



Instituto Politécnico Nacional
Centro Interdisciplinario de Ciencias
Marinas



Caracterización de la respuesta inmune de la
almeja mano de león *Nodipecten subnodosus*

T e s i s

*Que para obtener el grado de maestro en ciencias
con especialidad en manejo de recursos marinos*

Presenta:

Biólogo Erick Ramses Ramírez Castillo

La Paz, B. C. S.

2005



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
COORDINACION GENERAL DE POSGRADO E INVESTIGACION
ACTA DE REVISION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., siendo las 11:00 horas del día 24 del mes de Junio del 2005 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CICIMAR para examinar la tesis de grado titulada:

"CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE DE LA ALMEJA MANO DE LEÓN

***Nodipecten subnodosus* (Sowerby, 1835) (PECTINIDAE)"**

Presentada por el alumno:

RAMÍREZ

Apellido paterno

CASTILLO

materno

ERICK RAMSÉS

nombre(s)

Con registro:

B	0	3	1	4	6	5
---	---	---	---	---	---	---

Aspirante al grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **SU APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISION REVISORA

Director de tesis
PRIMER VOCAL

DR. MARCIAL ARELLANO MARTÍNEZ

PRESIDENTE

DR. OSCAR EFRAÍN HOLGUÍN QUIÑONES

SECRETARIO

MC. SERGIO FRANCISCO MARTÍNEZ DÍAZ

SEGUNDO VOCAL

DRA. BERTHA PATRICIA CEBALLOS VÁZQUEZ

TERCER VOCAL

DR. ANTONIO LUNA GONZÁLEZ

EL PRESIDENTE DEL COLEGIO

DR. RAFAEL CERVANTES DUARTE





INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
COORDINACION GENERAL DE POSGRADO E INVESTIGACION

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., el día 08 del mes Agosto del año 2005, el (la) que suscribe ERICK RAMSÉS RAMÍREZ CASTILLO alumno(a) del Programa de MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS con número de registro B031465 adscrito al CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de tesis, bajo la dirección de: DR. MARCIAL ARELLANO MARTÍNEZ y cede los derechos del trabajo titulado: "CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE DE LA ALMEJA MANO DE LEÓN
Nodipecten subnodosus (Sowerby, 1835) (PECTINIDAE)"
al Instituto Politécnico Nacional, para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección: erramirez@ipn.mx
Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

ERICK RAMSÉS RAMÍREZ CASTILLO

nombre y firma

DEDICATORIA

MIS PADRES:

GUADALUPE Y JESÚS HERACLIO

MIS HERMANOS:

ROXANA Y JESÚS ALBERTO

MI COMPAÑERA, AMIGA Y PAREJA:

CLAUDIA

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Instituto Politécnico Nacional y al Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas por las facilidades y el apoyo para la realización de esta tesis, así mismo, agradezco a los proyectos financiados por el Instituto Politécnico Nacional CGPI 20038005 y CGPI 20050987, así como al proyecto CONACYT- SEMARNAT 2002-C01-0277 a cargo del Dr. Marcial Arellano Martínez. También, agradezco a la Sociedad de Producción Pesquera Pescadores Unidos de Guerrero Negro, B.C.S. por las facilidades prestadas para la colecta de los organismos. Así también, agradezco al Laboratorio de Histología del CIBNOR por las facilidades prestadas al capturar las imágenes de los Hemocitos, Gracias.

Agradezco enormemente a mi familia por todo el apoyo brindado a pesar de la distancia, a mis padres, Guadalupe y Jesús Heraclio, y a mis hermanos, Roxana y Jesús Alberto. Gracias por estar conmigo siempre, así como yo siempre estoy con ustedes donde quiera que estén. Los Quiero Muchísimo

Especialmente, agradezco todo el apoyo brindado por mi Chiquita, Claudia, que siempre ha estado conmigo en las muy buenas, las buenas, las malas y las muy malas, apoyándome en todo momento y haciendo que las cosas no se hicieran tan difíciles en todo este tiempo, gracias por tolerarme así como soy, Gracias a todos.

Agradezco al Dr. Marcial Arellano Martínez y la Dra. Berta Patricia Ceballos Vázquez por su orientación y apoyo, desde el inicio hasta el fin de esta aventura, por sus llamadas de atención y sobre todo por su amistad. También agradezco a mi comité revisor, al Dr. Antonio Luna Gonzáles de la UABCS, al Dr. Oscar Holguín Quiñones y al M.C. Sergio Martínez Díaz por sus

regaños y su orientación para que este trabajo quedara terminado. Gracias a todos ustedes.

