

**CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS DEL NOROESTE, S. C.**

**PROGRAMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**SUSCEPTIBILIDAD A *Vibrio alginolyticus* Y MECANISMOS DE DEFENSA DE  
MOLUSCOS BIVALVOS**

**T E S I S**

Que para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

**Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales  
(Orientación en Acuicultura)**

**P r e s e n t a**

**Antonio Luna González**

**La Paz, Baja California Sur. Febrero del 2003**

**Esta tesis fue dirigida por:**

Dr. Alfonso N. Maeda Martínez

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste

**Comité tutorial:**

Dr. Alfonso N. Maeda Martínez

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste

Dra. Elisabeth Dyrynda

School of Biological Sciences, University of Wales.

Swansea, United Kingdom

Dr. José Luis Ochoa Ochoa

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste

Dr. Felipe Ascencio Valle

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste

Dr. Francisco Vargas Albores

Centro de Investigación en Alimentación y  
Desarrollo

**Comité revisor:**

Dr. Alfonso N. Maeda Martínez

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste

Dra. Norma Y. Hernández Saavedra

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste

Dra. Ma. Antonia Guzmán Murillo

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste

Dr. Felipe Ascencio Valle

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste

Dr. Francisco Vargas Albores

Centro de Investigación en Alimentación y  
Desarrollo

**Comité de sinodales:**

Dr. Alfonso N. Maeda Martínez

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste

Dra. Norma Y. Hernández Saavedra

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste

Dra. Ma. Antonia Guzmán Murillo

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste

Dr. Felipe Ascencio Valle

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste

Dr. Francisco Vargas Albores

Centro de Investigación en Alimentación y  
Desarrollo

## RESUMEN

Los moluscos bivalvos son una fuente importante de alimento y de recursos económicos en México. A pesar de que esta industria es pequeña comparada con la de otros países, tiene un futuro prometedor gracias a un gran número de especies de importancia comercial y a la abundancia de zonas de posible cultivo. Sin embargo, el cultivo de estos organismos marinos no está exento de problemas ya que como ocurre con el camarón y los peces, existen problemas causados por microorganismos, principalmente en los estadios larvarios, que limitan esta actividad. Además, existe poco conocimiento sobre los mecanismos de infección de los microorganismos patógenos y los mecanismos de defensa de los moluscos bivalvos, especialmente en los estadios tempranos de su desarrollo. El estudio del sistema inmune requiere ser abordado de manera consistente, para entender las diferencias en la susceptibilidad que existen entre larvas, juveniles y adultos.

En el presente trabajo se estudió la susceptibilidad de larvas al ataque de *Vibrio alginolyticus* cepa APSA2 y los mecanismos de defensa fenoloxidasa, péptidos antimicrobianos y enzimas hidrolíticas en la ostra japonesa *Crassostrea gigas*, los pectínidos *Argopecten ventricosus* y *Nodipecten subnodosus* y el callo de hacha *Atrina maura*.

La susceptibilidad de larvas de estas especies fue investigada retando larvas de 7 días de edad con diferentes concentraciones de *V. alginolyticus*. Todas las especies fueron susceptibles al ataque del vibrio pero la mayor supervivencia se obtuvo en la ostra japonesa. Los signos de la enfermedad fueron similares a los de la vibriosis descrita en trabajos previos.

La actividad de la enzima fenoloxidasa (FO) fue estudiada en homogenizados de larvas y juveniles, y en el plasma y hemocitos de adultos de las cuatro especies. La actividad de la FO no fue detectada en homogenizados de las larvas, pero fue encontrada en el homogenizado de juveniles de *C. gigas* y *N. subnodosus* solamente, y en plasma y lisado de hemocitos en todas las especies estudiadas. La enzima encontrada en las dos especies de juveniles no pudo ser activada con los activadores probados, pero fue incrementada significativamente en el plasma de las cuatro especies y en el lisado de hemocitos de *N. subnodosus*. La activación del sistema proFO por la laminarina fue suprimida en un máximo de 57 % por un cóctel de inhibidores de proteasas en el plasma y lisado de hemocitos de todas las especies. Este trabajo demuestra la activación de la proFO en adultos en respuesta a componentes microbianos.

Se determinó la presencia de péptidos antimicrobianos en la hemolinfa de adultos de *A. ventricosus*, empleando cromatografía de fase reversa y columnas con matriz C18. La capacidad antibacteriana de las fracciones del primer paso de purificación fue probada con un ensayo de lisis en placa con las bacterias *V. alginolyticus* APSA2 y APSA4, *V. alginolyticus* 138-2, *V. parahaemolyticus*, *V. campbelli*, *Escherichia coli* XL1 Blue y *Micrococcus luteus*. De ellas, se seleccionó *V. alginolyticus* 138-2 por su sensibilidad (mayor diámetro del halo de inhibición) para los siguientes pasos de purificación. Los resultados indican que la hemolinfa de *A. ventricosus* contiene por lo menos 5 fracciones

con actividad antibacteriana. Una de las fracciones se purificó en 4 pasos y se corroboró su pureza con electroforesis en gel de acrilamida. Se obtuvieron dos bandas con un peso molecular de 3.5 y 3.6 kDa.

La actividad de enzimas hidrolíticas (proteasas, glucosidasas, fosfatasas lipasas y esterases) fue estudiada en el lisado de ovocitos, en homogenizado de larvas y juveniles, y en la hemolinfa de *C. gigas*. La presencia de las enzimas fue demostrada por técnicas colorimétricas (API ZYM) y de lisis en placa. Se detectó actividad enzimática en todas las muestras, pero hubo gran variación en su número y nivel de actividad. La actividad enzimática se incrementa significativamente con la edad. Este análisis demuestra que las muestras de ovocitos, larvas, juveniles y adultos de *C. gigas* tienen actividad hidrolítica en 20 substratos diferentes. Los resultados del presente trabajo constituyen una contribución al conocimiento de los mecanismos de defensa en moluscos bivalvos a diferentes estadios de desarrollo. Se ha demostrado existen larvas de bivalvos más susceptibles que otras al ataque de bacterias patógenas y que ocurre un proceso de “maduración” del sistema inmune conforme avanza el desarrollo.

**Palabras clave:** Bivalvos, larvas, susceptibilidad, fenoloxidasa, péptidos antimicrobianos, enzimas lisosomales.

## ABSTRACT

The susceptibility of larvae of *Crassostrea gigas*, *Argopecten ventricosus*, *Nodipecten subnodosus*, and *Atrina maura* to *Vibrio alginolyticus* strain APSA2 was investigated by challenging 7 d old veliger larvae with different bacterial concentrations. Larvae of all species were susceptible to vibrio. However, the highest larval survival was obtained in the Japanese oyster. Signs of the disease were similar to vibriosis described in a previous work. Phenoloxidase (PO) activity was studied in larval and juvenile homogenates and in the plasma and hemocytes of adults of the four species. PO activity was not detected in larval homogenates but it was present in homogenates of *C. gigas* and *N. subnodosus* juveniles. PO activity was present in plasma of all adult species and the activity was enhanced by elicitors in the plasma of all species but only in haemocyte lysate supernatant (HLS) of the scallop *N. subnodosus*. Activation of proPO by laminarin was suppressed up to 57% by a protease inhibitor cocktail in plasma and HLS of all species tested.

The presence of antimicrobial peptides was determined in hemolymph of adult *A. ventricosus*. The fractions of the first step of purification process (by reverse phase chromatography) were tested to detect antibacterial activity in *V. alginolyticus* APSA2 and APSA4, *V. alginolyticus* 138-2, *V. parahaemolyticus*, *V. campbelli*, *Escherichia coli* XL1 Blue, and *Micrococcus luteus*. The more sensitive bacterium (*V. alginolyticus* 138-2) was selected as a test organism against the fractions obtained in the purification process. Results of step two show that the hemolymph of *A. ventricosus* contains 5 fractions with antibacterial activity. Fraction two of step two was utilized to continue the purification process. At the final step, the purity of the fraction with antibacterial activity was ascertained using SDS-PAGE. Two bands of 3.5 and 3.6 kDa were obtained.

The activity of hydrolytic enzymes (proteases, glycosidases, phosphatases, and esterases) was studied in oocyte lysate, larval and juvenile homogenates and in adult haemolymph of *C. gigas*. The presence of enzymes was demonstrated by colorimetric (API ZYM Kit) and lysoplate assay techniques. Enzymatic activity was detected in all samples, but there were great variations in number and levels of activity. Enzymatic activity increases significantly with age. This work showed that samples of oocytes, larvae, juveniles and adults of *C. gigas* had hydrolytic activity in 20 different substrates. Results obtained in the present work are an important contribution to the knowledge of defense mechanisms in bivalve mollusks at different developmental stages. It has been demonstrated that there are differences in susceptibility to pathogens between larvae of bivalve species and a process of maturing on the immune system.

**Key words:** Bivalves, larvae, susceptibility, phenoloxidase, antimicrobial peptides, lysosomal, enzymes.

A mi mamá Amalia González Ceballos

A mis hermanos

A mis sobrinos

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a mi director de tesis, Dr. Alfonso Maeda por su orientación y apoyo.

A mis co-tutores, Dres. José Luis Ochoa, Felipe Ascencio y Francisco Vargas-Albores por su ayuda y consejos. Particularmente agradezco a los Dres. Ascencio y Vargas-Albores por recibirme en sus laboratorios de Patogénesis Microbiana del CIBNOR y de Biotecnología Marina del CIAD-Hermosillo respectivamente, en donde realicé gran parte de los análisis de la presente tesis.

A la Dra. Norma Hernández por su contribución como revisora de la tesis.

Agradezco al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C. (CIBNOR) por haberme brindado todo el apoyo para la realización del presente trabajo de investigación, a través del proyecto interno PAC-5. Gracias también al Programa de Postgrado del CIBNOR por apoyarme con una beca terminal durante 11 meses.

Agradezco al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. de Hermosillo Sonora por la ayuda otorgada durante mis estancias doctorales en el Laboratorio de Biotecnología Marina.

Mi agradecimiento al CONACYT por brindarme una beca doctoral durante tres años y medio, y por el financiamiento otorgado a través del proyecto G-33593-B.

Agradezco a Miguel Robles, responsable del Laboratorio de Reproducción de Especies Marinas del CIBNOR, por ayudarme con la producción de larvas, juveniles y adultos de las especies estudiadas. También a Teodoro Reynoso, Pablo Monsalvo, Tizoc Moctezuma, Pablo Ormart y Francisco Higuera quienes varias veces me apoyaron o aconsejaron durante los ensayos. A Carmen Rodríguez y Diana Carreño, responsables de los Laboratorios de Histología y Bioquímica Fisiológica del CIBNOR respectivamente, por su ayuda en el procesamiento de las muestras. A Ariel Cruz y Lilia Ibarra por apoyarme en el Laboratorio de Cromatografía de Líquidos del CIBNOR. A Ana María Talamantes, Marco Antonio Díaz, María Esther Ojeda, Horacio Goytortua y Edgar Yuen por su ayuda para conseguir material bibliográfico. A María de Jesús Romero y Alejandro Amador por su apoyo técnico en ese laboratorio. A Roberto Carlos Vázquez y Ángel Campa por

capacitarme en las técnicas de biología molecular que utilicé. A Horacio Sandoval y a Manuel Melero, por su apoyo en el Laboratorio de Cómputo de Postgrado. A Teresa Sicard y Eveling Gutiérrez por ayudarme en la adquisición de los materiales y reactivos. Del CIAD-Hermosillo le agradezco a mi compañera y amiga Karla Montaña por enseñarme el manejo del equipo de cromatografía de líquidos. A los ahora Dres. Jorge Hernández y Teresa Gollás por sus consejos y al Dr. Rogerio Sotelo por permitirme usar el HPLC y columnas analíticas.

A mis compañeros del CIBNOR y del CIAD por su apoyo y amistad.

Por último, mi gratitud especial a mi mamá y al resto de mi numerosa familia.



## TABLA DE CONTENIDO

<b>Introducción</b> .....	1
Sistema inmune de moluscos bivalvos.....	3
Estado del conocimiento en larvas.....	4
Estado del conocimiento en adultos.....	5
Los hemocitos.....	5
Fagocitosis.....	6
Sistema profenoloxidasa.....	8
Péptidos antimicrobianos.....	9
Enzimas hidrolíticas.....	11
Mecanismos oxidativos.....	12
Lectinas.....	14
<b>Hipótesis</b> .....	15
<b>Objetivo General</b> .....	15
<b>Objetivos Particulares</b> .....	15
<b>Estrategia Metodológica</b> .....	16
Susceptibilidad de larvas al ataque de <i>V. alginolyticus</i> .....	16
Sistema profenoloxidasa.....	17
Péptidos antimicrobianos.....	18
Enzimas hidrolíticas.....	19
<b>Resultados</b> .....	20
Susceptibilidad de larvas al ataque de <i>V. alginolyticus</i> .....	20
Sistema profenoloxidasa.....	22
Péptidos antimicrobianos.....	25
Enzimas hidrolíticas.....	26
<b>Discusión</b> .....	29
<b>Conclusiones</b> .....	36
<b>Perspectivas</b> .....	38
<b>Referencias</b> .....	39

<b>Anexos</b> .....	55
Anexo I. Comparative susceptibility of veliger larvae of four bivalve mollusks to a <i>Vibrio alginolyticus</i> strain.....	56
Anexo II. Phenoloxidase activity in larval and juvenile homogenates and adult plasma and haemocytes of bivalve molluscs.....	63
Anexo III. Aislamiento de péptidos con actividad antimicrobiana de la hemolinfa de la almeja catarina <i>Argopecten ventricosus</i> .....	72
Anexo IV. Ontogenetic variations of hydrolytic enzymes in <i>Crassostrea gigas</i> .....	88

## PUBLICACIONES

Esta tesis esta basada en los siguientes artículos científicos y un informe técnico, los cuales se refieren como publicados, aceptados, en preparación o informe técnico.

- I. **Luna-González, A.**; A. N. Maeda-Martínez; J. C. Sainz & F. Ascencio-Valle. 2002. Comparative susceptibility of veliger larvae of four bivalve mollusks to a *Vibrio alginolyticus* strain. *Dis. Aquat. Org.* 49, 221-226.
- II. **Luna-González, A.**; A.N. Maeda-Martínez; F. Vargas-Albores; F. Ascencio-Valle & M. Robles-Mungaray. 2002. Phenoloxidase activity in larval and juvenile homogenates and adult plasma and haemocytes of bivalve molluscs. *Fish Shellf. Immunol.* (Aceptado).
- III. **Luna-González, A.**; A.N. Maeda-Martínez; F. Vargas-Albores. 2001. Aislamiento de péptidos con actividad antimicrobiana de la hemolinfa de la almeja catarina *Argopecten ventricosus*. (Informe técnico).
- IV. **Luna-González, A.**; A.N. Maeda-Martínez; F. Ascencio-Valle & M. Robles-Mungaray. 2002. Ontogenetic variations of hydrolytic enzymes in *Crassostrea gigas*. *Fish Shellf. Immunol.* (En preparación).

## **LISTA DE TABLAS**

Tabla 1. Formación de los intermediarios reactivos del oxígeno.....	13
---	----

## **LISTA DE FIGURAS**

Figura 1. Procedimiento seguido para el estudiar la susceptibilidad de larvas.....	16
Figura 2. Procedimiento seguido para estudiar el sistema profenoloxidasa.....	17
Figura 3. Procedimiento seguido para estudiar péptidos antimicrobianos.....	18
Figura 4. Procedimiento seguido para determinar la actividad de enzimas hidrolíticas.....	19
Figura 5. Actividades enzimáticas en diferentes estadios de <i>Crassostrea gigas</i> .....	28

## **ABREVIATURAS**

<b>ACN</b>	Acetonitrilo
<b>ATF</b>	Ácido trifluoroacético
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>CL<sub>50</sub></b>	Concentración letal media
<b>DSS</b>	Dodecil sulfato de sodio
<b>E<sub>ProFO</sub></b>	Enzima activadora de la profenoloxidasa
<b>FO</b>	Fenoloxidasa
<b>GP</b>	Glutación peroxidasa
<b>IRO</b>	Intermediarios reactivos del oxígeno
<b>IRN</b>	Intermediarios reactivos del nitrógeno
<b>L-DOPA</b>	De las siglas en inglés: L-3,4-dihidroxifenilalanina
<b>LPS</b>	Lipopolisacáridos
<b>NADPH</b>	De las siglas en inglés: fosfato del dinucleótido reducido de nicotinamida-adenina
<b>ON</b>	Óxido nítrico
<b>ONS</b>	Óxido nítrico sintasa
<b>PAM</b>	Péptidos antimicrobianos
<b>ProFO</b>	Profenoloxidasa
<b>PAGE</b>	De las siglas en inglés: electroforesis en gel de poliacrilamida
<b>SDS</b>	De las siglas en inglés: dodecil sulfato de sodio
<b>SIDA</b>	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
<b>SOD</b>	Superóxido dismutasa

## GLOSARIO

<b>Bacteria</b>	Organismo unicelular procariota, más grande que un virus que se presenta en varias formas (esférica, bastón o espiral). Algunas bacterias provocan enfermedades, pero muchas son benéficas
<b>Bivalvos</b>	Clase de moluscos arqueópodos de simetría bilateral, con la concha formada por dos valvas que se articulan por la charnela dorsal y se cierra por acción de músculos aductores especiales. Cuerpo sin cabeza diferenciada, con el pie típicamente comprimido en forma de hacha y con las branquias ordinariamente laminares, formadas por dos hojas unidas por tubérculos. Los sexos están separados, pero a veces se presenta hermafroditismo. Todos son acuáticos y la mayoría marinos. De locomoción muy lenta y a veces casi inmóviles, viven en el fondo del litoral enterrados en el limo o arena, o fijos en las rocas, perforando en ocasiones galerías u oquedades en el sustrato u objetos sumergidos. Son de régimen micrófago, alimentándose de organismos planctónicos o pequeñas partículas de materia orgánica
<b>Catión</b>	Un ión cargado positivamente, como el ión sodio $\text{Na}^+$
<b>Cepa</b>	En bacterias: Variedad dentro de una misma especie debido a diferencias genéticas. Aunque las cepas varían genéticamente todavía pueden reproducirse entre sí. Equivale al término raza en plantas y animales. Colonia de microorganismos monoespecífica la cual se utiliza para iniciar un cultivo bajo condiciones controladas
<b>Célula</b>	Unidad, morfológica y fisiológica que compone el cuerpo de todos los seres vivos; generalmente microscópica
<b>Cilio</b>	Pequeños filamentos similares a cabellos que están en los bordes de algunas células o estructuras de algunos organismos
<b>Diapédesis</b>	El movimiento de hemocitos de un epitelio intacto para retirar productos metabólicos, toxinas u organismos infecciosos del cuerpo

