

Caracterización de la respuesta inmune en el ostión del norte
Argopecten purpuratus (Lamarck, 1819) (Mollusca: Bivalvia)

Characterization of the immune response of the north scallop
Argopecten purpuratus (Lamarck, 1819) (Mollusca: Bivalvia)

Marcelo González
Gloria Arenas*

Laboratorio de Genética e Inmunología Molecular
Instituto de Biología
Universidad Católica de Valparaíso
Avenida Brasil 2950, Casilla 1020
Valparaíso, Chile
*E-mail: garenas@ucv.cl

Recibido en noviembre de 2000; aceptado en abril de 2002

Resumen

Los mecanismos de defensa en moluscos cumplen una importante función defensiva contra bacterias, hongos, protozoos y metazoos. Los hemocitos son los responsables de generar diferentes tipos de respuestas innatas tales como: fagocitosis, encapsulación, producción de sustancias citotóxicas y péptidos antibacterianos. Por microcopia de luz, se estimó el tipo y número de hemocitos utilizando una cámara de Neubauer, en monocapa, se midió la capacidad fagocítica sobre levaduras, la actividad hemolítica sobre eritrocitos de rata y la producción de anión superóxido fue cuantificada midiendo la reducción de NBT en forma citoquímica. Se determinó que la hemolinfa de *Argopecten purpuratus* contiene hemocitos del tipo hialino y granular. El número de hemocitos circulantes en la hemolinfa de los ostiones presentó una variación estacional mostrando un aumento significativo en invierno, respecto de otoño. Los hemocitos fagocitaron levaduras en ausencia de plasma, cuando se opsonizaron con el suero, la fagocitosis aumentó significativamente. Tanto el suero como los hemocitos presentaron igual capacidad hemolítica sobre eritrocitos de rata. Los hemocitos presentaron producción de anión superóxido que, al utilizar zimosan, aumentó considerablemente respecto al control, mientras que en presencia de la enzima superóxido dismutasa, ésta disminuyó. Los resultados obtenidos muestran que los hemocitos de *A. purpuratus* son capaces de presentar variados mecanismos defensivos de respuesta celular que podrían ser utilizados en el futuro como instrumentos para evaluar la condición de los mecanismos de defensa, y proyectarlos sobre el estado de salud de los individuos en cultivo.

Palabras clave: Moluscos, respuesta inmune, hemocitos, *Argopecten purpuratus*.

Abstract

The immune response in mollusks has an important role as a defense against bacteriae, fungi, protozoa and metazoans. The hemocytes are responsible for generating different kinds of innate responses such as: phagocytosis, encapsulation and production of cytotoxic substances and antibacterial peptides.

Through light microscopy we estimated the hemocyte number using a Neubauer chamber. Over hemocytes monolayers we measured the phagocytic ability on yeasts. The haemolytic activity on rat's erythrocytes was tested by hemoglobin release and the production of anion superoxide was quantified by the reduction of NBT (Nitro Blue Tetrazolium).

We determined that the immune system from *Argopecten purpuratus* was defined by two types of hemocytes: hyalinocytes and granulocytes. The number of hemocytes circulating in the hemolymph showed a seasonal variation, having a greater increase during winter than in autumn. The hemocytes phagocytized yeast in the absence of plasma when they were opsonized, showing a remarkable increase in phagocytosis. Plasma and hemocytes have an equivalent hemolytic ability against rat's erythrocytes. The hemocytes present production of anion superoxide that increases considerably over the control with the use of zymosan and, decreases with the use of the superoxide dismutase.

The results show that hemocytes from *Argopecten purpuratus* are able to display different defense mechanisms during the cellular response that could be used as tools to evaluate the immune system of mollusks in the near future.

Key words: Mollusks, immune response, hemocytes, *Argopecten purpuratus*.

Introducción

En los moluscos bivalvos los hemocitos cumplen importantes funciones en los mecanismos de defensa innata, además participan en otros procesos tales como reparación de tejidos, digestión de nutrientes, transporte y excreción (Cheng, 1981). Éstos han sido clasificados principalmente con criterios morfológicos en dos tipos celulares: granulocitos y hialinocitos (Cheng, 1981; Auffert, 1988).

En bivalvos pectínidos la capacidad fagocítica de los hemocitos se ha evaluado en *Pecten maximus* con diversos tipos de bacterias y levaduras (Lambert y Nicolas, 1998). La fagocitosis ha sido un mecanismo de defensa ampliamente estudiado en otros moluscos evaluándose sobre varios agentes tales como protozoos parásitos, levaduras y bacterias (Amen *et al.*, 1992; López *et al.*, 1994; La Peyre *et al.*, 1995; Carballal *et al.*, 1997; López *et al.*, 1997; Fryer y Bayne, 1990; Beaven y Paynter, 1999). En el gastrópodo *Biomphalaria glabrata* los ensayos de fagocitosis *in vitro* han sido utilizados para evaluar el efecto inmunosupresor de determinados parásitos sobre el sistema de defensa del huésped (Fryer y Bayne, 1990). También se ha medido la capacidad citotóxica de los hemocitos de *Mytilus edulis* sobre eritrocitos, evaluándose por la formación de placas hemolíticas en agarosa (Leippe y Renwrtanz, 1988). Otro mecanismo de defensa en moluscos corresponde a la producción de especies reactivas de oxígeno, la existencia de este mecanismo citotóxico oxidativo ha sido determinada en los ostiones *Patinopecten yessoensis* (Nakamura *et al.*, 1985) y *Pecten maximus* (Le Gall *et al.*, 1991), en las ostras *Crassostrea gigas* (Takahashi *et al.*, 1993), *Crassostrea gigas* y *Ostrea edulis* (Bachère *et al.*, 1991) y en los mitílidos *Mytilus edulis* (Pipe, 1992) y *Mytilus galloprovincialis* (Carballal *et al.*, 1997).

En *Argopecten purpuratus* no existen trabajos que caractericen los componentes de su sistema de defensa, como tampoco los mecanismos involucrados en la respuesta inmune sobre alguna célula blanco. Por lo anterior en el presente estudio se caracterizan morfológicamente los tipos de hemocitos que presenta la hemolinfa de *Argopecten purpuratus* y se evidencia la ocurrencia de mecanismos de defensa como son las respuestas citotóxicas y fagocíticas.

Materiales y métodos

Animales

Los ostiones fueron obtenidos en el centro de cultivo localizado en Horcón (32°42'04"S; 7°28'45"W) al norte de la Bahía de Quintero en Chile.