Agradezco a la Universidad Autónoma de Baja California Sur por las facilidades otorgadas para llevar a cabo el montaje del experimento en sus instalaciones de Pichilingue, a los técnicos que ayudaron al montaje del mismo, y a los técnicos encargados de la elaboración del alimento para el mantenimiento de los organismos, a todos ellos muchas gracias. También agradezco al Laboratorio de Invertebrados Marinos del CICIMAR por las facilidades y la ayuda prestada al momento de realizar el procedimiento de histología, gracias a todos los que allí laboran. Además, agradezco a toda la plantilla de Profesores que me impartieron clases, gracias por sus consejos y su orientación.

Y por ultimo, agradezco a todos mis compañeros, a mi carnal Fredy que me dio asilo en un periodo de esta aventura y que se lo agradeceré eternamente, a Bety, Carlos y a todos ustedes, mis amigos, que me brindaron su amistad desinteresadamente, y que saben que si los nombro a todos, la lista de todos sería mucho más grande que el contenido de la tesis. Les agradezco a todos las grandes aventuras que pasamos juntos en estos dos años que se fueron volando, y que en verdad no olvidare nunca, recuerden que siempre estarán en mi memoria, y donde quiera que estemos en un futuro, algún día nos volveremos a encontrar para realizar nuevas cosas y revivir los recuerdos.

Gracias a todas las personas que participaron desinteresadamente para que este proyecto se llevara a cabo y se concluyera satisfactoriamente, no tengo como agradecerles y estoy en deuda con ustedes.

¡¡¡ Gracias, Muchas Gracias, Que más les puedo decir!!!

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	iii
ÍNDICE DE TABLAS.....	iv
RESUMEN.....	v
ABSTRACT.....	vi
GLOSARIO.....	vii
1. INTRODUCCION.....	1
2. ANTECEDENTES.....	6
3. HIPOTESIS.....	14
4. OBJETIVOS.....	15
4.1. Objetivo general.....	15
4.2. Objetivos específicos.....	15
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
5.1. Colecta de organismos.....	16
5.2. Cepa bacteriana.....	17
5.3. Experimento I.....	17
5.3.1. Dosis letal y subletal de <i>V. alginolyticus</i>	17
5.4. Experimento II.....	18
5.4.1. Infección de organismos con la dosis subletal de <i>V. alginolyticus</i>	18
5.4.2. Extracción de la hemolinfa.....	18
5.4.3 Cuantificación de hemocitos.....	19
5.4.4. Medición del diámetro de los hemocitos.....	19
5.4.5 Separación del plasma y hemolinfa.....	20
5.4.6. Determinación de las enzimas hidrolíticas.....	21
5.4.7. Detección de la actividad de la lisozima.....	22
5.4.8. Análisis bioquímico de la hemolinfa.....	22
5.4.9. Análisis histológicos.....	23
5.5. Análisis estadístico.....	23
6. RESULTADOS.....	24
6.1. Determinación de la dosis subletal.....	24
6.2. Cuantificación de hemocitos.....	26
6.3. Medición del diámetro de los hemocitos.....	28

6.4. Medición del área de los hemocitos.....	30
6.5. Detección de la actividad enzimática.....	32
6.5.1. Detección de la actividad enzimática en SLH.....	32
6.5.2. Detección de la actividad enzimática en plasma.....	34
6.6. Detección de la actividad de la lisozima.....	36
6.6.1. Detección de la actividad de la lisozima en SLH.....	36
6.6.2. Detección de la actividad de la lisozima en plasma.....	37
6.6.3. Relación de la actividad de lisozima en SLH y número de hemocitos	38
6.6.4. Relación de la actividad de lisozima en plasma y número de hemocitos.....	39
6.7. Análisis bioquímicos.....	40
6.7.1. Proteínas.....	40
6.7.2. Carbohidratos y Lípidos.....	42
6.8. Medición de temperatura.....	44
6.9. Análisis histológicos.....	45
7. DISCUSIÓN.....	46
8. CONCLUSIONES.....	55
9. RECOMENDACIONES.....	56
10. BIBLIOGRAFÍA.....	57
ANEXOS.....	73