<b>Disoconcha</b>	Comienza con una línea metamórfica después de la metamorfosis y termina con el estadio de prodisoconcha II, y continúa toda la duración de la existencia del adulto sésil
<b>Enfermedad</b>	Término amplio que se utiliza para designar el daño de células suficiente para causar disfunción en el organismo. Una enfermedad puede ser causada por (1) defectos genéticos reflejados en una anormal estructura y función celular, (2) desbalance nutricional que priva a las células de nutrientes esenciales, (3) agentes químicos o físicos que lesionan las células o (4) agentes infecciosos que dañan las células por su acción fisiológica o presencia física
<b>Enzootia</b>	Enfermedad de animales, la cual es nativa de cierta localidad, usada sinonímicamente con endémico
<b>Epizootia</b>	Es el término que se utiliza cuando una enfermedad ataca a un gran número de animales simultáneamente dentro de una población, o la prevalencia de una enfermedad; similar a una epidemia entre humanos
<b>Estadio</b>	Etapas o fases de un proceso, desarrollo o transformación
<b>Etiología</b>	Es el estudio de las causas de una enfermedad
<b>Factor ciliostático</b>	Toxina sintetizada por una bacteria que inhibe la función de células ciliadas
<b>Fagocitosis</b>	Es uno de los procesos biológicos elementales que se presenta en todo el reino animal. Es el proceso de ingestión de partículas por la célula, como medio de alimentación o defensa
<b>Filtración</b>	Proceso mediante el cual se hace pasar un fluido a través de un filtro de pequeñas aberturas de material permeable para separar o eliminar las partículas sólidas en suspensión; en este caso los moluscos son filtradores de su alimento
<b>Hemolisina</b>	Sustancia capaz de originar la ruptura (lisis) de la membrana de los glóbulos rojos

<b>Huésped</b>	Organismo en el cual, o dentro del que otro organismo crece y deriva su alimentación
<b>Infección</b>	Se refiere a la presencia de un organismo infeccioso o extraño en un tejido o tejidos de un huésped. Una infección puede ocurrir sin causar enfermedad si el huésped destruye al organismo invasor o si las adaptaciones genéticas del huésped o del parásito reducen la actividad destructiva uno de otro. La recuperación de la enfermedad envuelve al sistema de defensa, el cual funciona en la reparación de los tejidos dañados
<b>Larva</b>	Forma primaria de algunos animales antes de que asuman su forma madura. Período en el curso del desarrollo de los animales entre el embrión y el adulto. En el período larvario empieza con la eclosión del huevo y termina con la metamorfosis
<b>Lisosoma</b>	Organelo celular muy rico en enzimas hidrolíticas capaz de lisar la mayor parte de los constituyentes celulares y de los elementos ingeridos por la célula
<b>Molécula anfipática</b>	Molécula que contiene una región hidrofóbica y una región hidrofílica
<b>Necrosis</b>	Degeneración y muerte localizada de células y tejidos en un organismo vivo. El proceso es irreversible e implica la destrucción del núcleo seguido de la muerte de la célula
<b>Patogenicidad</b>	La capacidad de un organismo para producir una enfermedad
<b>Patógeno</b>	Algo causante de una enfermedad, por ejemplo virus, bacterias, etc.
<b>Patología</b>	Es la ciencia que estudia la enfermedad incluyendo la naturaleza y causa de la misma, así como los cambios estructurales y funcionales resultantes
<b>Prodisoconcha I</b>	Se extiende desde la primera aparición del material de la concha larval, al primer encuentro de las orillas de las valvas, formando la concha de charnela recta (“D”)



<b>Prodisoconcha II</b>	Se extiende ontogenéticamente desde el límite de la Prodisoconcha I (P-I), a la Prodisoconcha II (P-II) hasta la metamorfosis, que es identificada como la línea metamórfica de las larvas. Un cambio abrupto ocurre después de ésta línea en la microestructura y mineralogía de la concha, que marca la aparición del juvenil o estadio de disoconcha temprano. Las valvas de P-II excluyen a la concha de la P-I, pero incluyen la nueva concha depositada en el interior de las valvas de la P-I. La parte exterior de la concha de P-II presenta un crecimiento comarginal conspicuo, que se distingue claramente de la superficie de la P-I
<b>Semilla</b>	Término usado en acuicultura para denominar a los juveniles de moluscos bivalvos destinados a ser cultivados
<b>Sistema inmune</b>	Complejo de estructuras y funciones de un organismo que lo hace resistente a las enfermedades
<b>Susceptible</b>	Capaz de recibir modificación o impresión
<b>Toxina</b>	Sustancia venenosa secretada por ciertos organismos
<b>Trocófora</b>	Primer estadio larval de los moluscos, presenta tres cinturones de cilios y un flagelo
<b>Veliger</b>	Se refiere a cualquier larva de molusco que posea un velo, que es el órgano natatorio ciliado
<b>Vibriosis</b>	Enfermedad causada por bacterias del género <i>Vibrio</i>
<b>Virulencia</b>	La habilidad de un microorganismo para producir una enfermedad

## INTRODUCCIÓN

El cultivo de moluscos bivalvos contribuye significativamente a la producción mundial y nacional de mariscos. La producción mundial de ostras, pectínidos, mejillones y almejas contribuyó con 8.9 millones toneladas métricas en 1999 (FAO, 1999). En México existen más de 54 especies nativas de moluscos (Baqueiro, 1984), sin embargo, la acuicultura de moluscos bivalvos se basa principalmente en el cultivo del ostión, de tal manera que en 2001, la producción total del país fue de 50,565 toneladas (SAGARPA, 2001). Actualmente, las especies nativas que son objeto de estudios intensivos para su cultivo son los pectínidos *Argopecten ventricosus*, *Nodipecten subnodosus* y el callo de hacha *Atrina maura*.

Las semillas o juveniles de bivalvos constituyen la materia prima de los cultivos. Un método para obtener esta materia prima consiste en la colecta de los juveniles del medio natural, provenientes de los desoves de las poblaciones naturales. Sin embargo, este método no es confiable debido a las variaciones temporales y espaciales del número de juveniles que se obtienen por colector. Un método alternativo, es la producción de juveniles en el laboratorio, pero la alta susceptibilidad de las larvas a bacterias principalmente del género *Vibrio* (Tubiash et al., 1965; Riquelme et al. 1996; Sugumar et al., 1998; Lambert et al., 1998), no permiten que el abasto de semillas sea suficiente para sostener la industria del cultivo. Las especies de vibrios que se han reportado como patógenas de larvas de moluscos son *Vibrio anguillarum* (Freites et al., 1993; Riquelme et al., 1995), *V. natriegens* (Zhang et al., 1998), *V. pectenocida* (Lambert et al., 1998), *V. tapetis* (Borrego et al., 1996), *V. splendidus* (Sugumar et al., 1998) y *V. alginolyticus* (Riquelme et al., 1996; Sainz et al., 1999). En el mar, los vibrios raramente exceden  $1 \times 10^3$  células/ml (Utting, 1986); sin embargo, en los sistemas de cultivo pueden alcanzar  $1 \times 10^6$  células/ml (Austin et al., 1988). Estas bacterias producen exotoxinas (factores ciliostáticos y hemolisinas), proteasas y endotoxinas, las cuales causan parálisis ciliar y destrucción de los tejidos de las larvas (Nottage y Birkbeck, 1987; Nottage et al., 1989). Los signos de la vibriosis en larvas son: parálisis ciliar, disminución en la habilidad para nadar, estomago vacío, gránulos lipídicos

en el tracto digestivo, nado anormal, desprendimiento del velum y cilios, y pueden llegar a producir mortalidades masivas (Tubiash et al., 1965; Elston y Leibovitz, 1980; Lodeiros et al., 1992; Nottage et al., 1989; Sugumar 1998; Sainz et al., 1999).

Las bacterias forman parte de la flora autóctona de los organismos marinos y de su ecosistema, y llegan a representar hasta un 60% de la población de microorganismos totales en algunas lagunas costeras (Simudu y Tsukamoto, 1985). Al cultivar las larvas a altas densidades en los tanques de cultivo, se crea un ambiente artificial que favorece la proliferación de bacterias oportunistas, las cuales frecuentemente son patógenas (Sindermann, 1990). La severidad de su ataque está relacionada con las condiciones subóptimas del cultivo (alta densidad larvaria, acumulación de larvas muertas o moribundas, microalgas contaminadas, gametos residuales, altas temperaturas), lo cual aumenta la proliferación bacteriana y compromete la respuesta inmune de las larvas infectadas (Elston, 1984).

En comparación con las larvas, las enfermedades provocadas por bacterias en juveniles y adultos son menos frecuentes (Sinderman, 1990; Lane y Birkbeck, 2000), lo cual indica que ocurre un proceso de maduración del sistema inmune durante la ontogenia de estos organismos (Bachère et al., 1995). La mayoría de los estudios sobre el sistema inmune en moluscos bivalvos se han realizado en adultos a pesar de la importancia que podría tener el conocimiento de la ontogenia de su sistema inmune. Hoy en día se sabe muy poco acerca de las reacciones inmunes en estadios tempranos del ciclo de vida de los moluscos, posiblemente por las dificultades inherentes al trabajar con larvas las cuales no pueden ser sangradas de la misma manera que los adultos (Dyrynda et al., 1995).

En este trabajo se presentan los resultados de un estudio de susceptibilidad al ataque de *V. alginolyticus* en larvas veliger de 7 días de edad, en la ostra japonesa (*Crassostrea gigas*), y en *A. ventricosus*, *N. subnodosus* y *A. maura*. Además se investigó la presencia de tres de los mecanismos de defensa conocidos en moluscos adultos (fenoloxidasa, péptidos antimicrobianos y enzimas hidrolíticas) en diferentes estadios de desarrollo de estas especies.

A continuación se presenta una revisión del conocimiento sobre los mecanismos de defensa en moluscos bivalvos.

## **SISTEMA INMUNE DE MOLUSCOS BIVALVOS**

Los moluscos, como todos los invertebrados, poseen un sistema de defensa llamado inmunidad innata o natural que los protege contra patógenos. Por su parte, los vertebrados cuentan, además de la inmunidad innata, con un sistema inmune adquirido (también llamado adaptativo), el cual se caracteriza por su alta especificidad y memoria inmunológica. La especificidad se debe a la capacidad de producir una variedad de anticuerpos, cada uno de ellos dirigidos contra un epítope (sitio antigénico) específico. Sin embargo, la memoria inmunológica se observa cuando, después del primer contacto con el antígeno, las clonas específicas quedan sensibilizadas y, en contactos posteriores, se expanden (expansión clonal) rápidamente, ofreciendo una respuesta eficiente (Vargas-Albores y Barracco, 2001).

El sistema inmune de los moluscos está representado principalmente por hemocitos, proteínas plasmáticas y reacciones integradas en sistemas multiméricos que involucran ambos tipos de componentes, celular y humoral (Vargas-Albores y Barracco, 2001). Debido a que los moluscos bivalvos tienen un sistema circulatorio abierto compuesto por senos, la hemolinfa baña todos los tejidos y permite que los hemocitos y los componentes humorales se distribuyan uniformemente, favoreciendo el encuentro con las partículas (bióticas y abióticas) (Allam y Paillard, 1998).

## Estado del conocimiento en larvas

A nivel celular, Elston (1980a) realizó un estudio ultraestructural de las células sanguíneas de las larvas de *Crassostrea virginica* en los estadios de prodisoconcha I y II donde identificó dos tipos de células de vida libre a las que llamó celomocitos. Un tipo fue clasificado como fagocítico y el otro como no fagocítico, el cual poseía una mayor cantidad de retículo endoplásmico liso. Ambos tipos de células fueron observados en la cavidad visceral y en los canales del nascente sistema circulatorio. En un trabajo posterior, Elston (1980b) realizó una descripción más detallada de los celomocitos larvarios con la ayuda del microscopio óptico. Observó que los fagocitos ingieren partículas de tinta de la India y que contenían gránulos citoplásmicos eosinófilos. El microscopio electrónico mostró que los fagocitos contenían vacuolas rodeadas por una membrana, mitocondrias y gránulos densos en el citoplasma. El contenido de las vacuolas varió considerablemente ya que algunas estaban vacías y otras contenían elementos de la propia célula o material extraño. Las células no fagocíticas presentaron menos mitocondrias.

La presencia de algunos elementos del sistema inmune de adultos de *Mytilus edulis* como fenoloxidasa, arilsulfatasa y metabolitos reactivos del oxígeno, ha sido confirmada en larvas trocófora y veliger de la misma especie (Dyrynda et al., 1995). En *M. galloprovincialis* se ha detectado la síntesis de los péptidos antimicrobianos mytilina y defensina, durante y después de la metamorfosis larvaria respectivamente (Mitta et al., 2000a). Con base en estos resultados, Mitta et al. (2000a), sugieren que la maduración de las funciones inmunes ocurre durante la metamorfosis.

## Estado del conocimiento en adultos

### *Los hemocitos*

En adultos de moluscos bivalvos marinos, la nomenclatura de referencia basada en la morfología de los hemocitos incluye hemocitos granulares o granulocitos y hemocitos hialinos o hialinocitos (Cheng, 1981). Recientemente, la identificación y caracterización de los hemocitos ha mejorado gracias a su separación por gradientes de Percoll, el uso de tinciones, detección de enzimas intracelulares, análisis ultra-estructurales mediante microscopía electrónica y la caracterización antigénica de moléculas de superficie con el uso de lectinas y anticuerpos monoclonales (Auffret, 1988; Pipe, 1990a,b; Noël et al., 1994; Pipe et al., 1997; Dyrzynda et al., 1997; López et al., 1997a; Xue y Renault, 2000). Los hemocitos granulares son comúnmente llamados fagocitos (Auffret, 1988) aunque los hialinocitos (a veces llamados linfocitos) también tienen capacidad fagocítica (Le Gall et al., 1991; Mortensen y Glette, 1996). Los hemocitos granulares o granulocitos tienen abundantes gránulos citoplasmáticos y son al parecer las células inmunológicamente más reactivas. Los hemocitos hialinos no tienen gránulos o tienen un número reducido de los mismos, y aparentemente participan en menor grado en las respuestas de defensa (Auffret, 1988; Henry et al., 1990).

En *C. gigas*, *M. edulis*, *Ruditapes decussatus* y *Tridacna maxima* se ha descrito una subpoblación de hemocitos granulares que presentan gránulos eosinófilos y otra con gránulos basófilos (Auffret, 1988; Bachère et al., 1988; Henry et al., 1990; Pipe, 1990a,b; Noël et al., 1994; Friebel y Renwranz, 1995; López et al., 1997a; Nakayama et al., 1997; Pipe et al., 1997). La mayoría de los bivalvos tienen una combinación de los tres tipos de células; sin embargo, existe controversia respecto a la presencia de hemocitos granulares en pectínidos. Auffret (1988) y Benninger y Le Pennec (1991) afirman que los pectínidos carecen de hemocitos granulares y que en su lugar tienen hialinocitos diferenciados, algunos de los cuales parecen funcionar como granulocitos. En contraste, Riquelme (1999) demuestra la presencia de granulocitos en *Argopecten purpuratus*.

Los hemocitos hialinos, también parecen ser una población muy heterogénea (Bachère et al., 1988). Las diferencias encontradas radican en el tamaño y forma del núcleo, cantidad de citoplasma y organelos. Hine (1999) los divide en células blásticas y células con citoplasma abundante. Las células blásticas corresponden a hemocitos indiferenciados, con núcleo grande circundado por un citoplasma muy delgado y pobre en organelos, como se ha descrito en *C. gigas* y *C. virginica* (Bachère et al., 1988; McCormick-Ray y Howard, 1991), los mejillones *M. edulis*, *M. galloprovincialis* y *Perna perna* (Rasmussen et al., 1985; Carballal et al., 1997a; Barracco et al., 1999) y en las almejas *Mercenaria mercenaria* y *Tridacna crocea* (Moore y Eble, 1977; Nakayama et al., 1997).

Las células con citoplasma abundante son hemocitos mas diferenciados que tienen un núcleo grande, a veces polimórfico, y un citoplasma amplio lleno de organelos. Estas células se han descrito en *C. gigas* y *C. virginica* (Bachère et al., 1988; McCormick-Ray y Howard, 1991), en los mejillones *M. edulis*, *M. galloprovincialis* y *P. perna* (Rasmussen et al., 1985; Carballal et al., 1997a; Barracco et al., 1999), en las almejas *M. mercenaria* y *T. crocea* (Moore y Eble, 1977; Nakayama et al., 1997) y en el pectínido *Pecten maximus* (Henry et al., 1990).

### *Fagocitosis*

Los mecanismos de defensa de bivalvos están mediados primariamente por los hemocitos, los cuales responden a las partículas extrañas u organismos ya sea fagocitándolos y destruyéndolos por medio de enzimas hidrolíticas, especies reactivas del oxígeno y factores antimicrobianos; encapsulándolos cuando son demasiado grandes para ser fagocitados o removiéndolos del huésped por migración a través de las membranas epiteliales (diapédesis) (Fisher, 1988).

El proceso de fagocitosis es considerado una vía importante para controlar y eliminar partículas extrañas (Cheng, 1981; Feng, 1988; Sparks y Morado, 1988). Este proceso de defensa está bien documentado y se subdivide en:

i) La quimiotaxis, la cual es el proceso donde los hemocitos se mueven a lo largo de un gradiente químico facilitando su contacto con la partícula extraña para fagocitarla o encapsularla (Cheng y Howland, 1982a,b). ii) El reconocimiento, el cual se lleva a cabo a través de moléculas de membrana celular y moléculas secretadas (opsoninas) (Renwrantz y Stahmer, 1983; Vasta et al., 1984). iii) La internalización (endocitosis) de las partículas extrañas, que se da a través del fagosoma primario el cual se fusiona con los lisosomas para formar el fago-lisosoma donde entonces las partículas son destruidas a través de varios mecanismos microbicidas (Cheng, 1981; Feng, 1988; Sparks y Morado, 1988), tal como se ha detallado en *M. edulis* y *M. galloprovincialis* (Pipe et al., 1990a; Cajaraville y Pal 1995a; Carballal et al., 1997b).