Observación y conteo de hemocitos

La hemolinfa se obtuvo del músculo aductor con una jeringa de 5 mL. Se realizaron frotis individuales sobre portaobjetos y se observaron los diferentes tipos celulares con

Introduction

In bivalve mollusks, hemocytes accomplish important functions in innate defense mechanisms; moreover they participate in other processes such as tissue reparation, nutrient digestion, transport and excretion (Cheng, 1981).

These have been classified mainly following morphologic criteria into two cell types: granulocytes and hyalinocytes (Cheng, 1981; Auffert, 1988).

In pectinidate bivalves, the phagocytic capacity of hemocytes has been evaluated in *Pecten maximus* with different kinds of bacteria and yeasts (Lambert and Nicolas, 1998). Phagocytosis has been a widely studied defense mechanism in other mollusks, being evaluated in other agents such as parasitic protozoa, yeasts and bacteria (Amen *et al.*, 1992; López *et al.*, 1994; La Peyre *et al.*, 1995; Carballal *et al.*, 1997; López *et al.*, 1997; Fryer and Bayne, 1990; Beaven and Paynter, 1999). In the gastropod *Biomphalaria glabrata*, *in vitro* phagocytosis tests have been used to evaluate the immunosuppressing effect of certain parasites on the host's immune system (Fryer and Bayne, 1990). The cytotoxic capacity of *Mytilus edulis* hemocytes on erythrocytes has also been measured, being evaluated by the formation of hemolytic plates on agarose (Leippe and Renwrtanz, 1988). Another defense mechanism in mollusks consists in the production of oxygen reactive species, which is an oxidative cytotoxic mechanism that has been determined in the scallops *Patinopecten yessoensis* (Nakamura *et al.*, 1985) and *Pecten maximus* (Le Gall *et al.*, 1991), in the oysters *Crassostrea gigas* (Takahashi *et al.*, 1993), *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis* (Bachère *et al.*, 1991) and in the mytilidae *Mytilus edulis* (Pipe, 1992) and *Mytilus galloprovincialis* (Carballal *et al.*, 1997).

There are not any works in *Argopecten purpuratus* about the characterization of its immune system components, neither the mechanisms involved in the immune response on any target cell. Therefore, in the present study the types of hemocytes that bear the hemolymph of *Argopecten purpuratus* are characterized morphologically, besides evidentiating the occurrence of defense mechanisms such as cytotoxic and phagocytic responses.

Materials and methods

Animals

Scallops were obtained in the culture center located in Horcón (32°42'04"S; 7°28'45"W) at north of the Quintero Bay in Chile.

Observation and counting of hemocytes

Hemolymph was obtained from the adductor muscle using a 5-mL sterile syringe. Individual mounts on slides and the different cell types were observed with a Nikon Labophot-2 contrast microscope. Other mounts were fixed during 20 min with

un microscopio de contraste de fase Nikon Labophot-2. Otros frotis fueron fijados durante 20 min con glutaraldehído al 2% conteniendo sacarosa al 1%. Se eliminó el fijador lavando dos veces con tampón Tris Buffer Salino (TBS) (50 mM Tris, 10 mM $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 450 mM NaCl, pH 8.4), los frotis fueron teñidos con Giemsa por 20 min, el colorante se eliminó con alcohol y se montó con Entellan (Merck). El número total de hemocitos presentes en la hemolinfa se evaluó durante las estaciones de otoño e invierno correspondientes al año 1998, utilizando un total de 125 ostiones por estación, los dos grupos de ostiones no presentaron diferencias significativas en talla ($P > 0.05$) (tabla 1). La condición sanitaria y reproductiva se evaluó tanto por observación macroscópica como por técnicas corrientes de histología, seleccionándose los ostiones que presentaron una misma condición. Posteriormente, de cada individuo se obtuvo un volumen aproximado de 1 mL de hemolinfa, a la cual se le contó el número de hemocitos utilizando una cámara Neubauer y realizando tres réplicas por individuo.

Fagocitosis de levaduras *in vitro* por hemocitos

Una cantidad de 5×10^6 levaduras muertas por calor se opsonizaron en 1 mL de suero, se incubaron durante 40 min a 20°C, después se centrifugaron a 10,000g por 10 seg. El sobrenadante fue descartado y las levaduras opsonizadas fueron lavadas dos veces en TBS por centrifugación. Los controles fueron preparados de la misma forma, pero el suero fue sustituido por TBS.

Se prepararon monocapas con 40,000 hemocitos de un total de 10 individuos sin diferenciar entre hialinos y granulares, se dejó adherir durante 30 min en cámara húmeda, a temperatura ambiente (20°C). A las monocapas se les agregó un volumen de levaduras en una relación 10:1 (levaduras:hemocitos). Se incubó por 30 min y las levaduras no fagocitadas fueron removidas por lavado con 100 μl TBS. Las preparaciones fueron fijadas por 20 min con glutaraldehído al 2% en TBS conteniendo 1% de sacarosa. Se lavó dos veces con TBS para retirar el fijador y se tiñó con Giemsa por 10 min. La preparación se lavó con alcohol, se secó al aire y se montó con Entellan (Merck).

La fagocitosis fue cuantificada usando un microscopio de contraste de fase (Nikon) con aumento 400 \times . Para cada experimento se utilizó la hemolinfa de 6 ostiones, haciendo tres preparaciones, y contando 200 hemocitos por preparación, procedimiento que se repitió tres veces. El resultado fue expresado como el porcentaje de hemocitos que fagocitaron a las levaduras.

Actividad hemolítica de la hemolinfa de ostiones

Un volumen de 500 μL conteniendo 250,000 hemocitos en tampón TBS fue mezclado con 2×10^6 eritrocitos de rata previamente lavados y resuspendidos en TBS. Para evaluar la citotoxicidad del suero se utilizaron proteínas totales de la hemolinfa a una concentración de 1.0 mg/mL frente a 2×10^6

2% glutaraldehído con 1% sucrose. Fixative was eliminated by washing with Tris Buffered Saline (TBS) (50 mM Tris, 10 mM $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 450 mM NaCl, pH 8.4) twice, mounts were dyed with Giemsa stain for a 20-min period, stain was eliminated with alcohol and mounted with Entellan (Merck). The total number of hemocytes in the hemolymph was evaluated during autumn and winter 1998, using a total of 125 scallops by season. Both groups of scallops did not show significant differences in size ($P > 0.05$) (table 1). The sanitary and reproductive condition was evaluated by macroscopic observation as well as by common histological techniques, thus selecting those scallops that showed the same condition. Afterwards, a 1-mL hemolymph volume was obtained from each individual, in which the number of hemocytes was counted by means of a Neubauer chamber and three replicates were done.