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Tanque de alimentación y producción de alimento para el mantenimiento de los organismos.....	16
Figura 2. Extracción de hemolinfa de los organismos.....	19
Figura 3. Muestra de hemolinfa donde se observan los hemocitos.....	20
Figura 4. Placas utilizadas para la detección de enzimas hidrolíticas del kit APIZYM.....	21
Figura 5. Sobrevivencia de <i>N. subnodosus</i>	25
Figura 6. Número de hemocitos cuantificados en los controles.....	26
Figura 7. Número de hemocitos cuantificados en los tratamientos.....	27
Figura 8. Diámetros de hemocitos en los controles.....	28
Figura 9. Diámetro de hemocitos con su desviación estándar y el control	29
Figura 10. Promedio de áreas de los controles.....	30
Figura 11. Áreas de los hemocitos con su desviación estándar y el control.....	31
Figura 12. Placas de agar utilizados para la detección de lisozima.....	36
Figura 13. Comparación de las concentraciones de lisozima en SLH y número de hemocitos.....	38
Figura 14. Comparación de las concentraciones de lisozima en plasma y número de hemocitos.....	39
Figura 15. Concentraciones de proteínas en el experimento.....	41
Figura 16. Concentraciones de lípidos y carbohidratos.....	43
Figura 17. Promedio de temperaturas durante el experimento.....	44
Figura 18. Observaciones histológicas.....	45

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Actividad enzimática del SLH.....	31
Tabla 2. Actividad enzimática del plasma.....	33
Tabla 3. Concentraciones de lisozima en plasma y SLH.....	35

RESUMEN

En moluscos bivalvos, el efecto hidrolítico de las enzimas lisosomales es uno de los mecanismos más importantes en la degradación de organismos patógenos dentro o fuera de los hemocitos. Por lo tanto, la actividad enzimática en la hemolinfa se ha estudiado ampliamente como indicador de la capacidad inmune en muchas especies de bivalvos. El objetivo de este trabajo fue caracterizar la respuesta inmune de la almeja mano de león *Nodipecten subnodosus* mediante el estudio de las enzimas lisosomales al ser retada con *Vibrio alginolyticus*. Primero se determinó la dosis subletal de *V. alginolyticus*, usando 5 lotes de 8 organismos cada uno y probando 5 concentraciones (10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 UFC.mL⁻¹) durante un período de 10 días. Otro lote sirvió como control, inyectando solución salina a las almejas. Para analizar la respuesta inmune, 5 lotes de 6 almejas cada uno, fueron inyectados con la dosis subletal (1×10^5 UFC.mL⁻¹); 4 organismos por cada tratamiento sirvieron como control. Después de 6 y 24 h y 3, 6 y 10 d se obtuvieron muestras de hemolinfa (6 mL) del músculo aductor usando una jeringa estéril de 5 mL. En cada caso, los hemocitos fueron cuantificados (hemocitos/mL) con un hematocitómetro y se obtuvo el diámetro y área de los mismos. Por otra parte, se separaron los hemocitos del plasma por centrifugación ($500 \times g/10 \text{ min}/4 \text{ }^{\circ}\text{C}$). Después, los hemocitos se rompieron por congelamiento-descongelamiento para obtener el sobrenadante de lisado de hemocitos (SLH). Las enzimas hidrolíticas fueron determinadas en plasma y SLH con el kit API ZYM (BioMérieux) y lisoplasas. La actividad enzimática fue reportada en relación con la concentración proteica de las muestras. Se realizó un análisis histológico en glándula digestiva, músculo, gónada, branquia y manto para verificar un posible daño en estos tejidos y se analizó la variación en la composición bioquímica de la hemolinfa. La cantidad de hemocitos fue significativamente menor (ANDEVA, $P=0.03$) 6 h después del reto, mientras que los hemocitos fueron significativamente más grandes (ANDEVA, $P=0.01$). De las 19 enzimas que detecta el kit API ZYM, solamente se encontraron 11 en SLH y 6 en plasma. La actividad enzimática fue significativamente mayor (ANDEVA, $P=0.000$) en hemocitos que en plasma. Las enzimas de mayor actividad fueron leucil arilamidasa y esterasa, tanto en plasma como en SLH. La actividad de la lisozima no mostró diferencias significativas (ANDEVA, $P=0.05$) entre los tiempos de muestreo, aunque en plasma las concentraciones fueron significativamente mayores (ANDEVA, $P=0.041$) que en SLH. Con la dosis subletal las almejas presentaron cantidades más bajas de hemocitos a las 6 h, 3d, y 6 d. Esto pudo deberse a su lisis, degranulación y/o movimiento hacia los tejidos (diapedesis) provocados por las bacterias mientras se combatía la infección. Sin embargo, a las 24 h el número de hemocitos fue mayor que el del control mientras que su diámetro fue menor. Al parecer la hematopoyesis fue inducida por la infección bacteriana, como puede apreciarse por la variación en el número y el diámetro de los hemocitos. Las enzimas con mayor actividad, leucil arilamidasa y esterasa, son las responsables del cambio en la conformación de la pared celular de las bacterias. Asimismo, la lisozima actúa destruyendo la pared celular bacteriana, provocando que la degradación bacteriana sea más fácil. La mayor actividad de lisozima en plasma sugiere que ésta fue liberada por los hemocitos al plasma durante el estrés patológico causado por *V. alginolyticus*. Las concentraciones de lípidos y carbohidratos no mostraron una relación aparente con la respuesta inmunológica. Tampoco se encontraron daños aparentes en los diferentes tejidos analizados.