Aunque en los bivalvos, los hemocitos granulares parecen ser los encargados de la fagocitosis, los hemocitos hialinos presentan esta capacidad en forma reducida como se ha demostrado en *C. virginica* (Foley y Cheng, 1975), *M. mercenaria*, *R. decussatus* y *Tapes philippinarum* (Foley y Cheng, 1975; Tripp, 1992; López et al., 1997a) y en los mejillones *M. edulis*, *M. galloprovincialis* y *P. perna* (Pipe et al., 1990a, 1995; Noël et al., 1993; Cajaraville y Pal, 1995; Carballal et al., 1997a; Barracco et al., 1999).

El proceso de encapsulamiento de las partículas extrañas muy grandes (helminths, hifas de hongos y algunos protozoarios) ocurre cuando los hemocitos los envuelven en varias capas para aislarlos de los tejidos sanos del huésped, y destruirlos a través de la liberación de moléculas tóxicas o líticas. Este proceso se ha observado en *M. edulis* y *M. galloprovincialis* (Santos y Coimbra, 1995; Villalba et al., 1997), *Ruditapes semidecussatus* y *Tapes decussatus* (Sangristà et al., 1995; Montes et al., 1995a,b; Montes et al., 1996) y *Argopecten irradians* y *Patinopecten yessoensis* (Whyte et al., 1994; Bower et al., 1998).



Las partículas extrañas también pueden ser eliminadas por evacuación. Ésta ocurre cuando el hemocito fagocita una partícula y se mueve a través de las barreras epiteliales (diapédesis) hasta el lumen digestivo y excretor. Posiblemente, la prioridad del hemocito sea digerir intracelularmente el material, pero si esto no es posible, se lleva a cabo la evacuación. Esta función requiere las mismas actividades celulares involucradas en la fagocitosis, particularmente en la locomoción (Tripp, 1960; Feng, 1965; Fisher, 1986).

### *Sistema profenoloxidasa*

La fenoloxidasa (FO), es la enzima involucrada en la melanización durante el proceso de encapsulación, formación de nódulos y cicatrización de heridas en artrópodos. Esta enzima cataliza la oxidación de fenoles a quinonas, las cuales continúan su transformación no enzimáticamente hasta melanina. Los compuestos intermediarios formados y la melanina son tóxicos para los microorganismos (Lerch, 1988; Nappi y Seymour, 1991; Nappi y Vass, 1993). La FO es una enzima que oxida mono y difenoles, y forma parte de una cascada proteolítica llamada sistema de activación de la profenoloxidasa (proFO). El sistema proFO es activado en un proceso secuencial a FO por serín-proteasas, las cuales han sido previamente activadas por componentes de la pared celular de hongos ( $\beta$  1,3-glucanos) y bacterias (LPS). El sistema proFO y sus proteínas asociadas, está relacionado con reconocimiento de partículas extrañas, opsonización y comunicación celular en muchos invertebrados (Söderhäll, 1982, 1992; Johansson y Söderhäll, 1989). El sistema proFO ha sido ampliamente estudiado en artrópodos. Sin embargo, existen pocos reportes de la presencia y localización del sistema proFO en moluscos (Coles y Pipe, 1994). La actividad de la FO ha sido demostrada en varias especies de moluscos bivalvos (Waite y Wilbur, 1976; Smith y Söderhäll, 1991; Coles y Pipe, 1994; Renwranz et al., 1996; Asokan et al., 1997; López et al., 1997b; Carballal et al., 1997b; Deaton et al., 1999), pero no fue encontrada en *T. crocea* (Nakayama et al., 1997) ni en *P. perna* (Barracco et al., 1999).

La presencia de la FO en la hemolinfa de los moluscos y la estimulación de su actividad por componentes de la pared celular de bacterias, sugieren que la FO es parte de un mecanismo de defensa interno (Deaton et al., 1999). Actualmente, sólo el trabajo de Asokan et al. (1997) ha demostrado la activación del sistema proFO por componentes de la pared celular de bacterias y hongos en el mejillón *P. viridis*.

### *Péptidos antimicrobianos*

Los péptidos antimicrobianos (PAM) son proteínas de bajo peso molecular (<10 kDa), catiónicas y anfipáticas que participan como mecanismo de defensa del huésped contra microorganismos. Cada PAM es codificado por un solo gen y están involucrados en la respuesta inmune innata de vertebrados, invertebrados y plantas, y son esenciales en organismos que carecen de inmunidad adaptativa (Broekaert et al., 1995; Charlet et al., 1996; Iwanaga et al., 1998; Lehrer y Ganz, 1999).

En los moluscos, los PAM han sido estudiados en algunos mejillones, donde son constitutivos. En *Mytilus edulis* se purificaron y caracterizaron del plasma dos moléculas (defensinas A y B) pertenecientes a la familia de las defensinas de artrópodos que contienen 6 cisteínas (Charlet et al., 1996), mientras que un péptido tipo defensina (MGD1), con 8 cisteínas se aisló del plasma y hemocitos de *M. galloprovincialis* (Hubert et al., 1996; Mitta et al., 1999a); una segunda isoforma (MGD2) se identificó a partir de ARN mensajero de hemocitos (Mitta et al., 1999a). Un segundo grupo de moléculas (mytilinas; 34 residuos) de las cuales se han caracterizado 5 isoformas (A, B, C, D y G) fueron aisladas del plasma de *M. edulis* (A y B) (Charlet et al., 1996) y las isoformas B, C, D, y G1 fueron aisladas de hemocitos de *M. galloprovincialis* (Mitta et al., 2000a). Un tercer grupo de péptidos llamados myticinas (40 residuos) se caracterizó del plasma (isoforma A) y hemocitos (isoformas A y B) de *M. galloprovincialis* (Mitta et al., 1999b). Por último, se caracterizó parcialmente un péptido antifúngico (mytimicina) de 6.5 kDa con 12 cisteínas del plasma de *M. edulis* (Charlet et al., 1996).

Las myticinas y defensinas son esencialmente activas contra bacterias Gram (+), incluyendo algunas patógenas para invertebrados marinos (Charlet et al., 1996; Hubert et al., 1996; Mitta et al., 1999b; Mitta et al., 2000b) y mucho menos activas contra Gram (-) y hongos. Las mytilinas tienen un espectro de actividad más amplio dependiendo de la isoforma. Las isoformas B, C y D son tóxicas para Gram (+) y Gram (-). La mytilina G1 tiene actividad solamente contra bacterias Gram (+), las mytilinas B y C tienen actividad contra el *Fusarium oxysporum* que es patógeno para crustáceos marinos y contra la bacteria Gram (-) *Vibrio splendidus* que es patógena para bivalvos marinos (Charlet et al., 1996; Hubert et al., 1996; Sugumar et al., 1998; Mitta et al., 1999a; Mitta et al., 2000b). Las myticinas y defensinas son esencialmente activas contra bacterias Gram (+), incluyendo algunas patógenas para invertebrados marinos (Charlet et al., 1996; Hubert et al., 1996; Mitta et al., 1999b; Mitta et al., 2000b) y mucho menos activas contra Gram (-) y hongos. Las mytilinas tienen un espectro de actividad más amplio dependiendo de la isoforma. Por ejemplo, las isoformas B, C y D son tóxicas para Gram (+) y Gram (-), mientras que la mytilina G1, tiene actividad solamente contra bacterias Gram (+). Las mytilinas B y C, actúan contra *Fusarium oxysporum*, patógeno de crustáceos marinos, y contra la bacteria Gram (-) *V. splendidus*, la cual es patógena para bivalvos marinos (Charlet et al., 1996; Hubert et al., 1996; Sugumar et al., 1998; Mitta et al., 1999a; Mitta et al., 2000b).

Las defensinas y mytilinas están presentes en el hemocito en diferentes organelos subcelulares. Las defensinas se localizan en vesículas de granulocitos de gránulos grandes y pequeños (Mitta et al., 1999a; Mitta et al., 2000b,c). Las mytilinas se encuentran en granulocitos de gránulos grandes y particularmente en estructuras multivesiculares grandes (Mitta et al., 2000a,b,c). Al parecer los dos tipos de granulocitos, uno conteniendo solamente mytilinas y el otro conteniendo ambos (mytilina y defensina), están involucrados en diferentes estadios de la respuesta anti-infecciosa. El primer tipo de granulocito está relacionado con una fase temprana de respuesta, cuando migra hacia los sitios de infección y fagocita al microorganismo, y el segundo tipo de granulocito actúa en una respuesta tardía liberando los péptidos al plasma (Mitta et al., 2000c).

## *Enzimas hidrolíticas*

Los hemocitos participan en la eliminación de material extraño en los moluscos bivalvos a través de la fagocitosis. Dentro de los hemocitos, existen diversas enzimas hidrolíticas con actividad de proteasas, glucosidasas, fosfatasas, lipasas y estererasas indicativas de la presencia de lisosomas (Pipe, 1990a,b; López et al., 1997b). Las enzimas lisosomales dentro de los hemocitos, matan y degradan las partículas fagocitadas y en algunos casos, son liberadas de la célula al plasma u otros tejidos donde pueden modificar la conformación molecular de la superficie de las partículas y con ello favorecer su reconocimiento y fagocitosis. Por este motivo, la actividad enzimática en la hemolinfa ha sido estudiada como uno de los indicadores de la capacidad inmune en muchas especies de bivalvos, incluyendo a: *C. virginica*, *M. mercenaria*, *Mya arenaria*, *Ostrea edulis*, *C. gigas*, *M. galloprovincialis*, *R. decussatus* y *Corbicula japonica* (Cheng et al., 1975; Rodrick, 1975; Cheng, 1975, 1981, 1992; Mohandas et al., 1985; Dikkeboom et al., 1988; Pipe, 1990a; Kumazawa et al., 1991; Oubella et al., 1994; Cajaraville et al., 1995; Carballal et al. 1997b; López et al., 1997b; Xue y Renault, 2000). Enzimas lisosomales como lisozima, fosfatasa ácida, esterasa y  $\beta$ -glucoronidasa han sido usadas para definir la función de los hemocitos, en diferentes especies de bivalvos (Feng y Canzonier, 1970; Cheng et al., 1975; Chu y La Peyre, 1989; Beckmann et al., 1992; Carballal et al., 1997b; Torreilles et al., 1997). En la mayoría de los estudios, el análisis concierne sólo a algunas enzimas. Sin embargo, el proceso de resistencia a una infección puede involucrar una reacción general mas que la función de ciertas enzimas individuales en estos organismos que carecen de una respuesta inmune específica. Por lo tanto, es importante conocer el estado metabólico enzimático general (Xue y Renault (2000).

## *Mecanismos oxidativos*

Durante el proceso de fagocitosis los hemocitos llevan a cabo un fenómeno conocido como estallido respiratorio de manera similar al observado en fagocitos de mamíferos (Adema et al., 1991). El mecanismo involucrado en la destrucción intracelular del material fagocitado comprende la generación de varios intermediarios reactivos del oxígeno (IRO) y nitrógeno (IRN) (Tabla 1), los cuales son moléculas que representan evolutivamente una respuesta inmune innata antigua presente tanto en plantas como animales (Nappi y Ottaviani, 2000). La producción de IRO e IRN por los hemocitos resulta de interacciones receptor-ligando y está mediada en parte por la NADPH oxidasa y por la óxido nítrico sintasa (ONS) respectivamente. Cuando el microbio se adhiere a la membrana plasmática del hemocito, se inicia inmediatamente un incremento en la actividad de la vía de la hexosa monofosfato, aumentando la producción de NADPH el cual es usado para reducir el oxígeno molecular a anión superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo, las cuales son moléculas microbicidas. NADPH oxidasa es un complejo enzimático localizado en la membrana plasmática que facilita la transferencia de electrones del NADPH citosólico al oxígeno vía una flavoproteína intermediaria y citocromo. Aunque las células fagocíticas son los productores de IRO más eficientes, virtualmente todas las células eucarióticas generan estas moléculas, principalmente como productos de reacciones de transferencia de electrones (Anderson, 1994; Anderson, 1999; Arumugam et al., 2000; Nappi y Ottaviani, 2000).

Tabla 1. Mecanismos de formación de los intermediarios reactivos del oxígeno en el estallido respiratorio.

Intermediarios reactivos del oxígeno (IRO)	IRO vía reacciones del estallido respiratorio
Anión superóxido ( $O_2^-$ )	$NADPH + 2O_2 \longrightarrow NADP^+ + H^+ + 2O_2^-$
Peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ )	$2O_2^- + 2H^+ \xrightarrow{SOD} H_2O_2 + O_2$
Radical hidroxilo ( $\cdot OH$ )	$H_2O_2 + O_2^- \longrightarrow \cdot OH \longrightarrow HO^- \longrightarrow O_2$
	$H_2O_2 + Fe^{2+} \longrightarrow \cdot OH + HO^- + Fe^{3+}$
	$H_2O_2 + NO \longrightarrow \cdot OH + HNO_2$
Ácido hipocloroso (HOCl)	Sistema mieloperoxidasa:
	$H_2O_2 + Cl^- \longrightarrow HOCl + HO^-$
	$HOCl + O_2^- \longrightarrow \cdot OH$

Los intermediarios reactivos del nitrógeno se derivan del óxido nítrico (ON), un radical libre que es producido de la L-arginina por la enzima NOS. El ON puede reaccionar consigo mismo y con otras moléculas como el anión superóxido ( $O_2^-$ ), oxígeno molecular ( $O_2$ ), agua ( $H_2O$ ) y peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) para generar moléculas reactivas como anhídrido nitroso ( $N_2O_3$ ), peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), nitrito ( $NO_2^-$ ), nitrato ( $NO_3^-$ ) e hidroxilo ( $\cdot OH$ ) (Nappi y Ottaviani, 2000).

Existen varios trabajos donde se ha demostrado la existencia de IRO y/o IRN en moluscos bivalvos como *P. yessoensis* (Nakamura et al., 1985), *P. maximus* (Le Gall et al., 1991; Lambert y Nicolas, 1998), *M. edulis* (Noël et al., 1991; Pipe, 1992; Winston et al., 1996), *M. galloprovincialis* (Pipe et al., 1995; Torreilles y Guérin, 1999; Arumugam et al., 2000), *P. perna* (Barracco et al., 1999); *O. edulis* y *C. gigas* (Bachère et al., 1991), *C. virginica* (Anderson, 1994; Austin y Paynter, 1995; Fisher et al., 1996) y *T. crocea* y *Mercenaria mercenaria* (Anderson, 1994; Nakayama y Maruyama, 1998). Los intermediarios reactivos del oxígeno y del nitrógeno tienen efectos citotóxicos y microbicidas pero pueden producir daños importantes en los tejidos del huésped.

Para neutralizar los efectos no deseados, existen enzimas protectoras o antioxidantes como la glutatión-peroxidasa dependiente de selenio (GP; EC 1.11.1.9), catalasa (EC 1.11.1.6) y la superóxido dismutasa (SOD; EC 1.15.1.1). Además, se han reportado otros antioxidantes de bajo peso molecular como ácido ascórbico,  $\alpha$ -tocoferol, ácido úrico, glutatión,  $\beta$ -carotenos y vitamina E (Pipe, 1992; Nappi y Ottaviani, 2000).

### *Lectinas*

Las lectinas son proteínas o glucoproteínas no enzimáticas que se unen a carbohidratos (sin transformarlos químicamente) de manera específica y se encuentran en virus, bacterias, plantas, invertebrados y vertebrados (Fisher y DiNuzzo, 1991; Arason, 1996; Olafsen et al. 1992). En invertebrados, las lectinas pueden actuar como moléculas de reconocimiento en actividades defensivas como agregación de leucocitos y opsonización de material no propio (Renwranz, 1983; Vasta y Marchalonis, 1984; Sima y Vetvicka, 1993). Las lectinas en invertebrados se pueden encontrar unidas o integradas a la superficie de la membrana celular del hemocito, o libres en el plasma (Renwranz, 1983; Renwranz y Stahmer, 1983; Vasta et al., 1984). Se han propuesto dos modelos sobre la forma en que actúan las lectinas. El primero considera que después de la reacción con el antígeno, la lectina modifica su estructura y expone nuevos sitios que reconocen a los hemocitos. El segundo indica que al reaccionar la lectina con la superficie de la partícula, se concentran localmente y entonces se manifiesta un incremento en la afinidad de la lectina por el hemocito (Renwranz, 1986).

En los moluscos bivalvos se han encontrado lectinas en *C. gigas* (Hardy et al., 1977; Olafsen et al., 1992), *M. edulis* (Renwranz, 1983), *C. virginica* (Vasta et al., 1984), *Megapitaria squalida* (Ascencio y Ochoa, 1985), *Pinctada fucata martensii* (Suzuki y Mori, 1990), *M. mercenaria* (Tripp, 1992), *Anadara granosa* (Dam et al., 1993, 1994), *Crenomytilus grayanus* (Belogortseva et al., 1998) y *Modiolus modiolus* (Tunkijjanukij et al., 1997).

## HIPÓTESIS

- Las larvas veliger de moluscos bivalvos son susceptibles al ataque de *V. alginolyticus* y además existen diferencias interespecíficas en la susceptibilidad.
- El sistema inmune de moluscos bivalvos presenta una maduración que hace a los juveniles y adultos menos susceptibles a infecciones causadas por microorganismos patógenos.

## OBJETIVO GENERAL

Determinar si existen diferencias en la susceptibilidad al ataque de *V. alginolyticus*, en larvas veliger de *C. gigas*, *A. ventricosus*, *N. subnodosus* y *A. maura*, y estudiar la presencia de la fenoloxidasa, péptidos antimicrobianos y enzimas hidrolíticas como potenciales partícipes en el sistema de defensa de algunas de estas especies en diferentes estadios de su ciclo de vida.

## OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar la susceptibilidad de larvas de *C. gigas*, *A. ventricosus*, *N. subnodosus* y *A. maura* a *V. alginolyticus* cepa APSA2.
- Determinar la actividad de la fenoloxidasa en larvas y juveniles de *C. gigas*, *A. ventricosus* y *N. subnodosus*.
- Determinar la actividad de la fenoloxidasa en organismos adultos de *C. gigas*, *A. ventricosus*, *N. subnodosus* y *A. maura*.
- Aislar péptidos de la hemolinfa de *A. ventricosus* con actividad antibacteriana.
- Determinar la presencia de enzimas hidrolíticas en ovocitos, larvas, juveniles y adultos de *C. gigas*.