Yeasts phagocytosis by hemocytes *in vitro*

A total of 5×10^6 yeasts killed by heat were opsonized in 1-mL serum, incubated for 40 min at 20°C, and then centrifuged at 10,000 g for 10 sec. The supernatant was discarded and opsonized yeasts were washed twice in TBS by centrifugation. Controls were prepared in the same way but TBS was used instead of serum.

Monolayers with 40,000 hemocytes were prepared from a total of 10 individuals without differentiating between hyalines or granulars. They were allowed to adhere during 30 min in a wet chamber at room temperature (20°C). A 10:1 (yeasts:hemocytes) yeast volume was added to the monolayers. This was incubated for 30 min and non-phagocyted yeasts were removed by washing with 100 mL TBS. Preparations were fixed for 20 min with 2% glutaraldehído in TBS with 1% sucrose, then washed twice with TBS in order to take fixative away and then they were stained with Giemsa for 10 min. Preparations were washed with alcohol, dried to air and mounted with Entellan (Merck).

Phagocytosis was quantified using a phase-contrast microscope (Nikon) with 400 \times magnification. The hemolymph of six scallops was used for each experiment, making three preparations and counting 200 hemocytes in each one, this process was repeated three times. The result was expressed as the percentage of hemocytes that phagocyted yeasts.

Hemolytic activity of scallops' hemolymph

A 500- μL volume containing 250,000 hemocytes in TBS buffer was mixed with 2×10^6 rat erythrocytes previously washed and resuspended in TBS. In order to evaluate the serum cytotoxicity, total proteins in the hemolymph were used at a concentration of 1.0 mg/mL before 2×10^6 erythrocytes, completing to an 800- μL final volume with TBS.

Samples were incubated in a thermic bath with continuous and gentle agitation during 1 hr at 37°C. Adding 2-mL cold

de eritrocitos, completando con TBS un volumen final de 800 μ l.

Las muestras se incubaron en baño térmico con agitación continua y moderada por 1 h a 37°C. Se detuvo la reacción agregando 2 mL de TBS frío conteniendo 5 mM EDTA. Se centrifugó a 2,800 rpm por 5 min para precipitar los restos celulares y, en los mismos tubos, la hemoglobina liberada (Hb) fue determinada a 541 nm utilizando un espectrofotómetro Spectronic 21-D. El porcentaje de hemólisis fue calculado de acuerdo a lo propuesto por Parrinello *et al.* (1993). Cada experimento se repitió tres veces y se realizaron tres réplicas por ensayo.

Producción intracelular de anión superóxido por reducción cuantitativa de NBT

Aproximadamente 250,000 hemocitos fueron dispuestos en portaobjetos para formar las monocapas. Éstas se incubaron en tampón TBS conteniendo 0.2% de NBT (N 6876, Sigma) y 0.15% de paredes de levaduras, zimosan (Sigma) por 60 min a 25°C con el objeto de estimular a los hemocitos. Posteriormente éstos fueron lavados, fijados con glutaraldehído al 2.5%, montados en Entellan (Merck) y observados al microscopio de luz. El zimosan fue omitido del control. Mientras que, para confirmar la especificidad de la reacción, a las monocapas con NBT al 0.2% y zimosan, se les agregaron 300 unidades/mL de la enzima superóxido dismutasa (SOD, Sigma). Los resultados se expresaron como el porcentaje de células que presentan vacuolas endocíticas con reducción del NBT. Cada experimento se repitió tres veces en triplicado, usando cuatro animales en cada ensayo.

Análisis estadístico

Las diferencias estadísticamente significativas entre los promedios de las mediciones de fagocitosis, citotoxicidad, número de hemocitos y talla de los ostiones fueron determinados por la prueba *t* de Student (Zar, 1984). La producción de anión superóxido fueron analizados por ANDEVA, para posteriormente realizar la prueba de comparaciones múltiples Newman-Keuls (Zar, 1984). Las diferencias fueron consideradas significativas cuando la probabilidad fue < 0.05 y 0.01 .

Resultados

Morfología y número de hemocitos

En la hemolinfa de *Argopecten purpuratus* se observaron dos tipos de hemocitos, los hialinocitos y los granulocitos.

Los hialinocitos presentaron un tamaño de $7.2 \pm 0.26 \mu$ m, con un núcleo esférico de gran tamaño de ubicación central y el citoplasma conteniendo algunos gránulos refringentes (fig. 1a, b). Los hialinocitos se caracterizaron por no presentar proyecciones desde el ectoplasma.

TBS with 5 mM EDTA stopped the reaction. Samples were centrifuged at 2,800 rpm for 5 min to precipitate cellular rests and in the same tubes, the liberated hemoglobin (Hb) was determined at 541 nm using a Spectronic 21-D spectrophotometer. The hemolysis percentage was calculated according to Parrinello *et al.* (1993). Each experiment was repeated three times and three replicates were done by test.

Intracellular production of the superoxide anion by NBT quantitative reduction

Approximately 250,000 hemocytes were placed on slides to form monolayers. These were incubated in TBS buffer containing 0.2% NBT (N 6876, Sigma) and 0.15% yeast walls, zimosan (Sigma) for 60 min at 25°C with the aim of stimulating hemocytes. Afterwards, these were washed, fixated with 2.5% glutaraldehyde, mounted in Entellan (Merck) and observed to light microscope. Zimosan was omitted in the control. To confirm the specificity of the reaction, 300 units/mL of the enzyme superoxide dismutase (SOD, Sigma) were added to the monolayers with 0.2% NBT and zimosan. Results were expressed as the percentage of cells that had endocytic vacuoles with NBT reduction. Each experiment was repeated three times with three replicates and used four animals in each test.

Statistical analyses

Significant statistical differences between the averages of of phagocytosis, cytotoxicity, number of hemocytes and size of the scallops were determined by the Student's *t*-test (Zar, 1984). The production of the superoxide anion was analyzed by ANOVA before performing the Newman-Keuls multiple comparisons test (Zar, 1984). Differences were considered significant when the probability was < 0.05 and 0.01 .

Results

Morphology and number of hemocytes

Two types of hemocytes were observed in the *Argopecten purpuratus* hemolymph, hyalinocytes and granulocytes.