ABSTRACT

The hydrolytic effect of the different lysosomal enzymes is one of the most important mechanisms in the degradation of pathogenic organisms inside or outside the haemocytes in bivalve mollusks. Therefore, the enzymatic activity in hemolymph has been extensively studied as indicator of the immune capacity in many species of bivalves. The objective of this work was to analyze the immune response of the lion's paw scallop *Nodipecten subnodosus* to the challenge with *Vibrio alginolyticus*. First, the sublethal dose of *V. alginolyticus* was determined using 5 lots with 8 organisms each one and testing 5 concentrations (10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 UFC.mL⁻¹) during a period of 10 days. Another lot served as control, injecting the clams with saline solution. To analyze the immune response, 5 lots of 6 organisms were injected with the sublethal dose (10^5 UFC.mL⁻¹); 4 organisms served as control by treatment. After 6 and 24 h and 3, 6 and 10 d, samples of hemolymph (6 mL) were obtained from the adductor muscle using a 5 mL sterile syringe. In each case, haemocytes were quantified (haemocytes/mL) with a hemacytometer, and its diameter and area were obtained. The haemocytes were separated from the plasma by centrifugation (500 x g/10 min/4 °C). Then, haemocytes were broken by freeze-thaw to obtain the supernatants (SLH) of the cellular debris. Hydrolytic enzymes were determined in plasma and SLH with the API ZYM kit (BioMérieux) and lysoplate assay. Enzymatic activity was reported in relation with the protein concentration of samples. An histological analysis in digestive gland, muscle, gonad, till and mantle was made to verify for a possible damage in the tissues, and the variation in the biochemical composition of the hemolymph was analyzed. The quantity of haemocytes was significantly lower (ANOVA, $P=0.03$) 6 h after challenge, whereas the haemocytes were significantly larger (ANOVA, $P=0.01$). Of the 19 enzymes that can be detected by the API ZYM kit, only 11 may be characterized in SLH and 6 in plasma. The enzymatic activity was significantly higher (ANOVA, $P=0.000$) in haemocytes than in plasma. The enzymes with higher activity were leucyl arylamidase and esterase in both, SLH and plasma. Lysozyme-like activity did not show significant differences (ANOVA, $P=0.05$) between the sampling times, however, in plasma it was significantly higher than in SLH. With the sublethal dose, animals showed lower haemocyte numbers at 6 h, 3d, and 6 d. This may be due to their lysis, degranulation and/or movement into tissues (diapedesis) provoked by bacteria while fighting infection. However, at 24 h haemocyte number was higher than the control and cell diameter was lower. It seems that hematopoiesis was induced by the bacterial infection, as it could be seen by the number and diameter of haemocytes. The enzymes with higher activity, leucyl arylamidase and esterase, are the responsible of the change in the conformation of the cell wall of the bacteria. Also, lysozyme acts destroying the bacterial cell wall, making the bacterial degradation easier. The higher lysozyme-like activity in plasma suggests that lysozyme was released from haemocytes into plasma during the pathological stress caused by *V. alginolyticus*. The lipid and carbohydrates concentration didn't show apparent relation with the immunological response. In the different tissues, didn't apparent damages were found.