## ESTRATEGIA METODOLÓGICA

La descripción detallada de los métodos utilizados en este trabajo se encuentra en los manuscritos referidos en los anexos. Sin embargo, en las Figuras 1, 2, 3 y 4 se presenta una síntesis esquemática de los procedimientos seguidos en cada uno de los estudios.

### *Susceptibilidad de larvas al ataque de *V. alginolyticus**

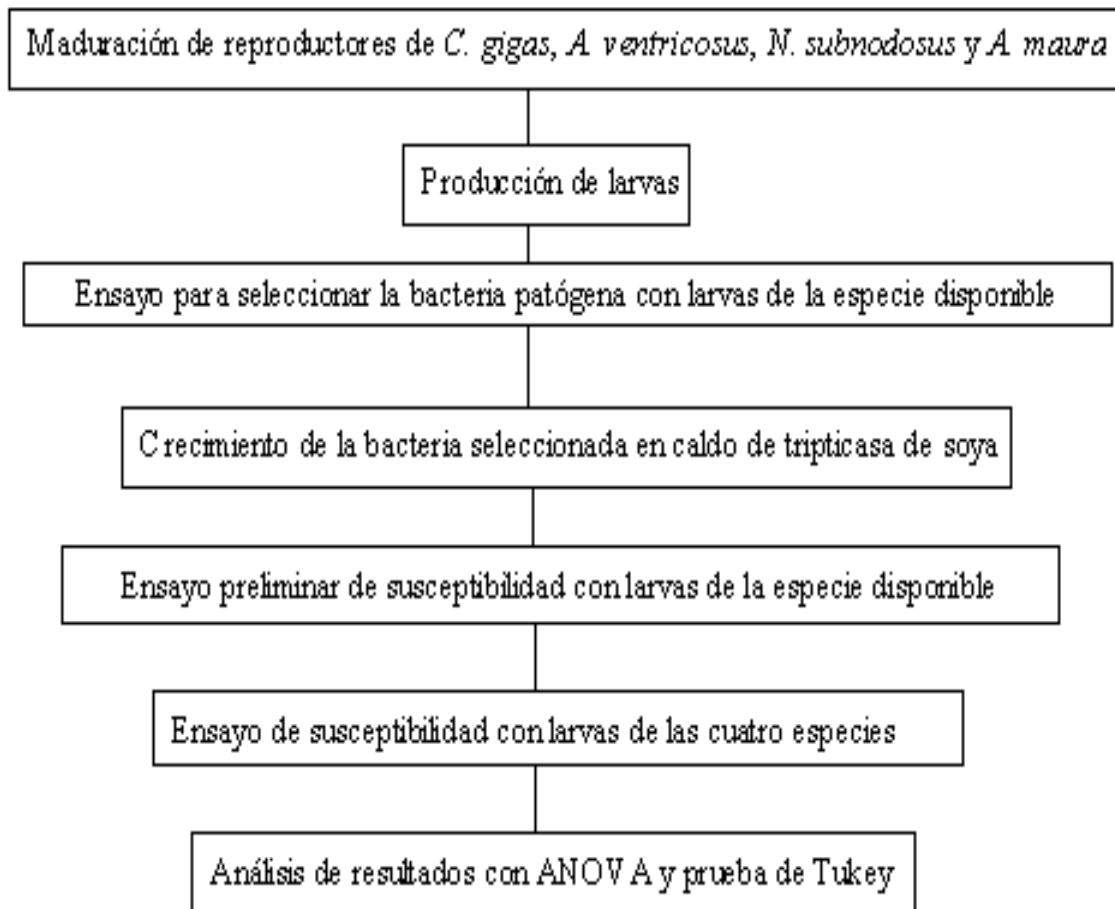


Figura 1. Procedimiento seguido para el estudiar la susceptibilidad de larvas veliger de 7 días de edad de *Crassostrea gigas*, *Argopecten ventricosus*, *Nodipecten subnodosus* y *Atrina maura* al ataque de bacterias del género *Vibrio alginolyticus* cepa APSA 2.

## Sistema profenoloxidasa

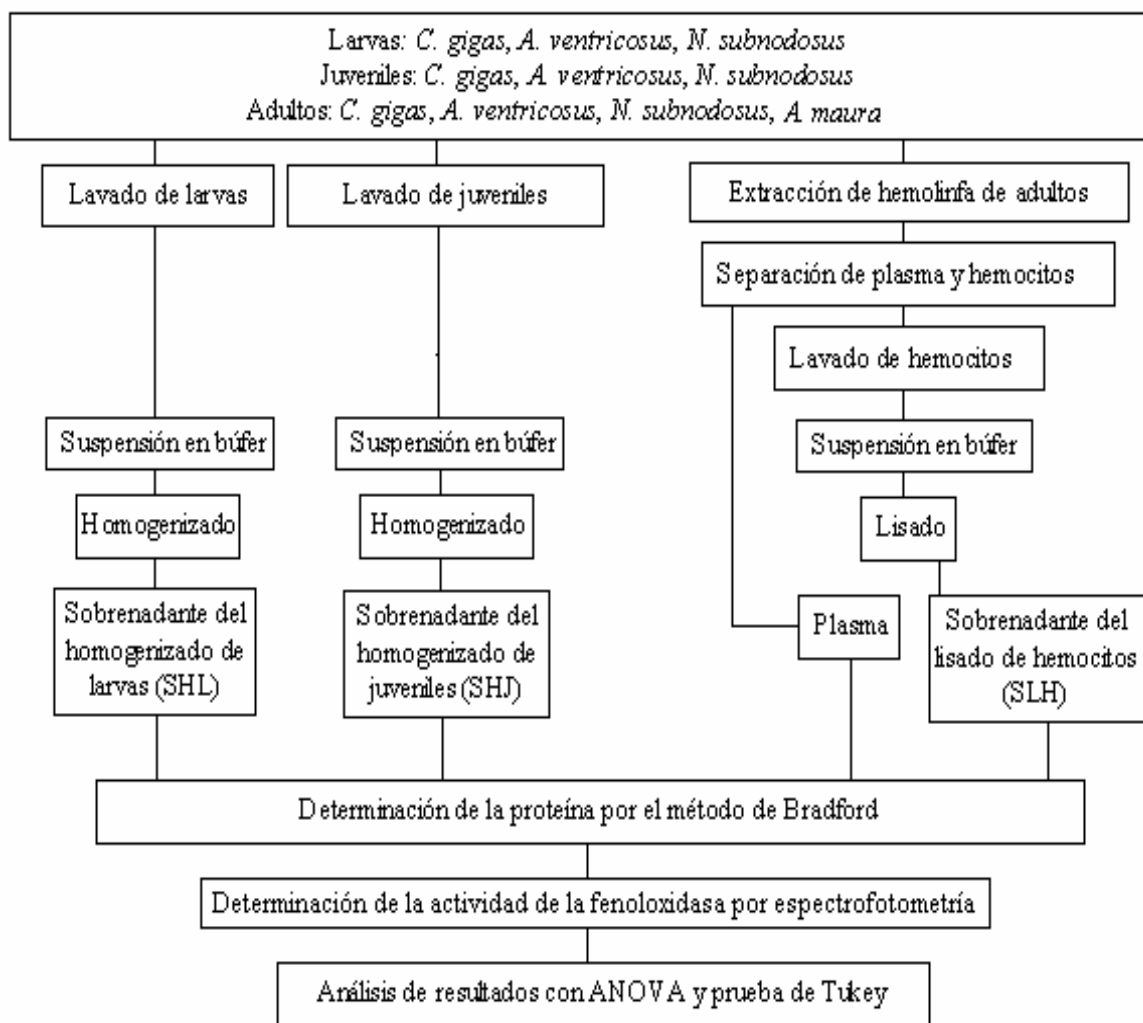


Figura 2. Procedimiento seguido para estudiar el sistema profenoloxidasa en larvas, juveniles y adultos de *Crassostrea gigas*, *Argopecten ventricosus*, *Nodipecten subnodosus* y *Atrina maura*. Nota: Este estudio no se pudo hacer en larvas y juveniles de *A. maura* por no contar con ejemplares de esta especie en dichos estadios de desarrollo.

## *Péptidos antimicrobianos*

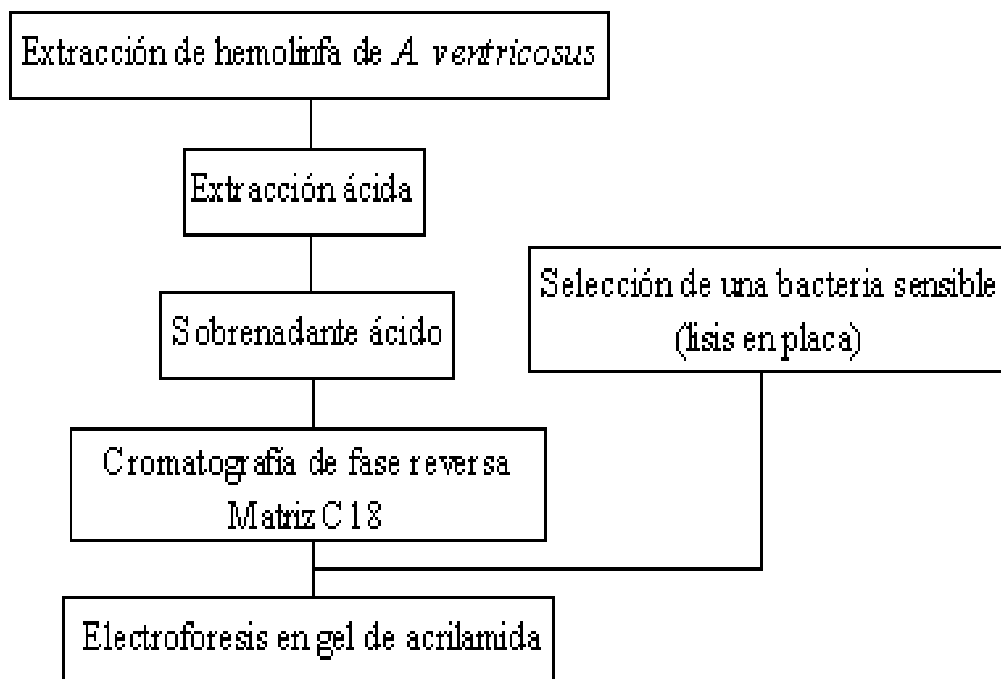


Figura 3. Procedimiento seguido para estudiar los péptidos antimicrobianos en la hemolinfa de adultos de *Argopecten ventricosus*.

## Actividad de enzimas hidrolíticas lisosomales

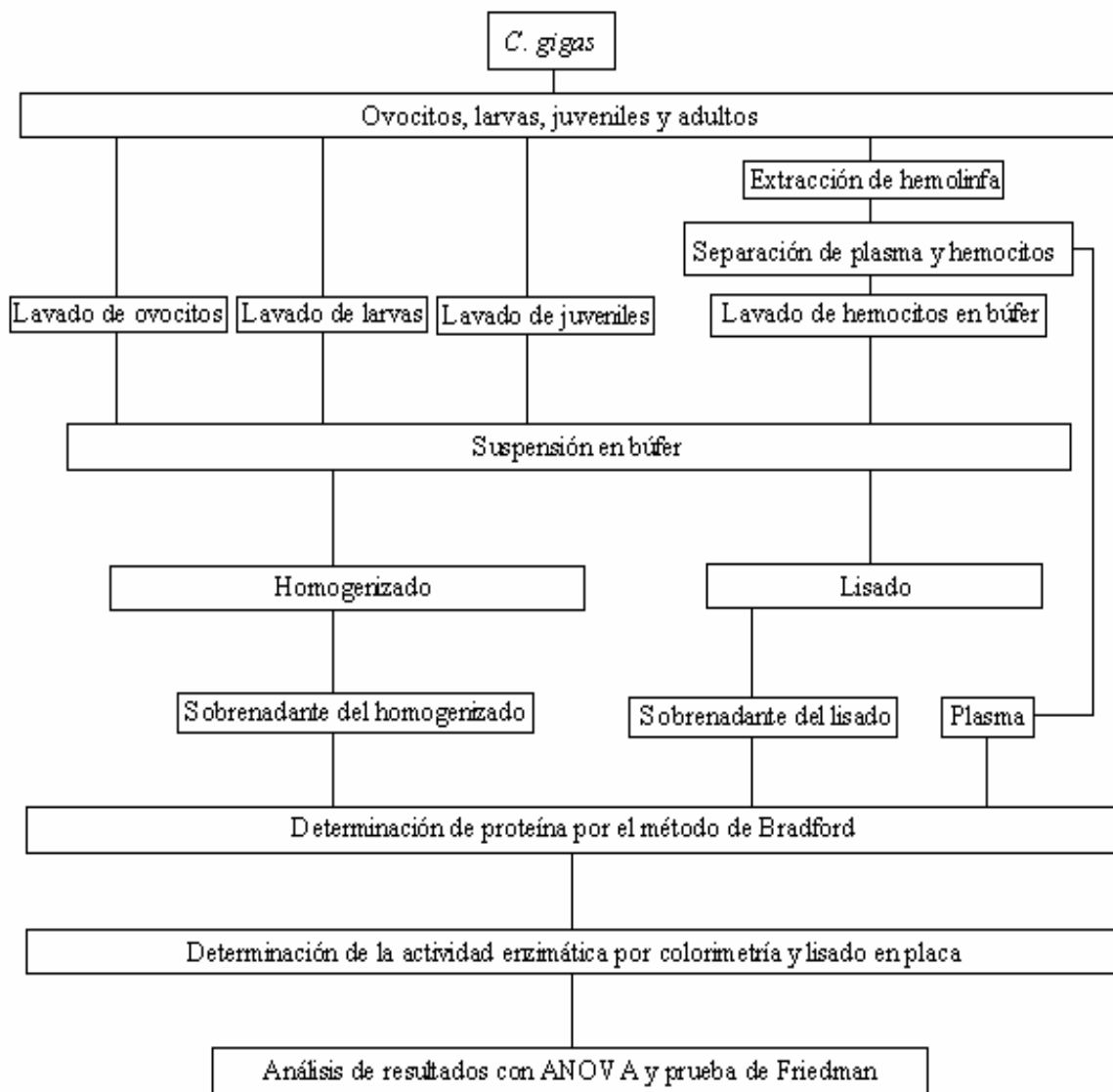


Figura 4. Procedimiento seguido para determinar la actividad de enzimas hidrolíticas lisosomales en ovocitos, larvas, juveniles y en la hemolinfa de la ostra japonesa *Crassostrea gigas*.

## RESULTADOS

### *Susceptibilidad de larvas al ataque de *V. alginolyticus**

Se determinó la susceptibilidad de larvas de 7 días de edad de *C. gigas*, *A. ventricosus*, *N. subnodosus* y *A. maura* a 5 diferentes concentraciones de *Vibrio alginolyticus* cepa APSA2. El parámetro que se usó para definir la susceptibilidad fue la supervivencia expresada en porcentaje, durante 6 días de experimentación. Previamente a los experimentos, se seleccionó el vibrio más virulento disponible en el cepario del CIBNOR, retando larvas de *A. ventricosus* de 7 días de edad con  $2.0 \times 10^5$  células/ml. Las bacterias que se probaron fueron *V. alginolyticus* cepas APSA2 y APSA4, *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *V. tubiashi* y *V. vulnificus*. La bacteria seleccionada fue *V. alginolyticus* cepa APSA2 (**Figura 1, Anexo I**). También se investigó previamente si fuese necesario hacer reinoculaciones de bacterias a lo largo del experimento o si una exposición inicial sería suficiente para producir la enfermedad. Así, larvas veliger de *A. maura* de 7 días de edad se expusieron a una suspensión de  $10 \times 10^5$  células/ml durante cuatro días. En un primer tratamiento, la mitad del volumen de agua fue reemplazado por agua de mar estéril cada dos días, y en un segundo tratamiento el volumen total se reemplazó a las 24 h de iniciado el experimento. Los resultados (**Figura 2, Anexo I**) indicaron que las larvas adquirirían la enfermedad con la primera exposición a la bacteria eliminando la necesidad de hacer reinoculaciones. Con esta información previa se procedió a realizar el experimento de susceptibilidad en las cuatro especies. Los resultados (**Figura 3, Anexo I**) indicaron que la susceptibilidad aumenta a mayores concentraciones bacterianas. Además se registraron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) en la susceptibilidad de las cuatro especies, siendo las más susceptibles los pectínidos *A. ventricosus* y *N. subnodosus*.

En *A. ventricosus*, la supervivencia fue ligeramente afectada durante los 6 días de experimentación a concentraciones de  $0.1 \times 10^5$  células/ml (**Figura 3b, Anexo I**). Sin embargo, a concentraciones de  $0.5 \times 10^5$  células/ml, la supervivencia decrece rápidamente a 20% en sólo 3 días (**Figura 3c, Anexo I**), y a  $2.5 \times 10^5$  células/ml fue de 7% en el mismo periodo de tiempo. En *N. subnodosus* la supervivencia fue ligeramente mayor que en *A. ventricosus*. En contraste, las larvas de *A. maura* y *C. gigas* mostraron una menor susceptibilidad que en las otras dos especies. Durante los primeros 4 días, la supervivencia de las larvas de *A. maura* fue superior al 60% en todos los tratamientos. Sin embargo, a tiempos mas prolongados la supervivencia disminuyó casi a cero en concentraciones por arriba de  $2.5 \times 10^5$  células/ml en el día 6. En *C. gigas*, la supervivencia permaneció cerca del 40% en todos los tratamientos, aún en el día 6 (**Figura 3, Anexo I**). La mortalidad en esta especie fue gradual en todos los tratamientos, lo cual no es común en las epizootias que ocurren en los laboratorios de producción de semillas, en donde las mortalidades son masivas y repentinas. La supervivencia en los controles sin bacterias fue similar en las 4 especies ( $P > 0.05$ ), variando entre 66% (*A. maura*) y 75% (*C. gigas*) en el día 6 (**Figura 3a, Anexo I**).