Hyalinocytes had a size of $7.2 \pm 0.26 \mu$ m, with a large spherical nucleus located in the center, and the cytoplasm containing several refringent granules (fig. 1a, b). Hyalinocytes were characterized by not showing projections from the ectoplasm.

Granulocytes showed a size of $12.5 \pm 0.35 \mu$ m. They were characterized by having a nucleus, few granules and a lot of vacuoles in the endoplasm. There were not granules in the ectoplasmic zone, and from this, several projections called pseudopodia were originated. These hemocytes are characterized by changing from a round shape to an amoeboid one when adhering to a substrate. The shape of the nucleus can

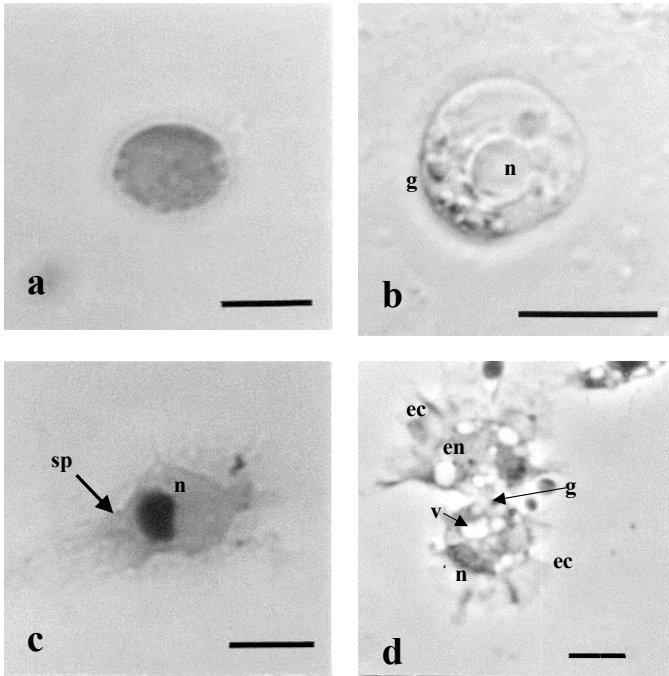


Figura 1. Microscopía de luz de hemocitos de ostión *Argopecten purpuratus*. (a) Tinción Giemsa de hialinocito que se caracteriza por su forma redondeada y escaso citoplasma; (b) Contraste de fase de hialinocito que presenta un núcleo central (n) y algunos gránulos (g); (c) Tinción Giemsa de granulocito en el que se observa su característica forma extendida con pseudopodios (sp); (d) Contraste de fase de dos granulocitos con endoplasma (en) que contiene un núcleo excéntrico (n), gránulos (g) y vacuolas (v), generando desde el ectoplasma (ec) varios pseudopodios. Barra de escala = 5 μ m.

Figure 1. Light microscopy of hemocytes of the oyster *Argopecten purpuratus*: (a) Giemsa-dyed hyalinocyte that characterizes by its rounded shape and scarce cytoplasm; (b) Phase-contrast of a hyalinocyte that has a central nucleus (n) and some granules (g); (c) Giemsa-dyed granulocyte in which its characteristic shape bearing pseudopodia (sp) is observed; (d) Phase contrast of two granulocytes with endoplasm (en) which contains an eccentric nucleus (n), granules (g) and vacuoles (v), generating several pseudopodia from the ectoplasm (ec). Scale bar = 5 μ m.

Los granulocitos presentaron un tamaño de $12.5 \pm 0.35 \mu\text{m}$, se caracterizaron por poseer en el endoplasma un núcleo, pocos gránulos y muchas vacuolas. En la zona ectoplasmática no se presentaron gránulos y desde ésta se originaban variadas proyecciones denominadas pseudopodios. Estos hemocitos se caracterizan por cambiar de una forma redondeada a una forma ameboide, cuando se adhieren a un sustrato. El núcleo puede ser de forma irregular u ovoide, teniendo por lo general una ubicación excéntrica (fig. 1c, d).

Al comparar entre estaciones (otoño e invierno) el número de hemocitos circulantes, éste mostró diferencias estadísticamente significativas, el número de hemocitos aumentó considerablemente en la estación de invierno respecto a la de otoño (tabla 1).

Capacidad fagocítica *in vitro* de los hemocitos

Los hemocitos de *Argopecten purpuratus* fueron capaces de fagocitar levaduras no opsonizadas y opsonizadas con

be irregular or ovoid, generally having an eccentric location (fig. 1c, d).

When comparing between seasons (autumn and winter) the number of circulating hemocytes, significant statistical differences were observed. The number of hemocytes increased considerably during winter in respect of autumn (table 1).

Hemocytes' *in vitro* phagocytic capacity

Hemocytes of *Argopecten purpuratus* were able to phagocytose non-opsonized yeasts as well as those opsonized in serum. They were characterized by having one or more vacuoles that displaced both the cytoplasm and the nucleus to the periphery (fig. 2a). Some phagocytic hemocytes can contain more than one yeast in their interior (fig. 2b).

The phagocytic capacity of the hemocytes before yeasts incubated in TBS buffer was 13.3% meanwhile this capacity increased by 27.09% when using opsonized yeasts, showing significant differences in respect of the first treatment ($P < 0.05$) (table 2).

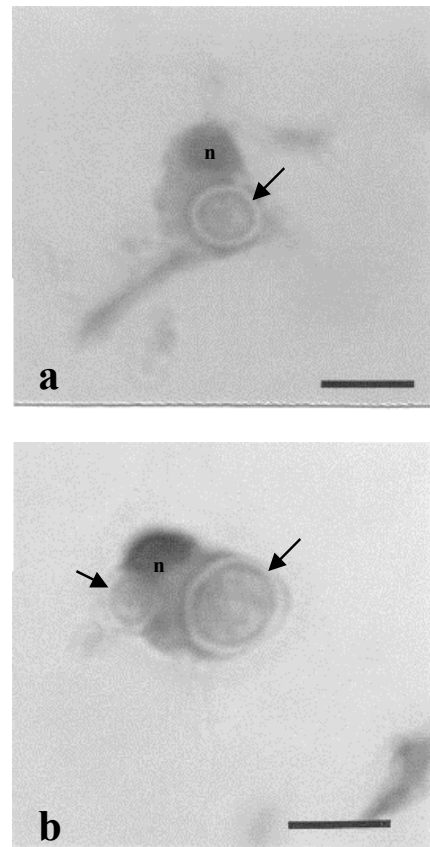


Figura 2. Fagocitosis de levaduras por hemocitos granulares. (a) Hemocitos conteniendo una levadura (flecha) con núcleo excéntrico (n); (b) Hemocito con dos levaduras (flechas) en su interior. Tinción Giemsa. Barra de escala = 5 μ m.