GLOSARIO

Bacteria	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
Bivalvos	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
Cepa	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
Célula	Unidad, morfológica y fisiológica que compone el cuerpo de todos los seres vivos; generalmente microscópica
Diapédesis	El movimiento de hemocitos de un epitelio intacto para retirar productos metabólicos, toxinas u organismos infecciosos del cuerpo
Enfermedad	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

Fagocitosis	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
Filtración	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
Hemolisina	Sustancia capaz de originar la ruptura (lisis) de la membrana de los glóbulos rojos
Huésped	Organismo en el cual, o dentro del que otro organismo crece y deriva su alimentación
Infección	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
Lisosoma	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
Necrosis	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
Patogenicidad	La capacidad de un organismo para producir una enfermedad
Patógeno	Algo causante de una enfermedad, por ejemplo virus, bacterias, etc.

Patología	Es la ciencia que estudia la enfermedad incluyendo la naturaleza y causa de la misma, así como los cambios estructurales y funcionales resultantes
Sistema inmune	Complejo de estructuras y funciones de un organismo que lo hace resistente a las enfermedades
Susceptible	Capaz de recibir modificación o impresión
Toxina	Sustancia venenosa secretada por ciertos organismos
Veliger	Se refiere a cualquier larva de molusco que posea un velo, que es el órgano natatorio ciliado
Vibriosis	Enfermedad causada por bacterias del género <i>Vibrio</i>
Virulencia	La habilidad de un microorganismo para producir una enfermedad

1. INTRODUCCIÓN

Los pectínidos, son moluscos bivalvos pertenecientes a la familia Pectinidae, de la cual se conocen 32 géneros y 400 especies, algunas con un gran potencial para el desarrollo de su cultivo en condiciones controladas (Uriarte *et al.* 2001). El alto valor comercial alcanzado por algunas especies de pectínidos en los mercados nacionales e internacionales, ha provocado la reducción de las poblaciones naturales y en algunos casos se ha llegado a la sobreexplotación (Uriarte *et al.* 2001).

De las 400 especies de pectínidos conocidas en el mundo, 30 se encuentran en el Pacífico mexicano; sin embargo, sólo tres son de importancia comercial: la almeja catarina *Argopecten ventricosus*, la almeja voladora *Pecten vogdesi* y la almeja mano de león *Nodipecten subnodosus* (Keen y Coan 1974).

En el estado de Baja California Sur, la almeja mano de león *N. subnodosus* tiene una gran importancia comercial debido a su gran demanda a nivel internacional, ya que su músculo aductor tiene un buen sabor y alcanza un gran tamaño (Arellano-Martínez 2005). La explotación de esta especie se restringe a la región noroeste del estado, principalmente en la Laguna Ojo de Liebre, B.C.S., donde se mantiene una pesquería constante (Morales-Hernández y Cáceres-Martínez 1996) pero con un periodo de veda amplio (julio a noviembre). Así, debido a las restricciones en su pesquería y a que alcanza su talla comercial en un periodo relativamente corto (Gutiérrez-Villaseñor y Chi-Barragán 1997, Villalejo-Fuerte *et al.* 2004), ha sido necesario por un lado y factible por el otro, establecer cultivos de mano de león en

algunas zonas del estado de B.C.S., entre ellas las Lagunas Guerrero Negro, San Ignacio y Manuela.

En general, se considera que el principal problema que se afronta en el cultivo de pectínidos es el conjunto de enfermedades que afectan a los organismos (Barbosa *et al.* 2001), estas enfermedades son difíciles de detectar en su medio natural, por lo que en muchos casos estos agentes infecciosos han sido poco estudiados (Barbosa *et al.* 2001).

Al concentrar gran cantidad de organismos en una zona, como es el caso de un cultivo, se puede incrementar el riesgo de incidencia de enfermedades, posiblemente por la inducción a una inmunosupresión, aumentando el riesgo del ataque de parásitos y patógenos (Harvell *et al.* 1999).

Las bacterias forman parte de la flora autóctona de los organismos marinos y de su ecosistema, llegando a representar hasta un 60% de la población de microorganismos totales en algunas lagunas costeras (Simudu y Tsukamoto 1985). Sin embargo, una proliferación excesiva de bacteria patógena es lo que puede provocar enfermedades en los organismos. En este sentido, se sabe que las larvas muertas, los desechos orgánicos de los animales, así como la presencia de animales muertos son los principales vectores de la proliferación bacteriana (Elston *et al.* 1981).