Estos resultados permitieron calcular la concentración letal media ( $CL_{50}$ ) para cada especie. Las  $CL_{50}$  calculadas (**Tabla 1, Anexo I**) muestran una mayor susceptibilidad de las larvas de *A. ventricosus* y de *N. subnodosus* a la bacteria que el resto de las especies. En el día 1, la  $CL_{50}$  fue  $> 10 \times 10^5$  células/ml para todas las especies probadas. Sin embargo, en el día 2,  $1.3 \times 10^5$  y  $3.9 \times 10^5$  células/ml fueron necesarias para eliminar la mitad de las larvas de *A. ventricosus* y *N. subnodosus*, respectivamente, y  $> 10 \times 10^5$  células/ml para matar la mitad de las larvas de *A. maura* y *C. gigas*. De forma similar, en el día 4, la  $CL_{50}$  fue  $0.3 \times 10^5$  y  $1.5 \times 10^5$  células/ml para las larvas de *A. ventricosus* y *N. subnodosus*, respectivamente, y  $> 10 \times 10^5$  células/ml para las larvas de *A. maura* y *C. gigas*. En los días 5 y 6, ocurrió una repentina disminución en la  $CL_{50}$  para las larvas de *A. maura*, de  $5.0 \times 10^5$  células/ml en el día 5 a  $0.8 \times 10^5$  células/ml en el día 6.

Los resultados de la  $CL_{50}$  para las larvas de *C. gigas* mostraron que esta especie es la menos susceptible a *V. alginolyticus* cepa APSA2. Su  $CL_{50}$  permaneció en  $> 10 \times 10^5$  células/ml durante los primeros 5 días, y entonces disminuye a  $6.7 \times 10^5$  células/ml en el día 6.

Los signos comunes de la vibriosis o necrosis bacilar (Tubiash et al., 1965; Elston y Leibovitz, 1980; Freitas et al., 1993) fueron observadas en las larvas de todas las especies retadas. Se observó una disminución en su capacidad natatoria, parálisis ciliar, estómagos vacíos y tejidos necrosados. El nado anormal (nado en círculos) y desprendimiento de cilios y velo se observó sólo en pocas larvas. Las larvas de las 4 especies fueron susceptibles al ataque de *V. alginolyticus* cepa APSA2 y la causa de dicha susceptibilidad posiblemente se deba a la carencia o a una funcionalidad limitada de los mecanismos de defensa encontrados en adultos. Los experimentos siguientes se realizaron para ofrecer una explicación de la gran susceptibilidad de las larvas.

### *Sistema profenoloxidasa*

La actividad de la FO en las muestras de larvas y juveniles (*C. gigas*, *A. ventricosus*, *N. subnodosus*) y de los adultos (*C. gigas*, *A. ventricosus*, *N. subnodosus*, *A. maura*) se midió espectrofotométricamente a 490 nm de longitud de onda, utilizando L-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) como sustrato. Los activadores probados fueron: tripsina,  $\alpha$ -quimiotripsina, dodecil sulfato de sodio (DSS), laminarina y lipopolisacáridos (LPS). La actividad de la enzima se expresó en unidades, donde una unidad representa el cambio en absorbancia por minuto por miligramo de proteína. Cuando se obtuvieron valores menores a 2 unidades, se consideró como actividad negativa (Smith y Söderhäll, 1991).

Actividad de la fenoloxidasa en larvas. Los valores del control (muestras incubadas con búfer en lugar de activadores) para larvas de *C. gigas*, *A. ventricosus* y *N. subnodosus* fueron de  $0.8\pm 0.1$ ,  $0.7\pm 0.1$  y  $1.2\pm 0.21$  U, respectivamente. No existe actividad FO en el control ni en las muestras incubadas con tripsina ( $0.8\pm 0.1$ ,  $0.5\pm 0.04$ ,  $1.3\pm 0.03$  U, respectivamente),  $\alpha$ -quimiotripsina ( $0.7\pm 0.08$ ,  $0.4\pm 0.01$ ,  $1.2\pm 0.09$  U, respectivamente), DSS ( $0.5\pm 0.04$ ,  $0.4\pm 0.06$ ,  $1.3\pm 0.14$  U, respectivamente), laminarina ( $0.9\pm 0.08$ ,  $0.7\pm 0.03$ ,  $1.1\pm 0.03$  U, respectivamente) y LPS ( $0.5\pm 0.04$ ,  $0.5\pm 0.01$ ,  $0.9\pm 0.07$  U, respectivamente) (**Página 5, Anexo II**). Por lo tanto, las larvas de las 3 especies probadas no tienen actividad de FO.

Actividad de la fenoloxidasa en juveniles. Los resultados obtenidos en juveniles muestran que la actividad de FO sólo se presenta en *C. gigas* y *N. subnodosus*. Los valores del control (muestras incubadas con búfer) para juveniles de *C. gigas*, *A. ventricosus* y *N. subnodosus* fueron de  $3.9\pm 0.6$ ,  $0.2\pm 0.04$ ,  $1.9\pm 0.5$  U, respectivamente. No hubo diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) entre el control y los activadores como tripsina ( $4.5\pm 0.4$ ,  $0.4\pm 0.08$ ,  $4.3\pm 0.5$  U, respectivamente),  $\alpha$ -quimiotripsina ( $4.0\pm 0.6$ ,  $0.2\pm 0.10$ ,  $3.8\pm 0.4$  U, respectivamente), DSS ( $3.9\pm 0.2$ ,  $0.2\pm 0.01$ ,  $3.3\pm 0.6$  U, respectivamente), laminarina ( $4.1\pm 0.4$ ,  $0.2\pm 0.03$ ,  $3.4\pm 0.2$  U, respectivamente) y LPS ( $3.9\pm 0.3$ ,  $0.1\pm 0.01$ ,  $2.3\pm 0.2$  U, respectivamente) (**Anexo II**). Con estos resultados se concluye que los juveniles de algunos moluscos bivalvos cuentan con la enzima FO aunque se ignora si la enzima participa en el sistema inmune.



Actividad de la fenoloxidasa en adultos. La hemolinfa de los organismos adultos se fraccionó en plasma y hemocitos. La oxidación de la L-DOPA ocurrió tanto en el control como con los activadores probados (**Tabla 1, Anexo II**). Los valores del control (muestras incubadas con búfer) en plasma de *C. gigas*, *A. ventricosus*, *N. subnodosus* y *A. maura* fueron de  $7.3\pm 0.5$ ,  $25\pm 5$ ,  $18\pm 0.6$ ,  $15\pm 2.6$  U, respectivamente. Los valores del control en el SLH fueron de  $4.5\pm 2$ ,  $2.7\pm 0.3$ ,  $2.8\pm 0.4$ ,  $4.6\pm 0.6$  U, respectivamente. En plasma hubo diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre el control y los activadores (marcados con asterisco) como tripsina ( $19\pm 0.5^*$ ,  $67\pm 3.5^*$ ,  $32\pm 3^*$ ,  $31\pm 6^*$  U, respectivamente),  $\alpha$ -quimiotripsina ( $19\pm 1^*$ ,  $55\pm 2.5^*$ ,  $37\pm 0.6^*$ ,  $26\pm 4$  U, respectivamente), DSS ( $22\pm 3^*$ ,  $54\pm 5^*$ ,  $41\pm 2^*$ ,  $27\pm 4$  U, respectivamente), laminarina ( $20\pm 0.5^*$ ,  $50\pm 8^*$ ,  $44\pm 2^*$ ,  $34\pm 4^*$  U, respectivamente) y LPS ( $19\pm 0.5^*$ ,  $33\pm 8$ ,  $43\pm 2^*$ ,  $17\pm 4$  U, respectivamente). En el SLH hubo diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre el control y los activadores (marcados con asterisco) como tripsina ( $9.8\pm 3$ ,  $5.6\pm 1.2$ ,  $6\pm 0.2^*$ ,  $16\pm 4$  U, respectivamente),  $\alpha$ -quimiotripsina ( $9.3\pm 4$ ,  $4.7\pm 1.5$ ,  $4.4\pm 0.5^*$ ,  $16\pm 4$  U, respectivamente), DSS ( $14.6\pm 2$ ,  $5.2\pm 1.3$ ,  $5.2\pm 0.3^*$ ,  $18\pm 5$  U, respectivamente), laminarina ( $9.6\pm 4$ ,  $5.6\pm 2$ ,  $7\pm 0.6^*$ ,  $19\pm 5$  U, respectivamente) y LPS ( $8.6\pm 0.5$ ,  $4.1\pm 0.4$ ,  $5.7\pm 0.8^*$ ,  $9\pm 1.4$  U, respectivamente). Los resultados del cóctel de inhibidores de proteasas (P-2714), en la activación de la proFO por laminarina, muestran una reducción importante en la actividad de la FO en plasma (43, 59, 67, 51%, respectivamente) y en SLH (52, 53, 54, 58%, respectivamente). La incubación de las muestras con el cóctel, antes de la incubación con laminarina, redujo la actividad FO en un máximo de 57%. El aumento de la actividad de FO en los tratamientos con respecto al control fue significativo ( $P < 0.05$ ) en el plasma de las 4 especies probadas y solamente en el lisado de hemocitos de *N. subnodosus*. Los resultados demuestran que los adultos de las especies probadas tienen el sistema proFO y éste actúa como un mecanismo de defensa.

## *Péptidos antimicrobianos*

Para el estudio de los péptidos antimicrobianos se seleccionó a la almeja catarina *A. ventricosus* como. El proceso de purificación se realizó por cromatografía de fase reversa. La matriz que se utilizó fue C18. La actividad de las fracciones se midió con el método de lisado en placa donde se relacionó el halo de inhibición con la concentración de proteína. Los resultados muestran que las fracciones de 5 y 50% de acetonitrilo (ACN) del paso 1 del proceso de purificación tienen actividad positiva contra *V. alginolyticus* 138-2 (**Figuras 1 y 2, Anexo III**). En el paso 2, se seleccionó la fracción del 50% de ACN del paso 1, la cual dio como resultado 5 fracciones con actividad antibacteriana (**Figura 3, Anexo III**). En el paso 3, se seleccionó la fracción 2 del paso 2, dando como resultado una fracción con actividad positiva (**Figura 4, Anexo III**). En el paso 4 se cargó la fracción del paso 3, se obtuvieron 2 fracciones, una de las cuales presentó actividad (**Figura 5, Anexo III**). Aunque el pico obtenido parecía ser una sola molécula, se probó su pureza utilizando electroforesis en gel de acrilamida-DSS (gradiente 10-20%) y búfer de tricina. El resultado fue el aislamiento de 2 bandas de 3.5 y 3.6 kDa. El peso molecular de estas bandas es muy similar al de los péptidos antimicrobianos encontrados en los mejillones *M. edulis* (Charlet et al., 1996) y *M. galloprovincialis* (Hubert et al., 1996; Mitta et al., 1999a). La actividad antibacteriana que presenta la hemolinfa de *A. ventricosus*, sugiere la presencia de algunos péptidos que posiblemente estén contribuyendo en la defensa interna de esta especie, tal y como sucede en plantas, invertebrados y vertebrados.

## *Enzimas hidrolíticas*

Las enzimas se estudiaron utilizando el kit comercial con 19 diferentes substratos para la detección de actividad de hidrolítica (proteasas, glucosidasas, lipasas, fosfatasas y esterases) (API ZYM; BioMérieux), que es un método colorimétrico. Para la determinación de la actividad tipo lisozima se utilizó la técnica de lisado en placa. El substrato que se utilizó fue la bacteria *Micrococcus luteus* muerta en gel de agarosa. La especie de bivalvo que se empleó como modelo fue *C. gigas*.

En este trabajo se encontró actividad de enzimas hidrolíticas en ovocitos, larvas, juveniles y adultos de *C. gigas*. Los niveles más altos de actividad fueron encontrados en hemocitos y corresponden a la leucil arilamidasa, esterasa (C1) y naftol fosfohidrolasa (**Tabla 1, Anexo IV**). Existen diferencias significativas ( $P= 0.001$ ) en los niveles de actividad enzimática entre edades, aunque no existe un patrón claro de variación relacionado con la edad. La lipasa esterasa (C8), lipasa (C14),  $\alpha$ -galactosidasa,  $\beta$ -glucosidasa y  $\alpha$ -manosidasa no fueron encontradas en ovocitos. Tripsina,  $\alpha$ -quimiotripsina y  $\beta$ -glucosidasa están ausentes en las larvas de 20 h de edad. Lipasa (C14), tripsina y  $\alpha$ -quimiotripsina no fueron encontradas en larvas de 3 días de edad. Se encontraron 18 enzimas en larvas de 7, 11 y 15 días de edad con excepción de la lipasa (C14). Tripsina,  $\alpha$ -quimiotripsina y  $\beta$ -galactosidasa no están presentes en juveniles. Las enzimas que no se encontraron en plasma son lipasa (C14), tripsina,  $\alpha$ -quimiotripsina,  $\alpha$ -galactosidasa,  $\alpha$ -galactosidasa,  $\beta$ -glucuronidasa,  $\alpha$ -glucosidasa, N-acetil- $\beta$ -glucosaminidasa,  $\alpha$ -manosidasa y  $\alpha$ -fucosidasa. En hemocitos, las enzimas que no se encontraron fueron tripsina,  $\alpha$ -quimiotripsina,  $\alpha$ -galactosidasa,  $\alpha$ -galactosidasa,  $\alpha$ -glucosidasa, y  $\beta$ -glucosidasa. El análisis de varianza mostró diferencias significativas ( $P= 0.011$ ) en la actividad enzimática entre el plasma y hemocitos. La presencia de actividad enzimática en el plasma puede estar relacionada con la degranulación de la célula como respuesta a la presencia de un patógeno en el plasma.

En el ensayo de lisado en placa para demostrar la actividad tipo lisozima en las muestras de *C. gigas* se encontraron diferencias significativas ( $P= 0.001$ ) en la actividad tipo lisozima entre edades. La **Tabla 1 del Anexo IV** muestra que la actividad de la enzima se incrementó de 0 U/mg de proteína en ovocitos a 514 U/mg de proteína en larvas de 3 días de edad y posteriormente se observa una caída en la actividad a aproximadamente 200 U/mg de proteína en larvas de 7, 11 y 15 días de edad. En juveniles la actividad fue de 3132 U/mg de proteína, la cual es 48 veces mayor que en larvas de 20 h de edad y 6 veces mayor con respecto a larvas de 3 días de edad. En plasma y hemocitos de adultos, la actividad tipo lisozima fue de 1276 y 6410 U/mg de proteína respectivamente, existiendo diferencias significativas ( $P= 0.002$ ) entre los niveles de actividad del plasma y hemocitos. La lisozima de huevo de gallina que se utilizó como control presentó una actividad de 18,000 U/mg de proteína. La actividad enzimática hidrolítica encontrada en este trabajo demuestra que los bivalvos poseen un importante mecanismo de defensa contra partículas extrañas desde estadios tempranos de su ciclo de vida (**Fig. 5**).

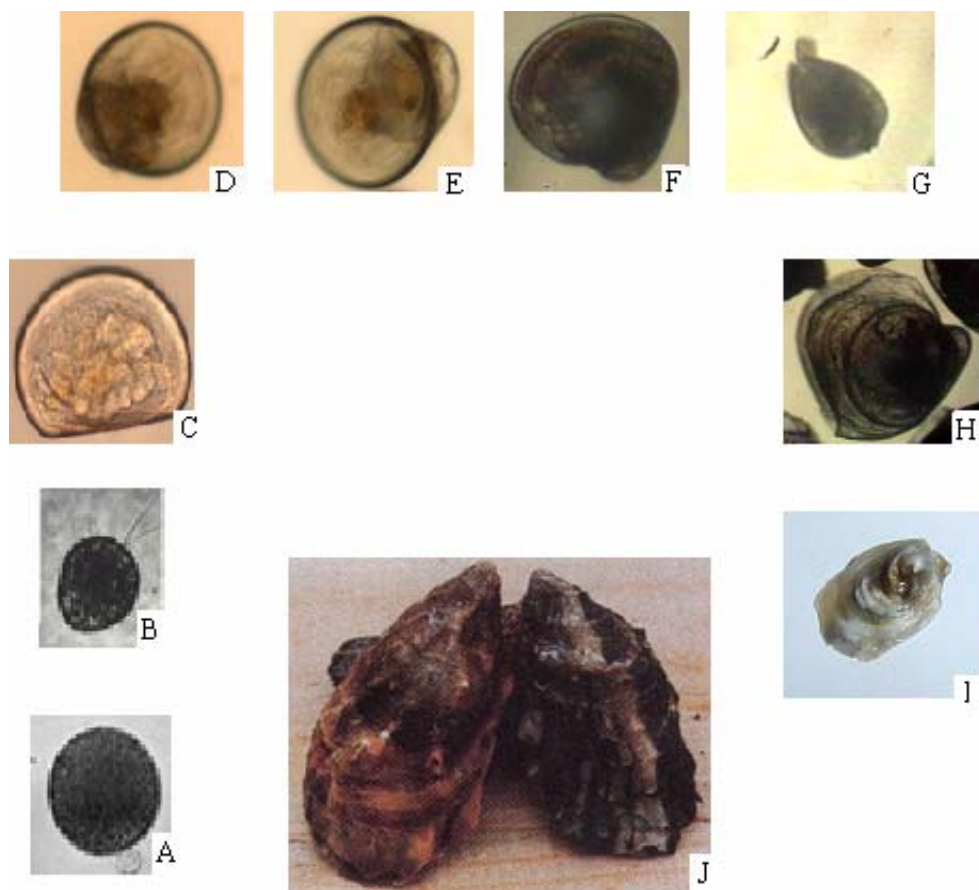


Figura 5. Número de actividades enzimáticas (proteasas, glucosidasas, fosfatasas, lipasas y esterases) en diferentes estadios del ciclo de vida de *Crassostrea gigas*. A= ovocito (14). B= larva trocófora de 20 h (17). C= larva veliger de 3 d (17). D= larva veliger de 7 d (19). E= larva veliger de 11 d (19). F= larva veliger de 15 d (19). G= larva pediveliger premetamórfica de 16 a 18 d. H= juvenil de 23 d. I= juvenil de 35 d (17). J= adulto: plasma (11) y hemocitos (15).

## DISCUSIÓN

Existen muchas especies de moluscos bivalvos en el Pacífico mexicano que tienen importancia comercial y que podrían ser cultivadas (Baqueiro, 1984). Algunas de estas especies como *A. ventricosus*, *N. subnodosus*, *A. maura*, *M. squalida*, *Pinctada mazatlanica* y *Pteria sterna* son objeto de estudios en varias instituciones del noroeste de México encaminados a lograr su cultivo comercial. Sin embargo, como ocurre en otras partes del mundo, la producción de semillas en el laboratorio no es fácil ya que existen problemas que se originan de la alta susceptibilidad de las larvas a ataques bacterianos, especialmente del género *Vibrio* (Tubiash et al., 1965; Elston y Leibovitz, 1980; Lodeiros et al., 1992; Freitas et al., 1993; Riquelme et al. 1996; Sugumar et al., 1998; Lambert et al., 1998). Esta susceptibilidad disminuye después de la metamorfosis, de manera que los juveniles y adultos son más resistentes a los ataques bacterianos (Sinderman, 1990; Lane y Birkbeck, 2000), lo cual indica que ocurre un proceso de maduración del sistema inmune durante la ontogenia de estos organismos (Bachère et al., 1995).