Figure 2. Phagocytosis of yeasts by granular hemocytes. (a) Hemocytes containing a yeast (arrow) with eccentric nucleus (n). (b) Hemocyte with two yeasts (arrows) in its interior. Giemsa-dyed. Scale bar = 5 μ m.

Tabla 1. Número de hemocitos totales en la hemolinfa de *A. purpuratus* en dos estaciones del año.

Table 1. Total hemocytes in the hemolymph of *A. purpuratus* in two seasons of the year.

Estación	Tamaño (mm)	Número de hemocitos (hem/mL×10 ⁵)
Otoño	67.00 ± 7.6	2.08 ± 1.0
Invierno	68.20 ± 7.7	4.14 ± 1.2

suero. Se caracterizaron por tener una o más vacuolas que desplazan citoplasma y núcleo a la periferia (fig. 2a). Algunos hemocitos fagocíticos pueden contener en su interior a más de una levadura (fig. 2b).

La capacidad fagocítica de los hemocitos frente a levaduras incubadas en tampón TBS fue de 13.37%, mientras que la capacidad fagocítica de los hemocitos aumentó en un 27.09% al utilizar las levaduras opsonizadas, mostrando diferencias significativas con respecto al primer tratamiento ($P < 0.05$) (tabla 2).

Capacidad hemolítica de la hemolinfa

Cuando los hemocitos de *A. purpuratus* se incubaron con eritrocitos de rata, los hemocitos presentaron actividad hemolítica de un 38.01%. Mientras que al evaluar la capacidad hemolítica del suero se determinó que éste tuvo un 22.64% de hemólisis sobre los eritrocitos de rata determinándose diferencias significativas entre estas fracciones de la hemolinfa ($P < 0.05$) (tabla 3).

Producción de anión superóxido

Se logró determinar citoquímicamente que los hemocitos de *Argopecten purpuratus* producen anión superóxido por medio de la reducción de NBT, el cual se aprecia como un precipitado azul en el citoplasma de los hemocitos (fig. 3). En los tres tratamientos a los que fueron sometidas las monocapas de hemocitos se determinó la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre ellos (g.l. = 2, 12; $F = 14,68$; $P < 0.01$) (tabla 4). Cuando los hemocitos se incubaron con zimosan se observó un incremento en el número hemocitos que contenían el precipitado azul-formazan mostrando diferencias estadísticamente significativas con el control y con las monocapas de hemocitos incubadas con zimosan y SOD ($P < 0.01$). Sin embargo, cuando las células se incubaron en presencia de la enzima superóxido dismutasa (SOD) el porcentaje de hemocitos NBT-positivos no mostró diferencias significativas respecto al grupo control ($P > 0.05$).

Discusión

Morfológicamente, los hemocitos de *Argopecten purpuratus* presentan un patrón celular semejante con los hemocitos de la mayoría de los moluscos bivalvos, ya que es

Tabla 2. Efecto de la opsonización de levaduras sobre la fagocitosis por los hemocitos de *A. purpuratus*.

Table 2. Effect of the opsonization of yeasts on phagocytosis by hemocytes of *A. purpuratus*.

Tratamiento	N	Porcentaje de fagocitosis
Control	9	13.37 ± 12.4
Opsonización	9	23.41 ± 8.7

Hemolymph's hemolytic capacity

When *A. purpuratus* hemocytes were incubated with rat erythrocytes, hemocytes showed a 38.01% hemolytic activity. Meanwhile, when the serum hemolytic activity was evaluated, it was determined that this had a 22.64% of hemolysis on rat erythrocytes, thus establishing significant differences between these hemolymph fractions ($P < 0.05$) (table 3).

Production of the superoxide anion

The production of the superoxide anion by *Argopecten purpuratus* hemocytes was determined cytochemically, by means of the reduction of NBT, which is observed as a blue precipitate in the hemocytes' cytoplasm (fig. 3). In all three treatments to which monolayers were subjected to, the existence of significant differences was determined among them (d.f. = 2,12; $F = 14,68$; $P < 0.01$) (table 4). When hemocytes were incubated with zimosan, an increase in the number of hemocytes containing the blue precipitate was observed, showing significant statistical differences in respect to the control and to the hemocyte monolayers incubated with zimosan and SOD ($P < 0.01$). However, when cells were incubated in presence of SOD the percentage of NBT-positive hemocytes did not show significant differences in respect of the control group ($P > 0.05$).

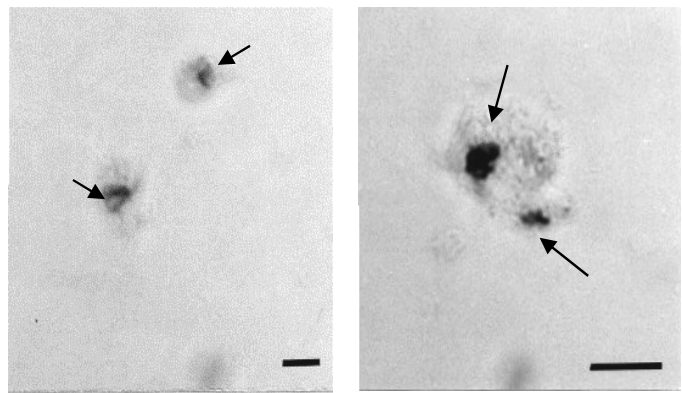


Figura 3. Observación de la producción de anión superóxido en hemocitos de tipo granular en *A. purpuratus* incubados *in vitro*, revelado por la reducción del NBT a un precipitado azul (flechas). Barra de escala = 5 μ m.

Figure 3. Observation of the superoxide anion production in hemocytes of granular type in *A. purpuratus* incubated *in vitro*, revealed by the reduction of NBT to a blue precipitate (arrows). Scale bar = 5 μ m.

Tabla 3. Comparación de la actividad hemolítica del suero y de los hemocitos sobre los eritrocitos de rata.**Table 3.** Comparison of the hemolytic activity of serum and hemocytes on rat erythrocytes.

Constituyente hemolinfático	N	Porcentaje de hemólisis
Suero	9	25.8 ± 12.4
Hemocitos	9	38.0 ± 8.7

posible distinguir tanto hialinocitos como granulocitos. Diversos criterios de clasificación que han causado controversia se han propuesto para identificar los tipos de hemocitos en moluscos, sin embargo, la mayoría de los investigadores han concordado en que existen principalmente dos grupos de hemocitos presentes en la hemolinfa de los moluscos bivalvos: los hialinocitos y los granulocitos (Cheng, 1981).