La incidencia del genero *Vibrio* es considerado el problema más común y serio de sanidad en los sistemas de cultivo de moluscos, ya que causa enfermedades y mortalidades masivas (Elston 1984, Tubiash y Otto 1986, Sindermann 1988). Se ha corroborado que diferentes especies de bacterias de este género (*V. alginolyticus*, *V.*

natrieigens, *V. pectenica*, *V. tapetis*, *V. splendidus* y *V. anguillarum*) participan en enfermedades mortales de algunos invertebrados marinos, lo que ocasiona un deterioro en los sistemas de cultivo.

Por otra parte, todos los organismos multicelulares poseen varios sistemas de defensa contra los microorganismos invasores (Muta e Iwanaga 1996). Estos sistemas de defensa son esenciales para su sobrevivencia y perpetuidad. Los invertebrados, los cuales no tienen inmunoglobulinas, han desarrollado mecanismos únicos de detección y respuesta contra antígenos microbianos. Las células efectoras de invertebrados pueden reconocer patrones moleculares más que estructuras particulares en el patógeno. Existen moléculas asociadas a patógenos que no son encontradas en organismos multicelulares como lipopolisacáridos, peptidoglucanos y ácido lipoteicoico de bacterias, β -1,3-glucanos de hongos y ARN de doble cadena en virus (Muta e Iwanaga 1996, Song y Huang 2000). En invertebrados la coagulación de la hemolinfa (Iwanaga *et al.* 1992, Iwanaga 1993, Muta e Iwanaga 1996) y la formación de melanina son esenciales para dicha respuesta (Aspan y Söderhäll 1991, Söderhäll *et al.* 1994, Fujimoto *et al.* 1995, Kawabata *et al.* 1995).

En particular, el sistema inmune de los moluscos está representado por hemocitos, proteínas plasmáticas y reacciones que involucran componentes celulares y humores (Vargas-Albores y Barracco 2001). La distribución uniforme de dichos componentes a través de todo el organismo se logra debido a que los moluscos bivalvos tienen un sistema circulatorio abierto compuesto por senos (Allam y Paillard 1998), lo cual optimiza su respuesta inmune. La defensa inmediata de este grupo de organismos se da mediante la acción de los hemocitos, la cual consiste,

principalmente, de la fagocitosis, del encapsulamiento (cuando los patógenos son demasiado grandes para ser fagocitados), o bien, removiéndolos del huésped por migración a través de las membranas epiteliales (diapénesis) (Fisher 1988). Los hemocitos participan en la eliminación de material extraño en los moluscos bivalvos principalmente a través de la fagocitosis (Cheng *et al.* 1975, Rodrick y Ulrich 1984, Anderson *et al.* 1992, Carballal *et al.* 1998). Las enzimas lisosomales dentro de los hemocitos, matan y degradan las partículas fagocitadas y si es necesario son liberadas de la célula al plasma u otros tejidos (Cheng *et al.* 1975, Cajaraville *et al.* 1995, Bachère *et al.* 1995) donde pueden modificar la conformación molecular de la membrana celular y con ello favorecer su reconocimiento y fagocitosis (Cheng 1981, 1983, Cajaraville *et al.* 1995). Durante el proceso de fagocitosis, el hemocito destruye las partículas fagocitadas por medio de moléculas que incluyen enzimas hidrolíticas, péptidos antimicrobianos y radicales libres (mecanismos oxidativos). Así, en los moluscos bivalvos, los mecanismos de defensa constan, además de los hemocitos y enzimas hidrolíticas, de mecanismos oxidativos como las reacciones intermedias de oxígeno (IRO) y nitrógeno (IRN), la profenoloxidasas (proFO), péptidos antimicrobianos (PAM) y lectinas (Luna-González, 2003).

Ya que la actividad enzimática en la hemolinfa ha sido estudiada como indicadora de la capacidad inmune en muchas especies de bivalvos (Cheng 1976, Moore y Gelder 1985), el entendimiento de la respuesta inmune de *N. subnodosus* al ataque de infecciones bacterianas, puede ayudar a diseñar estrategias para el control de enfermedades causadas en los cultivos de esta especie.