En los cultivos larvarios de *C. gigas*, *A. ventricosus*, *N. subnodosus* y *A. maura* se ha observado a lo largo de varios años que las larvas tienen mayor susceptibilidad al ataque de bacterias en comparación con los juveniles y los adultos. También se ha observado que de las cuatro especies, las larvas de *C. gigas* son menos susceptibles lo que implica un mayor éxito en la producción de juveniles. Los primeros esfuerzos de este trabajo se enfocaron al estudio de la susceptibilidad de larvas veliger de 7 días de edad de las especies mencionadas para corroborar las afirmaciones anteriores. En un estudio preliminar se seleccionó a la cepa *V. alginolyticus* cepa APSA2 de entre varias cepas de vibrios como la más virulenta y se utilizó para determinar la susceptibilidad en larvas de los bivalvos mencionados. Los resultados mostraron que las larvas de las 4 especies son susceptibles al ataque de *V. alginolyticus* cepa APSA2. Sin embargo, Las larvas de las dos especies de pectínidos y del callo de hacha fueron más susceptibles a *V. alginolyticus* que las larvas de la ostra. Resultados similares fueron obtenidos por Tubiash et al. (1965), quienes retaron larvas de diferentes bivalvos con un mismo vibrio.

En su estudio, los signos de la enfermedad se observaron en las larvas de todas las especies en las primeras 5 h después del reto con la bacteria. Después de 7 h, el 50% de las larvas de *P. maximus* estaban muertas, mientras que en el resto de las especies (*M. mercenaria*, *O. edulis* y *Teredo novalis*) la mortalidad fue menor al 25%. Diferencias en la susceptibilidad se han reportado también en moluscos adultos. Un ejemplo es el estudio de Burreson y Ragone-Calvo (1996) en donde se observó que *C. virginica* es susceptible a *Perkinsus marinus*, mientras que *C. gigas* no lo es. Por otro lado, *O. edulis* es susceptible a *Bonamia ostreae*, mientras que *C. gigas* es más resistente. Aunque en este trabajo no se abordó el estudio de los mecanismos de infección de los vibrios en moluscos, es importante mencionar el trabajo de Nottage et al. (1989) en el que encontraron que las toxinas y proteasas juegan un papel importante en la vibriosis o necrosis bacilar en los cultivos de larvas de moluscos bivalvos. En su trabajo demostraron que 17 de 20 *Vibrio* sp. que son patógenos para peces o que han sido aisladas de moluscos enfermos producen toxinas ciliostáticas y proteasas. Dentro de los 20 *Vibrio* sp. se incluyen *V. tubiashi*, *V. anguillarum* y *V. alginolyticus*. De 53 vibrios y aeromonas aislados, no asociados con infecciones en bivalvos, solamente 15 produjeron una toxina ciliostática. Otros investigadores como Nicolas et al. (1996) mencionan que los mecanismos de infección de los vibrios pueden ser una combinación de invasión y toxicidad. Por arriba de cierta concentración en el tracto digestivo de las larvas, los vibrios lisados por enzimas digestivas podrían liberar grandes cantidades de toxinas (endotoxinas ciliostáticas, proteasas, exotoxinas), las cuales podrían parar el tránsito digestivo e iniciar la degradación de tejidos. El crecimiento subsiguiente de vibrios podría reforzar el ataque hasta que todos los tejidos hayan sido invadidos.

En las condiciones en las que se realizó el experimento en este trabajo, las larvas de las 4 especies resultaron ser susceptibles al ataque de *V. alginolyticus* cepa APSA2. Sin embargo, las larvas de *C. gigas* son menos susceptibles que las de *A. ventricosus*, *N. subnodosus* y *A. maura*.

Como se mencionó anteriormente, en este trabajo no se abordó el estudio de los mecanismos de infección de *V. alginolyticus* cepa APSA2, pero sí algunos mecanismos de defensa de bivalvos (sistema proFO, péptidos antimicrobianos y enzimas hidrolíticas) que podrían explicar las diferencias en la susceptibilidad entre los diferentes estadios de su ciclo de vida.

En el presente trabajo no se encontró actividad de la FO en el homogenizado de larvas de *C. gigas*, *A. ventricosus* y *N. subnodosus*. Sin embargo, Dyrinda et al. (1995) reportaron actividad de la FO en las células disgregadas de larvas trocófora y veliger de *M. edulis*, usando una técnica de tinción citoquímica. No existe explicación a estas discrepancias y sería conveniente contrastar ambos métodos.

La actividad de la FO en juveniles de *A. ventricosus* fue nula, pero fue positiva en juveniles de *C. gigas* y *N. subnodosus*. Los activadores probados (tripsina, laminarina,  $\alpha$ -quimiotripsina, LPS y DSS) no aumentaron su actividad y por lo tanto, el papel de la enzima como parte del sistema proFO en juveniles de estas dos especies no está claro.

En moluscos adultos, se sabe que la FO tiene un importante papel en el crecimiento y reparación de la concha (Waite y Wilbur 1976; Jones y Saleuddin, 1978) y como parte del sistema de defensa (Asokan et al., 1997). En el presente estudio la actividad de la FO fue positiva en el plasma y en el lisado de hemocitos *C. gigas*, *A. ventricosus*, *N. subnodosus* y *A. maura*. La incubación de las muestras con los activadores aumentó la actividad de la FO en todas las muestras lo que sugiere la presencia del sistema proFO y su posible función como mecanismo de defensa en estas especies como lo sugiere Asokan et al. (1997) para *P. viridis*. En este mejillón, la actividad de la FO fue inducida por tripsina así como por LPS y  $\beta$ -1, 3-glucanos. En otras especies de bivalvos, como *M. edulis*, la preincubación de las células con el sobrenadante de zimosan al 0.025% produjo un incremento de la FO en un orden de magnitud de diez (Coles y Pipe, 1994) y en el molusco gasterópodo *Biomphalaria glabrata* la actividad de la proFO fue inducida por tripsina (De Aragao y Bacila, 1976). En muchos insectos, crustáceos y en *P. viridis*, la activación del sistema proFO por moléculas no propias es susceptible de inhibición por inhibidores de proteasas (Leonard et al., 1985; Aspan y Söderhäll, 1991; Lanz et al., 1993; Asokan et al., 1997).



En este trabajo, la activación del sistema proFO por la laminarina fue suprimida de manera importante por el cóctel de inhibidores de proteasas P-2714 en el plasma y en lisado de hemocitos de las 4 especies estudiadas. El presente estudio establece que la FO está presente en juveniles de *C. gigas* y *N. subnodosus* y que su actividad puede ser incrementada por las moléculas activadoras probadas en adultos de las 4 especies, lo que sugiere que el sistema proFO puede tener un papel como mecanismo de defensa.

Las bacterias Gram (-) usadas comúnmente para probar la actividad de inicio en los procesos de purificación de péptidos en moluscos, crustáceos y peces son *Escherichia coli* D31 y D22 (Charlet et al., 1996; Cole et al., 1997; Relf et al., 1999). En este trabajo se encontró que *V. alginolyticus* 138-2 es sensible a la actividad bactericida de la hemolinfa de la almeja catarina *A. ventricosus*. Este resultado es importante ya que los miembros de este género de bacterias son los principales causantes de mortalidades masivas en los cultivos de larvas de moluscos bivalvos (Tubiash et al., 1965; Elston, 1984; Sindermann, 1990; Sugumar et al., 1998; Sainz et al., 1999; Lane y Birkbeck, 2000). La hemolinfa de *A. ventricosus* tiene 5 fracciones con actividad antimicrobiana lo que sugiere que posee varios péptidos antimicrobianos. Los resultados obtenidos establecen por primera vez que la hemolinfa de la almeja catarina presenta actividad antimicrobiana de manera similar a la encontrada en otros bivalvos como *M. edulis* y *M. galloprovincialis* (Charlet et al., 1996; Mitta et al., 1999a,b; Mitta et al., 2000b) y que la bacteria *V. alginolyticus* 138-2 puede ser usada como bacteria de prueba durante el proceso de purificación de péptidos antimicrobianos

El sobrenadante del lisado de ovocitos de *C. gigas* presenta actividad en 14 de los 19 substratos contenidos en la prueba de API ZYM. Sin embargo, no se encontró actividad tipo lisozima. Estas enzimas pueden tener una importante función como mecanismo de defensa ya que el desove y la fertilización externa en *C. gigas*, implican que tanto los ovocitos como los espermatozoides sean descargados en el medio acuático circundante donde pueden ser fuente de alimento para muchos organismos, incluyendo las bacterias. En otros invertebrados, la actividad antimicrobiana tipo lisozima se ha encontrado en la cubierta gelatinosa de los huevos del equinodermo *Paracentrotus lividus* (Canicatti, 1990) y en los huevos de *Marthasterias glacialis* (Stabili et al., 1994).

En el homogenizado de larvas y juveniles, el origen de las enzimas hidrolíticas se desconoce. Sin embargo, la actividad de las enzimas encontradas en la hemolinfa de los adultos están presentes en larvas y juveniles. Enzimas como tripsina,  $\alpha$ -quimiotripsina,  $\alpha$ -galactosidasa y  $\alpha$ -glucosidasa se encontraron en algunos estadios larvarios pero no en la hemolinfa de adultos. Las enzimas mencionadas podrían tener su origen en la glándula digestiva y estar más relacionadas con la digestión. En este trabajo, el homogenizado de larvas y juveniles de *C. gigas* tienen actividad de enzimas hidrolíticas importantes (lisozima, fosfatasa ácida, esterasa y  $\beta$ -glucoronidasa) que han sido usadas para definir la función de los hemocitos, en diferentes especies de bivalvos (Cheng et al., 1975; Cheng y Downs, 1988; Chu y La Peyre, 1989; Carballal et al., 1997b; López et al., 1997b; Xue y Renault, 2000). Estas enzimas no fueron encontradas por Dyrzynda et al. (1995) en células disgregadas de larvas trocófora y veliger de *M. edulis* usando un método de tinción citoquímica. En el presente trabajo, la actividad tipo lisozima se encontró en larvas trocófora y veliger, y en juveniles. La actividad se incrementó marcadamente en las larvas entre 20 h y 3 días de edad, donde la actividad enzimática fue mayor (casi el doble) que en las larvas de 7, 11 y 15 días de edad. Se ignora por qué las larvas de 3 días tienen mayor actividad enzimática tipo lisozima que las larvas más grandes. Sin embargo, esto puede deberse al desarrollo de mecanismos de defensa adicionales en los estadios larvarios tardíos como se ha sugerido para *P. lividus* por Stabili et al. (1994).

Posiblemente, en las larvas de *C. gigas* de 20 h de edad, la enzima podría ser producida *de novo* por el tejido embrionario de las larvas trocófora debido a que no se encontró actividad en los ovocitos. En *M. galloprovincialis*, Mitta et al. (2000a) encontraron que la síntesis del péptido antimicrobiano mytilina ocurre durante el proceso de metamorfosis larvaria y que el péptido defensina se sintetiza cuando la metamorfosis se ha completado. Estos autores sugieren que las larvas de los bivalvos no son totalmente competentes para combatir las infecciones y que la maduración del sistema inmune ocurre durante la metamorfosis.

Los adultos de *C. gigas* tienen una importante actividad enzimática tanto en el plasma como en el sobrenadante del lisado de hemocitos. Sin embargo, el número y el nivel de actividad de las enzimas fueron mayores en los hemocitos (15 actividades enzimáticas) que en el plasma (11 actividades enzimáticas). Cheng (1983, 1992) propuso que *C. virginica* puede liberar las enzimas por degranulación. Sin embargo, en el presente trabajo, la actividad de la lipasa (C14),  $\beta$ -glucoronidasa, N-acetil- $\beta$ -glucoronidasa,  $\alpha$ -manosidasa y  $\alpha$ -fucosidasa observada en hemocitos no fue detectada en plasma. Estos resultados son similares a los encontrados por Xue y Renault (2000) también en *C. gigas*, quienes sugieren que las enzimas son liberadas de los hemocitos de manera selectiva. En contraste,  $\beta$ -glucosidasa fue encontrada en plasma pero no en los hemocitos. De manera similar, Xue y Renault (2000), encontraron en *C. gigas* que  $\alpha$ -glucosidasa estaba presente en plasma más no así en hemocitos y sugirieron que algunas enzimas presentes en el plasma tienen un origen diferente a los hemocitos. El nivel de actividad tipo lisozima en hemocitos es cinco veces mayor que en el plasma en *C. gigas*.

Esto concuerda con las observaciones de Cheng et al., (1975) en *M. mercenaria*, Cheng (1978) en *B. glabrata*, Carballal et al. (1997b) en *M. galloprovincialis* y López et al. (1997b) en *R. decussatus*. En contraste, *C. virginica* (Rodrick y Cheng, 1974) y *M. arenaria* (Rodrick, 1975) mostraron niveles de lisozima mayores en plasma que en hemocitos. Al respecto, López et al. (1997b) sugieren que la lisozima es producida en los hemocitos y es liberada al plasma cuando es necesaria durante diferentes estados fisiológicos y patológicos de los moluscos. Según Cheng (1981, 1983) dentro de los hemocitos, la degradación enzimática es uno de los dos procesos básicos relacionados con la destrucción de partículas extrañas después de la fagocitosis. En el plasma, estas enzimas pueden modificar la conformación molecular de la superficie de los patógenos lo que favorece el reconocimiento de los mismos. La actividad enzimática hidrolítica encontrada en este trabajo sugiere la posibilidad de que los bivalvos poseen al menos un importante mecanismo de defensa contra partículas extrañas desde estadios tempranos de su ciclo de vida (**Fig. 5**).

## CONCLUSIONES

En las condiciones en las que se realizó el experimento, las larvas de las 4 especies resultaron ser susceptibles al ataque de *V. alginolyticus* cepa APSA2. Sin embargo, las larvas de *C. gigas* son menos susceptibles que las de *A. ventricosus*, *N. subnodosus* y *A. maura*.

Las larvas de 7 días de edad de las especies de bivalvos estudiadas no cuentan con el sistema profenoloxidasa presente en adultos. Sin embargo, es posible que las larvas e incluso los ovocitos cuenten con una gran actividad de enzimas hidrolíticas como mecanismo de defensa, tal y como se comprobó en *C. gigas*, en donde existe un importante número de actividades hidrolíticas (proteasas, glucosidasas, fosfatasas, esterases y lipasas) en ovocito (14 actividades), larva trocófora de 20 h (17 actividades), larva veliger de 3 d (17 actividades), larva veliger de 7 d (19 actividades), larva veliger de 11 d (19 actividades) y larva veliger de 15 d (19 actividades).

Los juveniles de las especies de moluscos estudiadas cuentan con la enzima fenoloxidasa, pero su papel como mecanismo de defensa no está confirmado. Al igual que en los estadios larvarios, posiblemente cuenten con una importante actividad de enzimas hidrolíticas con un nivel de actividad mayor que en larvas, tal y como ocurre en los juveniles de *C. gigas*, en donde existe actividad positiva en 17 substratos, pero con niveles de actividad mucho mayores que en ovocitos y larvas. Esto podría explicar parcialmente la menor susceptibilidad a ataques bacterianos de los juveniles en comparación con las larvas.

Los adultos de las cuatro especies estudiadas cuentan con el sistema profenoloxidasa funcional que responde a componentes de la pared celular de microorganismos como bacterias y hongos. Además, cuentan con una posible actividad de enzimas hidrolíticas como se observó en *C. gigas*. La actividad enzimática positiva observada en los hemocitos (15 actividades) de esta especie es mayor en número y nivel de actividad que en plasma (11 actividades). Por último, las especies estudiadas posiblemente tengan actividad de péptidos antimicrobianos similar a la encontrada en la hemolinfa de *A. ventricosus*, en donde se obtuvieron 5 fracciones con actividad antimicrobiana. Los mecanismos de defensa encontrados en adultos son responsables en gran medida de su capacidad defensiva y les confieren mayores posibilidades contra ataques bacterianos, en comparación con los que poseen en estadios más tempranos de su ciclo de vida.

## PERSPECTIVAS

En la presente tesis se generó una importante contribución al conocimiento sobre los mecanismos de defensa de larvas, juveniles y adultos de los moluscos bivalvos. Sin embargo, es importante reconocer que se requiere diseñar otros experimentos que analicen con mayor detalle los componentes del sistema inmune abordados. Se sugiere la realización de los siguientes experimentos tomando como modelo la almeja catarina *A. ventricosus*:

1. Realizar una electrofóresis en gel de poliacrilamida de la hemolinfa. Cortar la banda donde se encuentre la proFO y obtener anticuerpos policlonales para utilizarlos en estudios de inmunocitoquímica en cortes histológicos de larvas, juveniles y adultos. Con este experimento se puede determinar la presencia y localización de la proFO.
2. Purificar un péptido antimicrobiano de la hemolinfa. Obtener anticuerpos policlonales para realizar estudios de inmunocitoquímica en cortes histológicos de larvas, juveniles y adultos. Con este estudio se determinaría la presencia y localización del péptido.
3. Purificar la enzima lisozima de hemocitos. Obtener anticuerpos policlonales con la lisozima y realizar estudios de inmunocitoquímica en cortes histológicos de larvas, juveniles y adultos. Con este estudio se puede determinar la presencia de la lisozima y su localización.
4. Utilizar técnicas moleculares como herramienta es muy útil ya que a partir de las secuencia de aminoácidos de las moléculas purificadas se pueden elaborar oligos específicos para la amplificación de dichas moléculas a partir de ARNm. Los segmentos amplificados por PCR pueden ser clonados en un vector comercial y secuenciados. También es posible elaborar sondas marcadas a partir de los fragmentos amplificados por PCR, con los que se puede medir los niveles de expresión de genes en el ARNm de *A. ventricosus* cuando es retado su sistema inmune con microorganismos o componentes de los mismos.