Los tipos celulares encontrados en *Argopecten purpuratus*, concuerdan con los datos proporcionados en la revisión realizada por Cheng (1981) para el pectínido *Pecten maximus* en relación con la existencia de hemocitos que presentan gránulos en su citoplasma, presentan una menor relación núcleo-citoplasma y presentan pseudopodios. Sin embargo, en la revisión efectuada por Auffret (1988) se descarta la existencia de hemocitos granulares para los pectínidos *Pecten maximus* y *Chlamys varia*. En el presente trabajo la clasificación morfológica de los hemocitos granulares no sólo se determinó por la existencia de gránulos, sino además por una menor relación núcleo-citoplasma y la presencia exclusiva de pseudopodios para este tipo celular.

El análisis por hemograma de la hemolinfa en los ostiones, reveló cambios estacionales en el número de hemocitos, expresados en una diferencia significativa ($P < 0.05$) entre las estaciones de otoño e invierno. Esto concuerda con los antecedentes respecto a hemogramas de poblaciones cultivadas de *Mytilus galloprovincialis*, donde el número de hemocitos de la hemolinfa presenta variaciones con respecto a la temperatura (Carballal *et al.*, 1998). Un aumento o disminución en el número de hemocitos también puede ser provocado por la presencia de parásitos, por lo que este parámetro ha sido utilizado para evaluar el efecto de ciertos parásitos sobre la condición fisiológica del hospedador (Ford *et al.*, 1993; Robledo *et al.*, 1995; Carballal *et al.*, 1998).

Dado que en invertebrados puede ocurrir fagocitosis en ausencia de opsonización, es posible sostener la existencia de receptores que permiten un contacto directo entre los hemocitos y moléculas de superficie de las membranas de las levaduras. Los hemocitos de *Argopecten purpuratus* presentaron una capacidad fagocítica basal de 13.3% sobre las levaduras, lo que se repite con rangos variables en otras especies de invertebrados, como *Botryllus schlosseri* con 11.0% (Ballarin *et al.*, 1994), *Styela clava* 28.0% y *Styela plicata* 22.0% (Kelly *et al.*, 1993) y *Biomphalaria glabrata* 20.0% (Fryer y Bayne, 1989). Cuando los hemocitos de ostiones se incubaron con levaduras tratadas con su suero, el porcentaje de fagocitosis aumentó

Tabla 4. Producción de anión superóxido de los hemocitos de *A. purpuratus* por reducción de NBT a formazan.**Table 4.** Superoxide anion production by *A. purpuratus* hemocytes reduction of NBT to formazan.

Tratamiento	N	% de hemocitos con el precipitado formazan
Control	9	4.12 ± 1.4
Zymosan	9	8.46 ± 2.0
SOD	9	3.78 ± 0.47

Discussion

Morphologically, hemocytes of *Argopecten purpuratus* show a cell pattern similar to that of most bivalve mollusks since it is possible to distinguish hyalinocytes and granulocytes. Diverse controversial classification criteria have been proposed to identify types of hemocytes in mollusks, nevertheless, most of the researchers have agreed in that there are mainly two groups of hemocytes in the hemolymph of bivalve mollusks: hyalinocytes and granulocytes (Cheng, 1981).

Cell types found in *Argopecten purpuratus* agree with data from the review by Cheng (1981) for the pectinid *Pecten maximus* in regard of the existence of hemocytes that bear granules in their cytoplasm, they show a lower nucleus-cytoplasm relation and pseudopodia. However, in the review by Auffret (1988), the existence of granular hemocytes in the pectinids *Pecten maximus* and *Chlamys varia* is discarded. In the present study, the morphological classification of granular hemocytes not only was determined by the presence of granules, but by a lower relation nucleus-cytoplasm besides the presence of pseudopodia exclusive for this cell type.

The analysis by scallop hemolymph hemogramme, revealed seasonal changes in the number of hemocytes, expressed as a significant difference ($P > 0.05$) between autumn and winter. This agrees to the backgrounds in respect to hemogrammes of cultured populations of *Mytilus galloprovincialis*, where the number of hemolymph hemocytes exhibits variations in regard of the temperature (Carballal *et al.*, 1998). An increase or reduction in the number of hemocytes can also be caused by the presence of parasites. This is why this parameter has been used to evaluate the effect of certain parasites on the host's physiological condition (Ford *et al.*, 1993; Robledo *et al.*, 1995; Carballal *et al.*, 1998).

Given that phagocytosis can occur without opsonization in invertebrates, it is possible to sustain the existence of receptors that allow the direct contact between hemocytes and surface molecules of yeast membranes. Hemocytes of *Argopecten purpuratus* showed a basal phagocytic capacity of 13.3% on yeasts, which also occurs with variable ranges in other invertebrate species such as *Botryllus schlosseri*, with 11.0% (Ballarin *et al.*, 1994), *Styela clava* 28% and *Styela plicata* 22.0% (Kelly *et al.*, 1993) and *Biomphalaria glabrata* 20.0% (Fryer and Bayne, 1989). When scallops' hemocytes were incubated with serum-treated yeasts, the phagocytosis

significativamente, lo que indicaría la presencia de moléculas opsonizadoras que optimizan la respuesta fagocítica (Fryer y Bayne, 1989; Kelly *et al.*, 1993). Sin embargo en otras especies, como en el molusco *Helix aspersa*, la presencia de factores plasmáticos resulta indispensable para realizar la fagocitosis (Fryer y Bayne, 1989).

Las reacciones citotóxicas han sido reportadas en un amplio número de especies de invertebrados incluyendo, esponjas, celenterados, sipuncúlidos, anélidos, artrópodos, equinodermos, protocordados y moluscos (Ratcliffe *et al.*, 1985). Estas reacciones citotóxicas pueden estar mediadas por células de la hemolinfa o por factores hemolíticos del suero. Uno de los modelos experimentales más utilizados para medir la citotoxicidad de hemocitos, o del suero, es la medición de la liberación de la hemoglobina por eritrocitos de diferentes especies (Leippe y Renwranz, 1988; Parrinello *et al.*, 1993).

