozoa, Apicomplexa). *Dis. Aquat. Org.*, 24: 77-80.
- González, M. & G. Arenas. 2002. Caracterización de la respuesta inmune en el ostión del norte *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819) (Mollusca: Bivalvia). *Cien. Mar.*, 28(3): 247-255.
- Kelly, K.L., E.L. Cooper & D.A. Raftos. 1993. A humoral opsonin from the solitary urochordate *Styela clava*. *Develop. Comp. Immunol.*, 17: 29-39.
- Lambert, C. & J.L. Nicolas. 1998. Specific inhibition of chemiluminescent activity by pathogenic vibrios in hemocytes of two marine bivalves: *Pecten maximus* and *Crassostrea gigas*. *J. Invertebr. Pathol.*, 71(1): 53-63.

- Lambert, C., P. Soudant, G. Choquet & C. Paillard. 2003.** Measurement of *Crassostrea gigas* hemocyte oxidative metabolism by flow cytometry and the inhibiting capacity of pathogenic vibrios. *Fish. Shellfish Immunol.*, 15: 225-240.
- Lohrmann, K., A. Brand & S. Feist. 2002.** Comparison of the parasites and pathogens present in a cultivated and in a wild population of scallops (*Argopecten purpuratus* Lamarck, 1819) in Tongoy Bay, Chile. *J. Shellfish Res.*, 21(2): 557-561.
- Matricón-Gondran, M. & M. Letocart. 1999.** Internal defenses of the snail *Biomphalaria glabrata*: II. Defense cells have different phagocytic responses to various injected foreign materials. *J. Invertebr. Pathol.*, 74: 235-247.
- Montes, J.F., M. Durfort & J. García-Valero. 1995.** Cellular defence mechanism of the clam *Tapes semidecussatus* against infection by the protozoan *Perkinsus* sp. *Cell Tissue Res.*, 279: 529-538.
- Montes, J.F., J.A. del Rio, M. Durfort & J. García-Valero. 1997.** The protozoan parasite *Perkinsus atlanticus* elicits a unique defensive response in the clam *Tapes semidecussatus*. *Parasitology*, 114: 339-349.
- Nappi, A.J. & E. Ottaviani. 2000.** Cytotoxicity and cytotoxic molecules in invertebrates. *Bioessays*, 22(5): 469-480.
- Ni, D., L. Song, L. Wu, Y. Chang, Y. Yu, L. Qiu & L. Wang. 2006.** Molecular cloning and mRNA expression of peptidoglycan recognition protein (PGRP) gene in bay scallop (*Argopecten irradians*, Lamarck 1819). *Develop. Comp. Immunol.* 31(6): 548-558.
- Noda, S. & E.S. Loker. 1989.** Effects of infection with *Echinostoma paraensei* on the circulating haemocyte population of the host snail *Biomphalaria glabrata*. *Parasitology*, 98: 35-41.
- Noda, S. & A. Sato. 1990.** Effects of infection with *Angiostrongylus cantonensis* on the circulating haemocyte population and the haematopoietic organ of the host snail M-line *Biomphalaria glabrata*. *J. Helminthol.*, 64(3): 239-247.
- Parrinello, N., V. Arizza, M. Cammarata & D. Parrinello. 1993.** Cytotoxic activity of *Ciona intestinalis* (Tunicata) hemocytes: properties of the *in vitro* reaction against erythrocytes targets. *Develop. Comp. Immunol.*, 17: 19-27.
- Parrinello, N., M. Cammarata, L. Lipari & V. Arizza. 1995.** Sphingomyelin inhibition of *Ciona intestinalis* (Tunicata) cytotoxic hemocytes assayed against sheep erythrocytes. *Develop. Comp. Immunol.*, 19: 31-41.
- Roch, P. 1999.** Defense mechanisms and disease prevention in farmed marine invertebrates. *Aquaculture*, 172: 125-145.
- Robledo, J.A.F., M.M. Santarém, P. González & A. Figueras. 1995.** Seasonal variations in the biochemical composition of the serum of *Mytilus galloprovincialis* Lmk. and its relationship to the reproductive cycle and parasitic load. *Aquaculture*, 133: 311-322.
- Smolowitz, R., D. Leavitt & F. Perkins. 1998.** Observations of a protistan disease similar to QPX in *Mercenaria mercenaria* (Hard Clams) from the coast of Massachusetts. *J. Invertebr Pathol.*, 71: 9-25.
- Su, J., L. Song, W. Xu, L. Wu, H. Li & J. Xiang. 2004.** cDNA cloning and mRNA expression of the lipopolysaccharide- and beta-1,3-glucan-binding protein gene from scallop *Chlamys farreri*. *Aquaculture*, 239: 69-80.
- White, S.K., R.J. Cawthorn, R.J. MacMillan & B. Despres. 1993.** Isolation and purification of developmental stages of *Perkinsus karlssoni* (Apicomplexa: Perkinsea), a parasite affecting bay scallops *Argopecten irradians*. *Dis. Aquat. Org.*, 15: 199-205.
- White, S.K., R. Cawthorn & S.E. McGladdery. 1994.** Co-infection of bay scallops *Argopecten irradians* with *Perkinsus karlssoni* (Apicomplexa, Perkinsea) and an unidentified coccidian parasite. *Dis. Aquat. Org.*, 18: 53-62.
- Wonaka, M. & F. Yoshizaki. 2004.** Primitive complement system of invertebrates. *Immunol. Rev.*, 198: 203-215.
- Villalba, A., K.S. Reece, M.C. Ordás, S.M. Casas & A. Figueras. 2004.** Perkinsosis in molluscs: a review. *Aquat. Living Resour.*, 17: 411-432.
- Zar, J.H. 1984.** Biostatistical analysis. Prentice-Hall, New Jersey, 718 pp.
- Zelck, U.E., B. Janje & O. Schneider. 2005.** Superoxide dismutase expression and H₂O₂ production by hemocytes of the trematode intermediate host *Lymnaea stagnalis* (Gastropoda). *Develop. Comp. Immunol.*, 29: 305-314.