## REFERENCIAS

- Adema, C.M.; W.P.M. van der Knapp & T. Sminia. 1991. Molluscan haemocyte-mediated cytotoxicity: the role of reactive oxygen intermediates. *Rev. Aquat. Sci.* 4: 210-223.
- Allam, B. & C. Paillard. 1998. Defense factors in clam extrapallial fluids. *Dis. Aquat. Org.* 33: 123-128.
- Anderson, R.S. 1994. Hemocyte-derived reactive oxygen intermediate production in four bivalve mollusks. *Dev. Comp. Immunol.* 18: 89-96.
- Anderson, R.S. 1999. *Perkinsus marinus* secretory products modulate superoxide anion production by oyster (*Crassostrea virginica*) haemocytes. *Fish Shellfish Immunol.* 9: 51-60.
- Arason, G.J. 1996. Lectins as defence molecules in vertebrates and invertebrates. *Fish Shellfish Immunol.* 6: 277-289.
- Arumugam, M.; B. Romestand; J. Torreilles & P. Roch. 2000. *In vitro* production of superoxide and nitricoxide (as nitrite and nitrate) by *Mytilus galloprovincialis* haemocytes upon incubation with PMA or laminarin or during yeast phagocytosis. *Eur. J. Cell Biol.* 79: 513-519.
- Ascencio, F. & J.L. Ochoa. 1985. Marine invertebrate agglutinins: the lectin from *Megapitaria squalida* clam. *Lectins* 4: 410-414.
- Asokan, R.; H. Arumugan & P. Nullainadhan. 1997. Activation of prophenoloxidase in the plasma and hemocytes of the marine mussel, *Perna viridis* Linnaeus. *Dev. Comp. Immunol.* 21: 1-12.
- Aspán, A. & K. Söderhäll. 1991. Purification of prophenoloxidase from crayfish blood cells, and its activation by an endogenous serine proteinase. *Insect Biochem.* 21: 363-373.
- Auffret, M. 1988. Bivalve hemocyte morphology. *Am. Fisher. Soc. Spec. Publ.* 18: 169-177.
- Austin, B.; D. Bucke; S.W. Feist & M.M. Helm. 1988. Disease problems among cultured bivalve larvae. Ministry of agriculture, fisheries and food, directorate of fisheries research, internal report No. 16, Lowestoft.



- Austin, K.A. & K. Paynter. 1995. Characterization of the chemiluminescence measured in hemocytes of the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. *J. Exp. Zool.* 273: 461-471.
- Bachère, E.; D. Chagot & H. Grizel. 1988. Separation of *Crassostrea gigas* hemocytes by density gradient centrifugation and counterflow centrifugal elutriation. *Dev. Comp. Immunol.* 12: 549-559.
- Bachère, E.; D. Hervio & E. Mialhe. 1991. Luminol-dependent chemiluminescence by hemocytes of marine bivalves, *Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas*. *Dis. Aquat. Org.* 11: 173-180.
- Bachère, E.; E. Mialhe; D. Noël; V. Boulo; A. Morvan & J. Rodríguez. 1995. Knowledge and research prospects in marine mollusc and crustacean immunology. *Aquaculture* 132: 17-32.
- Baqueiro, C.E. 1984. Status of molluscan aquaculture on the Pacific Coast of Mexico. *Aquaculture* 39: 83-93.
- Barracco, M.A.; I.D. Medeiros & F.M. Moreira. 1999. Some haemato-immunological parameters in the mussel *Perna perna*. *Fish Shellfish Immunol.* 9: 387-404.
- Beckmann, N.; M.P. Morse & C.M. Moore. 1992. Comparative study of phagocytosis in normal and diseased hemocytes of the bivalve *Mya arenaria*. *J. Invertebr. Pathol.* 59: 124-132.
- Belogortseva, N.I.; V.I. Molchanova, A.V. Kurika; A.S. Skobun & V.E. Glazkova. 1998. Isolation and characterization of new GalNac/Gal-specific lectin from the sea mussel *Crenomytilus grayanus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 119C: 45-50.
- Benninger, P.G. & M. Le Pennec. 1991. Fundamental anatomy of scallops. En: S.E. Shumway (ed.). *Scallops: Biology, Ecology and Aquaculture*. Elsevier Science, New York. pp. 133-224.
- Borrego, J.J.; D. Castro; A. Luque; C. Paillard; P. Maes; M.T. García & A. Ventosa. 1996. *Vibrio tapetis* sp. nov., the causative agent of the brown ring disease affecting cultured clams. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46: 480-484.

- Broekaert, W.F.; F.R. Terras; B.P. Cammue; R.W. Osborn. 1995. Plant defensins: novel antimicrobial peptides as components of the host defense system. *Plant. Physiol.* 108: 1353-1358.
- Bower, S.M.; J. Blackburn & G.R. Meyer. 1998. Distribution, prevalence and pathogenicity of the protozoan *Perkinsus qugwadi* in Japanese scallops, *Patinopecten yessoensis*, cultured in British Columbia, Canada. *Can. J. Zool.* 76: 954-959.
- Burreson, E.M. & L.M. Ragone-Calvo. 1996. Epizootiology of *Perkinsus marinus* disease of oysters in Chesapeake Bay, with emphasis on data since 1985. *J. Shellfish Res.* 15: 17-34.
- Cajaraville, M.P. & S.G. Pal. 1995. Morphofunctional study of the haemocytes of the bivalve mollusc *Mytilus galloprovincialis* with emphasis on the endolysosomal compartment. *Cell Struct. Funct.* 20: 355-367.
- Canicatti, C. 1990. Distribution d'une activite lysozymiale dans un echinoderme holothuroide, *Holothuria polii*, et dans les oeufs et les larves d'un echinoderme echinoide, *Paracentrotus lividus*. *Eur. Arch. Biol.* 101: 309-318.
- Carballal, M.J.; M.C. López; C. Azevedo & A. Villalba. 1997a. Hemolymph cell types of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Dis. Aquat. Org.* 29: 127-135.
- Carballal, M.J.; M.C. López; C. Azevedo & A. Villalba. 1997b. Enzymes involved in defense functions of hemocytes of mussel *Mytilus galloprovincialis*. *J. Invert. Pathol.* 70: 96-105.
- Charlet, M.; S. Chernysh; H. Philippe; C. Hétru; J. Hoffmann & P. Bulet. 1996. Innate immunity, isolation of several cysteine-rich antimicrobial peptides from the blood of mollusc, *Mytilus edulis*. *J. Biol. Chem.* 271: 21808-21813.
- Cheng, T.C. G.E. Rodrick; D.A. Foley & S.A. Koehler. 1975. Release of lysozyme from hemolymph cells of *Mercenaria mercenaria* during phagocytosis. *J. Invertebr. Pathol.* 25: 261-265.
- Cheng, T.C. 1975. Functional morphology and biochemistry of molluscan phagocytes. *Ann. New York Acad. Sci.* 266: 343-379.

- Cheng, T.C. 1978. The role of lysosomal hydrolases in molluscan cellular responses to immunologic challenge. *Comp. Pathobiol.* 4: 59-71.
- Cheng, T.C. 1981. Bivalves. En: N.A. Ratcliffe & A.F. Rowley (eds.). *Invertebrate Blood Cells*. Academic Press, London. pp. 233-300.
- Cheng, T.C. & K.H. Howland. 1982a. Chemotactic attraction between hemocytes of the oyster, *Crassostrea virginica*, and bacteria. *J. Invertebr. Pathol.* 33: 204-210.
- Cheng, T.C. & K.H. Howland. 1982b. Effects of colchicine and cytochalasin B on chemotaxis of oyster (*Crassostrea virginica*) hemocytes. *J. Invertebr. Pathol.* 40: 150-152.
- Cheng, T.C. 1983. The role of lysosomes in molluscan inflammation. *Am. Zool.* 23: 129-144.
- Cheng, T. C. & J.C. Downs. 1988. Intracellular acid phosphatase and lysozyme levels in sub-populations of oyster *Crassostrea virginica* hemocytes. *J. Invertebr. Pathol.* 52: 163-167.
- Cheng, T.C. 1992. Selective induction of release of hydrolases from *Crassostrea virginica* hemocytes by certain bacteria. *J. Invert. Pathol.* 59: 197-200.
- Chu, F.L.E. & G.F. La Peyre. 1989. Effect of environmental factors and parasitism on hemolymph lysozyme and protein of American oysters (*Crassostrea virginica*). *J. Invertebr. Pathol.* 54: 224-232.
- Coles, J.A. & R.K. Pipe. 1994. Phenoloxidase activity in the haemolymph and haemocytes of the marine mussel *Mytilus edulis*. *Fish Shellfish Immunol.* 4: 337-352.
- Cole, A.M.; P. Weis & G. Diamond. 1997. Isolation and characterization of pleurocidin, an antimicrobial peptide in the skin secretions of winter flounder. *J. Biol. Chem.* 272: 12008-12013.
- Dam, T.K.; M. Sarkar; J. Ghosal & A. Choudhury. 1993. Purification and partial characterization of a N-glycolylneuraminic acid specific lectin from the clam *Anadara granosa* (L.). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 196: 422-429.

- Dam, T.K.; P. Bandyopadhyay; M. Sarkar; J. Ghosal; A. Bhattacharya & A. Choudhury. 1994. Purification and partial characterization of a heparin-binding lectin from the marine clam *Anadara granosa*. *Biochem. Biophys. Res. Commu.* 203: 36-45.
- De Aragao, G.A.; M. Bacila. 1976. Purification and properties of a polyphenoloxidase from the fresh water snail, *Biomphalaria glabrata*. *Comp. Biochem. Physiol.* 54: 179-182.
- Deaton, L.E.; P.J. Jordan & J.R. Dankert. 1999. Phenoloxidase activity in the hemolymph of bivalve mollusks. *J. Shellfish Res.* 18: 223-226.
- Dikkeboom, R.; C.J. Bayne; W.P.W. van der Knaap & J.M.G.H. Tijnagel. 1988. Possible role of reactive forms of oxygen in *in vitro* killing of *Schistosoma mansoni* sporocysts by hemocytes of *Lymnea stagnalis*. *Parasitol. Res.* 75: 148-154.
- Dyrynda, E. A.; R.K. Pipe & N.A. Ratcliffe. 1995. Host defence mechanisms in marine invertebrate larvae. *Fish Shellfish Immunol.* 5: 569-580.
- Dyrynda, E.A.; R.K. Pipe & N.A. Ratcliffe. 1997. Subpopulations of haemocytes in the adult and developing marine mussel, *Mytilus edulis*, identified by use of monoclonal antibodies. *Cell Tissue Res.* 289: 527-536.
- Elliot, W. & D.C. Elliot. 1997. Biochemistry and molecular biology. New York, Oxford University Press, Inc. pp. 209-210.
- Elston, R.A. 1980a. Functional anatomy, histology and ultrastructure of the soft tissues of the larval American oyster, *Crassostrea virginica*. *Proc. Nat. Shellfish Assoc.* 70: 65-93.
- Elston, R.A. 1980b. Functional morphology of the coelomocytes of the larval oysters *Crassostrea virginica* and *Crassostrea gigas*. *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.* 60: 947-957.
- Elston, R.A. & L. Leibovitz. 1980. Pathogenesis of experimental vibriosis in larval American oyster, *Crassostrea virginica*. *Can. J. Fish Aquat. Sci.* 37: 964-978.
- Elston, R.A. 1984. Prevention and management of infectious diseases in intensive mollusc husbandry. *J. World Mar. Soc.* 15: 284-300.
- FAO. 1999. Producción mundial de acuicultura por grupos de especies. [Http://www.fao.org/fi/statist/summtab/1999s.asp](http://www.fao.org/fi/statist/summtab/1999s.asp).

- Feng, S.Y. 1965. Pinocytosis of proteins by oyster leucocytes. *Biol. Bull.* 128: 95-105.
- Feng, S.Y. & W.J. Canzonier. 1970. Humoral responses in the American oyster (*Crassostrea virginica*) infected with *Bucephalus sp.* and *Minchinia nelsoni*. *Am. Fish. Soc. Spec. Publ.* 5: 497-510.
- Feng, S.Y. 1988. Cellular defence mechanisms of oysters and mussels. *Am. Fish. Soc. Spec. Publ.* 18: 153-158.
- Fisher, W.S. 1986. Structure and functions of oyster hemocytes. En: M. Breheling (ed.). *Immunity in invertebrates*. Spriger-Verlag, Berlin. pp. 25-35.
- Fisher, W.S. 1988. Environmental influence on bivalve hemocyte function. *Am. Fish. Soc. Spec. Publ.* 18: 225-237.
- Fisher, W.S. & A.R. DiNuzzo. 1991. Agglutination of bacteria and erythrocytes by serum from six species of marine molluscs. *J. Invertebr. Pathol.* 57: 380-394.
- Fisher, W.S.; L.M. Oliver & P. Edwards. 1996. Hematologic and serologic variability of eastern oysters from Apalachicola Bay, Florida. *J. Shellfish Res.* 15: 555-564.
- Foley, D.A. & T.C. Cheng. 1975. A quantitative study of phagocytosis by hemolymph cells of the pelecypods *Crassostrea virginica* and *Mercenaria mercenaria*. *J. Invertebr. Pathol.* 25: 189-197.
- Freites, L.; C. Lodeiros; A. Vélez & J. Bastardo. 1993. Vibriosis en larvas de la vieira tropical *Euvola (Pecten) ziczac* (L.). *Carib. J. Sci.* 29: 89-98.
- Friebel, B. & L. Renwranz. 1995. Application of density gradient centrifugation for separation of eosinophilic and basophilic hemocytes from *Mytilus edulis* and characterization of both cell groups. *Comp. Biochem. Physiol.* 112A: 81-90.
- Ganz, T. & R.I. Lehrer. 1998. Antimicrobial peptides of vertebrates. *Curr. Opin. Immunol.* 10: 41-44.
- Garland, C.D.; G.V. Nash; C.E. Sumner & T.A. McMeekin. 1983. Bacterial pathogens of oyster larvae (*Crassostrea gigas*) in a Tasmanian hatchery. *Aust. J. Mar. Freshwat. Res.* 34: 483-487.

- Gelder, S.R. & C.A. Moore. 1986. Cytochemical demonstration of several enzymes associated with phagosomal processing of foreign materials within hemocytes of *Mercenaria mercenaria*. *Trans. Am. Microsc. Soc.* 105: 51-58.
- Hancock, R.E.W. 1998. The therapeutic potential of cationic peptides. *Exp. Opin. Invest. Dis.* 7: 167-174.
- Hancock, R.E.W. & D.S. Chapple. 1999. Peptide antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43: 1317-1323.
- Hardy, S.W.; P.T. Grant & T.C.A. Fletcher. 1977. A haemagglutinin in the tissue fluid of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, with specificity for sialic acid residues in glycoproteins. *Experientia* 33: 767-768.
- Henry, M.; M. Auffret & E. Boucaud-Camou. 1990. Aspects ultrastructuraux et fonctionnels des hemocytes de quatre familles de Bivalves (Ostreidae, Veneridae, Mytilidae, Pectinidae). *Haliotis* 10: 195-196.
- Hine, P.M. & B. Wesney. 1994. The functional cytology of *Bonamia* sp. (Haplosporidia) infecting oysters *Triostrea chilensis*. *Dis. Aquat. Org.* 20: 219-229.
- Hine, P.M. 1999. The inter-relationships of bivalve haemocytes. *Fish Shellfish Immunol.* 9: 367-385.
- Hubert, F.; T. Noël & P. Roch. 1996. A member of the arthropod defensin family from edible Mediterranean mussels (*Mytilus galloprovincialis*). *Eur. J. Biochem.* 240: 302-306.
- Iwanaga, S.; S.I. Kawabata & T. Muta. 1998. New types of clotting factors and defense molecules found in horseshoe crab hemolymph: their structure and functions. *J. Biochem.* 123: 1-15.
- Johansson, M.W. & K. Söderhäll. 1989. Cellular immunity in crustaceans and the proPO system. *Parasitol. Today* 5: 171-176.
- Jones, G.M. & A.S.M. Saleuddin. 1978. Cellular mechanisms of periostracum formation in *Physa* spp. (Mollusca: pulmonata). *Can. J. Zool.* 56: 2299-2311.

- Kumazawa, N.H.; N. Morimoto; T. Tanigawa; Y. Tanaka; N. Kasagi; T. Kameie; K. Funaki & A. Iino. 1991. Morphology and activity of lysosomal enzymes in hemocytes of a brackish-water clam, *Corbicula japonica*. *Ven. Jap. J. Malacol.* 50: 211-217.
- Lambert, C.; J.L. Nicolas; V. Cilia & S. Corres. 1998. *Vibrio pectenecida* sp. Nov., a pathogen of scallop (*Pecten maximus*) larvae. *Int. J. Syst. Bact.* 48: 481-487.
- 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: 53-63.
- Lane, E. & T. C. Birkbeck. 2000. Species specificity of some bacterial pathogens of bivalve molluscs is correlated with their interaction with bivalve haemocytes. *J. Fish Dis.* 23: 275-279.
- Langdon, C.J. & R.I.E. Newell. 1996. Digestion and nutrition in larvae and adults. En . V. S. Kennedy, R. I. E. Newell & A. F. Eble (eds). *The eastern oyster Crassostrea virginica*. Maryland Sea Grant College. Maryland, USA. pp. 231-258.
- Lanz, H.; S. Hernández; E. Garrido-Guerrero; V. Tsutsumi & H. Aréchiga. 1993. Prophenoloxidase system activation in the crayfish *Procambarus clarki*. *Dev. Comp. Immunol.* 17N:399-406.
- LeGall, G.; E. Bachère & E. Mialhe. 1991. Chemiluminescence analysis of the activity of *Pecten maximus* hemocytes stimulated with zymosan and host-specific rickettsial-like organisms. *Dis. Aquat. Org.* 11: 181-186.
- Lehrer, R.I. & T. Ganz. 1999. Antimicrobial peptides in mammalian and insect host defence. *Curr. Opin. Immunol.* 11: 23-37.
- Leonard, C.; K.Söderhäll & N.A. 1985. Studies on prophenoloxidase and protease activity of *Blaberus craniifer* haemolymph. *Insect Biochem.* 15: 803-810.
- Lerch, K. 1988. Protein and active site structure of tyrosinase. En: J. T. Bagnara (ed.). *Advances in Pigment Cell Research*. A. R. Liss, New York. pp. 85-98.
- Lodeiros, C.; L. Freitas & A. Vélez. 1992. Necrosis bacillar en larvas del bivalvo *Euvola ziczac* (Linneo, 1758) causada por una *Pseudomonas* sp. *Acta Cient. Ven.* 43: 154-258.