En moluscos se ha determinado actividad citotóxica para los componentes de la hemolinfa en *Mercenaria mercenaria* (Anderson, 1981), *Corbicula fluminea* (Yoshino y Tuan, 1985) y *Mytilus edulis* (Leippe y Renwranz, 1988). En moluscos pectínidos no existen hasta el momento informes sobre actividad hemolítica de la hemolinfa. Los resultados obtenidos determinaron que tanto en los hemocitos como en el suero de *Argopecten purpuratus* hay moléculas con actividad citotóxica contra eritrocitos de rata. En *Mytilus edulis* se ha demostrado que las células inmunitarias de estos moluscos son capaces de secretar moléculas citotóxicas que causan lisis de eritrocitos en placas de agarosa, las cuales se han denominado hemolisinas (Leippe y Renwranz, 1988).

En los hemocitos de *Argopecten purpuratus* la producción de anión superóxido fue detectada por la reducción del NBT. Al igual que en el ostión del norte, otras especies de bivalvos tales como *Mytilus edulis*, *Crassostrea virginica*, *Ostrea edulis* (Bachère *et al.*, 1991; Anderson y Brubacher, 1995), pectínidos como *Patinopecten yessoensis* (Nakamura *et al.*, 1985) y *Pecten maximus* (Le Gall *et al.*, 1991) presentan producción de anión superóxido. Al incubar los hemocitos con zimosan fue también posible asociar este proceso oxidativo antibacteriano con la fagocitosis. Sin embargo, en otros moluscos bivalvos como *Ruditapes decussatus* y *Cerastoderma edule* (López *et al.*, 1994) se ha determinado que los hemocitos no son capaces de producir radicales tóxicos de oxígeno durante la fagocitosis. La actividad fagocítica se asocia con un aumento de la respiración aeróbica, lo que sugiere un aumento de la producción de O_2^- , por lo que la reducción del NBT se estimula con levaduras o zimosan. Se ha estimado que sólo las células que contienen partículas recién fagocitadas responden positivamente a la prueba del NBT. El efecto de la enzima SOD fue similar al obtenido por Ballarin *et al.* (1994) con hemocitos de *Botryllus schlosseri* y por Carballeda *et al.* (1997) con hemocitos del bivalvo *Mytilus galloprovincialis*. La falta de efecto inhibitorio de la enzima SOD con respecto al control, indicaría la dificultad de los hemocitos en la endocitosis de la enzima.

La caracterización y determinación de la variación estacional en el número de hemocitos, las capacidades fagocíticas y citotóxicas de la hemolinfa de *Argopecten purpuratus* podrían

percentage increased significantly, what would indicate the presence of opsonizing molecules that optimize the phagocytic response (Fryer and Bayne, 1989; Kelly *et al.*, 1993). However, in other species such as the mollusk *Helix aspersa*, the presence of plasmic factors is necessary to perform phagocytosis (Fryer and Bayne, 1989).

Cytotoxic reactions have been reported in a large number of invertebrate species including sponges, coelenterates, sipunculids, annelids, arthropods, echinoderms, protochordates and mollusks (Ratcliffe *et al.*, 1985). These cytotoxic reactions can be mediated by hemolymph cells or by serum hemolytic factors. One of the most used experimental models to assess the cytotoxicity of hemocytes or serum is measuring the liberation of hemoglobin by erythrocytes from different species (Leippe and Renwranz, 1988; Parrinello *et al.*, 1993).

Cytotoxic activity has been determined for the hemolymph components in the mollusks *Mercenaria mercenaria* (Anderson, 1981), *Corbicula fluminea* (Yoshino and Tuan, 1985) and *Mytilus edulis* (Leippe and Renwranz, 1988). Currently, there are not any reports about the hemolytic activity of the hemolymph in pectinid mollusks. Results obtained determined that in the hemocytes as in the serum of *Argopecten purpuratus* there are molecules with cytotoxic activity against rat erythrocytes. Immunitary cells of *Mytilus edulis* have been demonstrated able to secrete cytotoxic molecules that cause lysis of erythrocytes in agarose plates, for which they have been called hemolysines (Leippe and Renwranz, 1988).

In *Argopecten purpuratus* hemocytes, the production of the superoxide anion was detected by the reduction of NBT. As in the scallop, other bivalve species such as *Mytilus edulis*, *Crassostrea virginica*, *Ostrea edulis* (Bachère *et al.*, 1991; Anderson and Brubacher, 1995), pectinidae as *Patinopecten yessoensis* (Nakamura *et al.*, 1985) and *Pecten maximus* (Le Gall *et al.*, 1991) exhibit the production of the superoxide anion. By incubating hemocytes with zimosan it was also possible to relate this antibacterial oxidative process to phagocytosis. However, in other bivalve mollusks such as *Ruditapes decussatus* and *Cerastoderma edule* (López *et al.*, 1994) hemocytes have been determined unable to produce oxygen toxic radicals during phagocytosis. Phagocytic activity is related to an increase in aerobic respiration, suggesting a rise in the production of O_2^- , therefore the decrease of NBT is stimulated with yeasts or zimosan. It has been estimated that only cells that contain recently phagocytosed particles respond positively to the NBT test. The effect of the enzyme SOD was similar to that obtained by Ballarin *et al.* (1994) with hemocytes of *Botryllus schlosseri* and by Carballeda *et al.* (1997) with hemocytes of the bivalve *Mytilus galloprovincialis*. The lack of the inhibitory effect of the enzyme SOD in respect of the control would indicate the difficulty of hemocytes in the endocytosis of the enzyme.

The characterization and determination of the seasonal variation in the number of hemocytes, the phagocytic and cytotoxic capacities of the hemolymph of *Argopecten purpuratus* could become useful parameters in future evaluations of possible modifications that the immune system of mollusks

convertirse en parámetros útiles en la evaluación futura de posibles modificaciones que experimente el sistema inmune de moluscos, frente a determinadas condiciones ambientales, como temperatura, oxígeno disuelto, pH, presencia de iones, metales pesados u otros parámetros abióticos, como también frente a determinados organismos patógenos tales como bacterias, hongos y protozoos en condiciones de cultivo o en ambiente controlado.