- López, C.; M.J. Carballal; C. Azevedo & A. Villalba. 1997a. Morphological characterization of the hemocytes of the clam, *Ruditapes decussates* (Mollusca: Bivalvia). *J. Invertebr. Pathol.* 69: 51-57.
- López, C.; M.J. Carballal; C. Azevedo & A. Villalba. 1997b. Enzyme characterisation of the circulating haemocytes of the carpet shell clam, *Ruditapes decussatus* (Mollusca: Bivalvia). *Fish Shellfish Immunol.* 7: 595-608.
- McCormick-Ray, M.G. & T. Howard. 1991. Morphology and mobility of oyster hemocytes - evidence for seasonal – variations. *J. Invertebr. Pathol.* 58: 219-230.
- Mitta, G.; F. Vandenbulcke; F. Hubert & P. Roch. 1999a. Mussel defensins are synthesised and processed in granulocytes then released into the plasma after bacterial challenge. *J. Cell Sci.* 112: 4233-4242.
- Mitta, G.; F. Hubert; T. Noël & P. Roch. 1999b. Myticin, a novel cysteine-rich antimicrobial peptide isolated from hemocytes and plasma of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Eur. J. Biochem.* 264: 71-78.
- Mitta, G.; F. Vandenbulcke; F. Hubert; M. Salzet & P. Roch. 2000a. Involvement of mytilins in mussel antimicrobial defense. *J. Biol. Chem.* 275: 12954-12962.
- Mitta, G.; F. Vandenbulcke & P. Roch. 2000b. Original involvement of antimicrobial peptides in mussel innate immunity. *FEBS Lett.* 486: 185-190.
- Mitta, G.; F. Vandenbulcke; T. Noël; B. Romestand; J.C. Beauvillain; M. Salzet & P. Roch. 2000c. Differential distribution and defence involvement of antimicrobial peptides in mussel. *J. Cell Sci.* 113: 2759-2769.
- Mohandas, A.; T.C. Cheng & J.B. Cheng. 1985. Mechanism of lysosomal enzyme release from *Mercenaria mercenaria* granulocytes: a scanning electron microscope study. *J. Invertebr. Pathol.* 16: 189-197.
- Montes, J.F.; M. Durfort & J. Garcia-Valero. 1995a. Cellular defence mechanism of the clam *Tapes semidecussatus* against infection by the protozoan *Perkinsus* sp. *Cell Tissue Res.* 279: 529-538.



- Montes, J.F.; M. Durfort & J. Garcia-Valero. 1995b. Characterization and localization of an Mr225 kDa polypeptide specifically involved in the defence mechanisms of the clam *Tapes semidecussatus*. *Cell Tissue Res.* 280: 27-37.
- Montes, J.F.; M. Durfort & J. Garcia-Valero. 1996. When the venerid clam *Tapes decussates* is parasitized by the protozoan *Perkinsus sp.* it synthesizes a defensive polypeptide that is closely related to p225. *Dis. Aquat. Org.* 26: 149-157.
- Moore, C.A. & S.R. Gelder. 1985. Demonstration of lysosomal enzymes in hemocytes of *Mercenaria mercenaria* (Mollusca: Bivalvia). *Trans Am. Microsc. Soc.* 104: 242-249.
- Moore, C.A. & A.F. Eble. 1977. Cytochemical aspects of *Mercenaria mercenaria* haemocytes. *Biol. Bull.* 152: 105-119.
- Mortensen, S.H. & J. Glette. 1996. Phagocytic activity of scallop (*Pecten maximus*) haemocytes maintained *in vitro*. *Fish Shellfish Immunol.* 6: 111-121.
- Nakamura, M.; K. Mori; S. Inooka & T. Nomura. 1985. *In vitro* production of hydrogen peroxide by the amoebocytes of the scallop, *Patinopecten yessoensis* (Jay). *Dev. Comp. Immunol.* 9: 407-417.
- Nakayama, K.; A.M. Nomoto; M. Nishijima & T. Maruyama. 1997. Morphological and functional characterization of hemocytes in the giant clam *Tridacna crocea*. *J. Invertebr. Pathol.* 69: 105-111.
- Nakayama, K. & T. Maruyama. 1998. Differential production of active oxygen species in photo-symbiotic and non-symbiotic bivalves. *Dev. Comp. Immunol.* 22: 151-159.
- Nappi, A.J. & J. Seymour. 1991. Hemolymph phenoloxidase in *Drosophila melanogaster*, *Locusta migratoria* and *Austropotamobius pallipes*. *Biochem. Biophys. Res. Commu.* 180: 748-754.
- Nappi, A.J. & E. Vass. 1993. Melanogenesis and the generation of cytotoxic molecules during insect cellular immune-reactions. *Pigm. Cell Res.* 6: 117-126.
- Nappi, A.J. & E. Ottaviani. 2000. Cytotoxicity and cytotoxic molecules in invertebrates. *Bio Essays* 22: 469-480.

- Nicolas, J.L.; D. Ansquer & J.C. Cochard. 1992. Isolation and characterization of a pathogenic bacterium specific to Manila clam *Tapes philippinarum* larvae. *Dis. Aquat. Org.* 2:153-159.
- Nicolas, J.L.; S. Corre; G. Gauthier; R. Robert & D. Ansquer. 1996. Bacterial problems associated with scallop *Pecten maximus* larval culture. *Dis. Aquat. Org.* 27: 67-76.
- Nilsen, I.W.; K. Overbo; E. Sandsdalen; E. Sandaker; K. Sletten & B. Myrnes. 1999. Protein purification and gene isolation of chlamyisin, a cold-active lysozyme-like enzyme with antibacterial activity. *FEBS Lett.* 464: 153-158.
- Noël, D.; V. Boulo; D. Chagot; E. Mialhe; F. Paolucci; C. Clavies; E. Hervaud & R. Elston. 1991. Preparation and characterization of monoclonal-antibodies against neoplastic hemocytes of *Mytilus edulis* (Bivalvia). *Dis. Aquat. Org.* 10: 51-58.
- Noël, D.; E. Bachère & E. Mialhe. 1993. Phagocytosis associated chemiluminescence of hemocyte in *Mytilus edulis* (Bivalvia). *Dev. Comp. Immunol.* 17: 483-493.
- Noël, D.; R. Pipe; R. Elston; E. Bachère & E. Mialhe. 1994. Antigenic characterization of hemocyte sub-populations in the mussel *Mytilus edulis* by means of monoclonal antibodies. *Mar. Biol.* 119: 549-556.
- Nottage, A.S. & T.H. Birkbeck. 1987. Production of proteinase during experimental infection of *Ostrea edulis* L. larvae with *Vibrio alginolyticus* NCMB 1339 and the antigenic relationship between proteinase produced by marine vibrios pathogenic to fish and shellfish. *J. Fish Dis.* 10: 265-373.
- Nottage, A.S.; P.D. Sinclair & T.H. Birkbeck. 1989. Role of low-molecular-weight ciliostatic Olafsen, J.A.; T.C. Fletcher & T.G. Grant. 1992. Agglutinin activity in Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) hemolymph following in vivo *Vibrio anguillarum* challenge. *Dev. Comp. Immunol.* 16: 123-138.
- Olafsen, J.A.; T.C. Fletcher & T.G. Grant. 1992. Agglutinin activity in Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) hemolymph following in vivo *Vibrio anguillarum* challenge. *Dev. Comp. Immunol.* 16: 123-138.

- Oubella, R.; C. Paillard; P. Maes & M. Auffret. 1994. Changes in hemolymph parameters in the manila clam *Ruditapes philippinarum* (Mollusca: Bivalvia) following bacterial challenge. *J. Invertebr. Pathol.* 64: 33-38.
- Pipe, R.K. 1990a. Hydrolytic enzymes associated with the granular hemocytes of the marine mussel *Mytilus edulis*. *Histochem. J.* 22: 595-603.
- Pipe, R.K. 1990b. Differential binding of lectins to haemocytes of the mussel *Mytilus edulis*. *Cell Tissue Res.* 261: 261-268.
- Pipe, R.K. 1992. Generation of reactive oxygen metabolites by the hemocytes of the mussel *Mytilus edulis*. *Dev. Comp. Immunol.* 16: 111-122.
- Pipe, R.K.; J.A. Coles; M.E. Thomas; V.U. Fossato & A.L. Pulsford. 1995. Evidence for environmentally derived immunomodulation in mussels from the Venice Lagoon. *Aquat. Toxicol.* 32: 59-73.
- Pipe, R.K.; S.R. Farley & J.A. Coles. 1997. The separation and characterisation of haemocytes from the mussel *Mytilus edulis*. *Cell Tissue Res.* 289: 537-545.
- Rasmussen, L.P.; D.E. Hage & O. Karlog. 1985. An electron microscope study of the circulating leucocytes of the marine mussel *Mytilus edulis*. *J. Invertebr. Pathol.* 45: 158-167.
- Relf, J.M.; J.R.S. Chisholm; G.D. Kemp & V.J. Smith. 1999. Purification and characterization of a cysteine-rich 11.5 kDa antibacterial protein from the granular haemocytes of the shore crab, *Carcinus maenas*. *Eur. J. Biochem.* 264: 350-357.
- Renwrantz, L. & A. Stahmer. 1983. Opsonizing properties of an isolated hemolymph agglutinin and demonstration of lectin-like recognition molecules at the surface of hemocytes from *Mytilus edulis*. *J. Comp. Physiol.* 149: 535-546.
- Renwrantz, L. 1983. Involvement of agglutinins in invertebrate defense reactions: the immuno-biological importance of carbohydrate-specific binding molecules. *Dev. Comp. Immunol.* 7: 603-608.
- Renwrantz, L. 1986. Lectins in molluscs and arthropods: their occurrence origin and roles in immunity. *Symp. Zool. Soc. London* 56: 81-93.

- Renwranz, L.; W. Schmalmack; R. Redel; B. Friebel & H. Schneeweiss. 1996. Conversion of phenoloxidase and peroxidase indicators in individual hemocytes of *Mytilus edulis* specimens and isolation of phenoloxidase from haemocyte extract. *J. Comp. Physiol.* 165: 647-658.
- Riquelme, C.; G. Hayashida; A.E. Toranzo; J. Vilches & P. Chávez. 1995. Pathogenicity studies on a *Vibrio anguillarum*-related (VAR) strain causing an epizootic in *Argopecten purpuratus* larvae cultured in Chile. *Dis. Aquat. Org.* 22: 153-141.
- Riquelme, C.; A.E. Toranzo; J.L. Barja; N. Vergara & R. Araya. 1996. Association of *Aeromonas hydrophila* and *Vibrio alginolyticus* with larval mortalities of scallop (*Argopecten purpuratus*). *J. Invertebr. Pathol.* 67: 213-218.
- Riquelme, R. 1999. Determinación de niveles de ploidia en *Argopecten purpuratus* mediante la medición del diámetro nuclear como método alternativo al conteo cromosómico. Tesis de Biólogo Marino, Universidad Católica del Norte, Coquimbo, Chile. 60 pp.
- Rodrick, G. E. & T.C. Cheng. 1974. Kinetic properties of lysozyme from the hemolymph of *Crassostrea virginica*. *J. Invert. Pathol.* 24: 41-48.
- Rodrick, G.E. 1975. Selected enzyme activities in *Mya arenaria* hemolymph. *Proc. Oklahoma Acad. Sci.* 53: 28-32.
- SAGARPA. 2001. Anuario estadístico de pesca. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Recursos Naturales, Pesca y Agricultura. pp. 253.
- Sagrìstà, E.; M. Durfort & C. Azevedo. 1995. *Perkinsus* sp. (Phylum Apicomplexa) in mediterranean clam *Ruditapes semidecussatus* – ultrastructural observations of the cellular response of the host. *Aquaculture* 132: 153-160.
- Sainz, J.C.; A.N. Maeda-Martínez & F. Ascencio. 1999. Experimental vibriosis induction with *Vibrio alginolyticus* of larvae of the cataria scallop (*Argopecten ventricosus=circularis*) (Sowerby II, 1842). *Microb. Ecol.* 35: 188-192.
- Santos, A.M.T. & J. Coimbra. 1995. Growth and production of raft-cultured *Mytilus edulis* L., in Ria de Aveiro: gonad symbiotic infestation. *Aquaculture* 132: 195-211.
- Schroder, J.M. 1999. Epithelial peptide antibiotics. *Biochem. Pharmacol.* 57: 121-134.

- Sima, P. & V. Vetvicka. 1993. Evolution of immune reactions. *Crit. Rev. Immunol.* 13: 83-114.
- Simudu, U. & K. Tsukamoto. 1985. Habitat segregation and biochemical activities of marine members of the family vibronaceae. *Appl. Environ. Microbiol.* 50: 781-790.
- Sindermann, C.J. 1988. Molluscan diseases. En: C.J. Sindermann & D.V. Lightner (eds). Disease diagnosis and control in North American marine aquaculture. Elsevier, Amsterdam. pp. 266-316.
- Sindermann, C.J. 1990. Principal diseases of marine fish and shellfish, Volume 2. Academic Press Inc., San Diego, California. 516 pp.
- Smith, V.J. & K. Söderhäll. 1991. A comparison of phenoloxidase activity in the blood of marine invertebrates. *Dev. Comp. Immunol.* 15: 251-261.
- Sparks, A.K. & J.F. Morado. 1988. Inflammation and wound repair in bivalve molluscs. *Am. Fisher. Soc. Spec. Publ.* 18: 139-152.
- Stabili, L.; M. Licciano & P. Pagliara. 1994. Evidence of antibacterial and lysozyme-like activity in different planktonic larval stages of *Paracentrotus lividus*. *Mar. Biol.* 119: 501-505.
- Steiner, H.; D. Hultmark; A. Engström; H. Bennich & H. Boman. 1981. Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. *Nature* 292: 246-248.
- Söderhäll, K. 1982. Prophenoloxidase activating system and melanization-A recognition mechanism of arthropods? A review. *Dev. Comp. Immunol.* 6: 601-611.
- Söderhäll, K. 1992. Biochemical and molecular aspects of cellular communication in arthropods. *Bull. Zool.* 59: 141-151.
- Sugumar, G.; T. Nakai; Y. Hirata; D. Matsubara & K. Muroga. 1998. *Vibrio splendidus* biovar II as the causative agent of bacillary necrosis of Pacific oyster *Crassostrea gigas* larvae. *Dis. Aquat. Org.* 33: 111-118.
- Suzuki, T. & M. Katsuyoshi. 1990. Hemolymph lectin of the pearl oyster, *Pinctada fucata martensii*: a possible non-self recognition system. *Dev. Comp. Immunol.* 14: 161-173.

- Torreilles, J.; M.C. Guèrin & P. Roch. 1997. Peroxidase-release associated with phagocytosis in *Mytilus galloprovincialis* haemocytes. *Dev. Comp. Immunol.* 21: 267-275.
- Torreilles, J. & M.C. Guèrin. 1999. Production of peroxynitrite by zymosan stimulation of *Mytilus galloprovincialis* haemocytes *in vitro*. *Fish. Shellfish Immunol.* 9: 509-518.
- Tripp, M.R. 1960. Mechanisms of removal of injected microorganisms from the American oyster, *Crassostrea virginica* (Gmelin). *Biol. Bull.* 19: 210-223.
- Tripp, M.R. 1992. Phagocytosis by hemocytes of the hard clam, *Mercenaria mercenaria*. *J. Invert. Pathol.* 59: 222-227.
- Tubiash, H.S.; P.E. Chanley & E. Leipson 1965. Bacillar necrosis a disease of larval bivalve mollusks. 1. etiology and epizootiology. *J. Bacteriol.* 90: 1036-1044.
- Tubiash, H.S. & S.V. Otto. 1986. Bacterial problems in oysters: a review. En: C.P. Vivarès; J.R. Bonami & E. Jasper (eds). Pathology in marine aquaculture. European Aquaculture Society, Special Publ. No. 8., Breden. pp. 233-242.
- Tunkijjanukij, S.; H.V. Mikkelsen & J.A. Olafsen. 1997. A heterogeneous sialic acid-binding lectin with affinity for bacterial LPS from horse mussel (*Modiolus modiolus*) hemolymph. *Comp. Biochem. Physiol.* 117B: 273-286.
- Utting, S.E. 1986. Seasonal changes in sea water composition and some observations on performance of *Ostrea edulis* L. and *Crassostrea gigas* Thunberg spat at selected sites around the British coastline. Ministry of agriculture, fisheries and food, directorate of fisheries research, internal report No.15, Lowestoft
- Vargas-Albores, F. & M. A. Barracco. 2001. Mecanismos de defensa de los moluscos bivalvos, con énfasis en pectínidos. En: A.N. Maeda-Martínez (ed.). Los moluscos Pectínidos de Iberoamérica: Ciencia y Acuicultura). Editorial Limusa, D.F. pp. 127-146.
- Vasta, G.R.; T.C. Cheng & J.J. Marchalonis. 1984. A. Lectin on the hemocyte membrane of the oyster (*Crassostrea virginica*). *Cell. Immunol.* 88: 475-488.

- Vasta, G.R. & J.J. Marchalonis. 1994. Immunobiological significance of invertebrate lectins. En: N. Cohen (ed.). Recognition proteins, receptors, and probes: Invertebrates. Alan R. Liss Inc., New York. pp. 177-191.
- Villalba, A.; S.G. Mourelle; M.J. Carballal & C. López. 1997. Symbionts and diseases of farmed mussels *Mytilus galloprovincialis* throughout the culture process in the Rias of Galicia (NW Spain). *Dis Aquat. Org.* 31: 127-139.
- Waite, H.J. & M. Wilbur. 1976. Phenoloxidase in the periostracum of the marine bivalve *Modiolus demissus* Dillwyn. *J. Exp. Zool.* 195: 359-368.
- Winston, G.W.; M.N. Moore; M.A. Kirchin & C. Soverchia. 1996. Production of reactive oxygen species by hemocytes from the marine mussel, *Mytilus edulis*: Lysosomal localization and effect of xenobiotics. *Comp. Biochem. Physiol.* 113C: 221-229.
- Wyte, S.K.; R.J. Cawthorn & S.E. McGladdery. 1994. Coinfection of bay scallops *Argopecten irradians* with *Perkinsus karlssoni* (Apicomplexa, Perkinsea) and an unidentified coccidian parasite. *Dis. Aquat. Org.* 18: 53-62.
- Xue, Q. & T. Renault. 2000. Enzymatic activities in European flat oyster, *Ostrea edulis*, and Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, hemolymph. *J. Invert. Pathol.* 76: 155-163.
- Zhang, X.; S. Liao; Y. Li; W. Ji & H. Xu. 1998. Studies on pathogenic bacteria (*Vibrio natriegens*) of *Argopecten irradians* Lamark. *J. Ocean. Univ. Qingdao* 28: 426-432.