Referencias

- Amen, R.I., Baggen, J.M., Bezemer, P.D. and De Jong-Brink, M. (1992). Modulation of the activity of the internal defense system of the pond snail *Lymnaea stagnalis* by the avian schistosome *Trichobilharzia ocellata*. *Parasitology*, 104: 33–40.
- Anderson, R.S. (1981). Inducible haemolytic activity in *Mercenaria mercenaria* hemolymph. *Dev. Comp. Immunol.*, 5: 575–585.
- Anderson, R.S. and Brubacher, L.L. (1995). Intracellular superoxide production by quantitative nitroblue tetrazolium reduction. In: *Techniques in Fish Immunology-4. Immunology and Pathology of Aquatic Invertebrates*, SOS Publications, Fair Haven, NJ, USA. p 113–115.
- Auffret, M. (1988). Bivalve haemocyte morphology. In: W.S. Fischer (ed.), *Diseases Processes in Marine Bivalve Molluscs*. American Fisheries Society, Washington, Special Publication N° 18, pp. 169–177.
- Bachère, E., Hervio, D. and Mialhe, E. (1991). Luminol-dependent chemiluminescence by hemocytes of two marine bivalves, *Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas*. *Dis. Aquat. Org.* 11: 173–180.
- Ballarin, L., Cima, F. and Sabbadin, A. (1994). Phagocytosis in the colonial ascidian *Botryllus schlosseri*. *Dev. Comp. Immunol.*, 18 (6) : 467–481.
- Beaven, A.E. and Paynter, K.T. (1999). Acidification of the phagosome in *Crassostrea virginica* hemocytes following engulfment of zimosan. *Biol. Bull.* 196 (1): 26–33.
- Carballal, M.J., López, C., Azevedo C. and Villalba, A. (1997). *In vitro* study of phagocytic ability of *Mytilus galloprovincialis* Lmk. Haemocytes. *Fish & Shellfish Immunol.*, 7: 403–416.
- Carballal, M.J., Villalba, A. and López, C. (1998). Seasonal variation and effects of age, food availability, size, gonadal development, and parasitism on hemogram of *Mytilus galloprovincialis*. *J. Invertebr. Pathol.*, 72 (3): 304–312.
- Cheng, T.C. (1981). Bivalves. In: N.A. Ratcliffe and A.F. Rowley (eds.), *Invertebrate Blood Cells*. Vols 1 and 2, Academic Press, New York, pp. 233–300.
- Ford, S.E., Kanaley, S.A. and Littlewood, D.T. (1993). Cellular response of oysters infected with *Haplosporidium nelsoni*: changes in circulating and tissue-infiltrating hemocytes. *J. Invertebr. Pathol.*, 61 (1): 49–57.
- Fryer, S.E. and Bayne, C.J. (1989). Opsonization of yeast by the plasma of *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda): a strain-specific, time-dependent process. *Parasite Immunol.*, 11: 269–278.
- Fryer, S.E. and Bayne, C.J. (1990). *Schistosoma mansoni* modulation of phagocytosis in *Biomphalaria glabrata*. *J. Parasitol.*, 76 (1): 45–52.
- Kelly, K.L., Cooper, E.L. and Raftos, D.A. (1993). A humoral opsonin from the solitary urochordate *Styela clava*. *Devel. Comp. Immunol.*, 17: 29–39.
- would undergo before certain environmental conditions as temperature, dissolved oxygen, pH, presence of ions, heavy metals or other biotic parameters, besides before certain pathogen organisms such as bacteria, fungus or protozoa in culture conditions or controlled environment.

English translation by Adrián R. López.

- Lambert, C. and Nicolas, J.L. (1998). Specific inhibition of chemiluminescent activity by pathogenic vibrios in hemocytes of two marine bivalves: *Pecten maximus* and *Crassostrea gigas*. *J. Invertebr. Pathol.*, 71 (1): 53–63.
- La Peyre, J.F., Chu, F.L. and Vogelbein, W.K. (1995). *In vitro* interaction of *Perkinsus marinus* merozoites with eastern and Pacific oyster hemocytes. *Dev. Comp. Immunol.*, 19 (4): 291–304.
- Le Gall, G., Bachère, E. and Mialhe, E. (1991). Chemiluminescence analysis of the activity of *Pecten maximus* hemocytes stimulated with zimosan and host-specific Rickettsiales-like organisms. *Dis. Aquat. Org.* 11: 181–186.
- Leippe, M. and Renwanz, L. (1988). Release of cytotoxic and agglutinating molecules by *Mytilus* hemocytes. *Dev. Comp. Immunol.*, 12: 297–308.
- López, C., Carballal, M.J., Azevedo, C. and Villalba, A. (1997). Differential phagocytic ability of the circulating haemocyte types of the carpet shell clam *Ruditapes decussatus* (Mollusca: Bivalvia). *Dis. Aquat. Organisms*, 30: 209–215.
- López, C., Villalba, A. and Bachère, E. (1994). Absence of generation of active oxygen radicals coupled with phagocytosis by the hemocytes of clam, *Ruditapes decussatus* (Mollusca: Bivalvia). *J. Invertebr. Pathol.*, 64: 188–192.
- Nakamura, M., Mori, K., Inooka, S. and Nomura, T. (1985). *In vitro* production of hydrogen peroxide by the amoebocytes of the scallop *Patinopecten yessoensis* (Jay). *Dev. Comp. Immunol.* 9: 407–417.
- Parrinello, N., Arizza, V., Cammarata M. and Parrinello, D. (1993). Cytotoxic activity of *Ciona intestinalis* (Tunicata) hemocytes: properties of the *in vitro* reaction against erythrocytes targets. *Dev. Comp. Immunol.*, 17: 19–27.
- Pipe, R.K. (1992). Generation of reactive oxygen metabolites by the hemocytes of the mussel, *Mytilus edulis*. *Dev. Comp. Immunol.* 16: 11–122.
- Ratcliffe, N.A., Rowley, A.F., Fitzgerald, S.N. and Rhodes, C.P. (1985). Invertebrate immunity: basic concepts and recent advances. *International Review Cytology*, 97: 183–350.
- Robledo, J.A.F., Santarém, M.M., González, P. and Figueras, A. (1995). Seasonal variations in the biochemical composition of the serum of *Mytilus galloprovincialis* Lmk. and its relationship to the reproductive cycle and parasitic load. *Aquaculture*, 133: 311–322.
- Takahashi, K., Akaike, T., Sato, K., Mori, K. and Maeda, H. (1993). Superoxide anion generation by Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) hemocytes: Identification by electron spin trapping and chemiluminescence analysis. *Comp. Biochem. Physiol.* 105 B: 35–41.
- Yoshino, T.P. and Tuan, T.L. (1985). Soluble mediators of cytolytic activity in hemocytes of the Asian clam, *Corbicula fluminea*. *Dev. Comp. Immunol.*, 9: 515–520.
- Zar, J.H. (1984). *Biostatistical analysis*. Prentice-Hall. New Jersey, 718 pp.