Así, este trabajo pretende analizar la respuesta inmunológica de la almeja mano de león *N. subnodosus* al ser retada con la bacteria *Vibrio alginolyticus*, mediante la caracterización de la actividad enzimática; así como determinar el efecto sobre su condición fisiológica.

2. ANTECEDENTES

El sistema inmune de moluscos bivalvos ha sido investigado en pocas especies, la mayoría de los trabajos han centrado su atención en los mejillones *Mytilus edulis*, *M. galloprovincialis*, y en el ostión americano *Crassostrea virginica* (Hine 1999, Carballal *et al.* 1997, Pipe *et al.* 1997), las cuales son especies de importancia comercial, aunque el género *Mytilus* tiene también una particular importancia ecológica pues es utilizado como indicador para el monitoreo ecológico (Wootton *et al.* 2003).

Muchos bivalvos marinos de interés comercial han sido expuestos a patógenos, especialmente en los primeros estadios de vida, en su mayoría para caracterizar la respuesta de los organismos al ataque de vibrios o estimar la dosis letal. Así, Sainz *et al.* (1997) indujeron a larvas de *Argopecten ventricosus* a una vibriosis con *V. alginolyticus* a diferentes concentraciones para determinar su resistencia a la virulencia y describir la vibriosis en esta especie, encontrando que las larvas infectadas con bajas concentraciones y el control mostraron una sobrevivencia del 80% del sexto al decimonoveno día. También encontraron que las concentraciones mayores a 5×10^6 UFC•mL⁻¹ presentaron los síntomas de vibriosis y mortalidades masivas.

Anguiano-Beltrán *et al.* (1998) estudiaron la patogenicidad de *V. alginolyticus* en larvas y postlarvas de *Haliotis rufescens*, mediante infecciones inducidas con concentraciones desde 1×10^2 hasta 1×10^6 UFC•mL⁻¹. Ellos observaron que *V. alginolyticus* causa mortalidades masivas en larvas durante las primeras 24 horas a

concentraciones arriba de 1×10^5 UFC•mL⁻¹, mientras que en las postlarvas se requiere una concentración de 1×10^6 UFC•mL⁻¹ para provocar el mismo efecto.

Hauton *et al.* (2001) estimaron la respuesta de los lisosomas de los hemocitos mediante una inoculación bacteriana con *Listonella anguillarum* en *Ostrea edulis*, *Crassostrea gigas* y *Pecten maximus* y encontraron que la estabilidad de la membrana lisosomal fue reducida en presencia de la bacteria para las tres especies, pero aparentemente *C. gigas* fue mas sensible a la presencia de *L. anguillarum*. También mencionan que para las tres especies de bivalvos la reducción en la estabilidad, aparentemente es proporcional al crecimiento poblacional de las bacterias.

La actividad lisozomal en ostras fue descrita por primera vez en la hemolinfa y mucus del manto de *Crassostrea virginica* por McDade y Tripp (1967a, b) y se ha llegado a sugerir que su actividad puede ser un indicador de la condición fisiológica y la vitalidad del sistema de defensa del animal (Chu y La Peyre 1989). La actividad lisozomal fue comparada en tres poblaciones separadas de *O. edulis*, encontrando niveles significativamente altos de lisozima en la hemolinfa del grupo de organismos que presentó menor susceptibilidad ante *Bonamia ostreae* (Hawkins *et al.* 1992).

La actividad enzimática en la hemolinfa ha sido muy estudiada como uno de los indicadores de la capacidad inmunológica en muchas especies de bivalvos como *Mercenaria mercenaria* (Cheng 1976, Moore y Gelder 1985, Cheng 1988), *C. virginica* (Cheng 1976, Moore y Gelder 1985, Cheng 1988, Cheng y Downs 1988, Chu y La Peyre 1989), *Mya arenaria* (Beckmann *et al.* 1992), *Tiostrea chilensis* (Hine

y Wesney 1994) y *Mytilus galloprovincialis* (Carballal *et al.* 1997 y Torreilles *et al.* 1997).

Biosca y Amaro (1996) midieron, utilizando el kit API ZYM, la actividad enzimática del biotipo 1 y 2 de *V. vulnificus* en varias especies de peces y una anguila. Ellos encontraron que los productos extracelulares de la bacteria presentaban altos niveles de actividad hidrolítica, además demostraron la existencia de citotoxicidad en todas las especies de peces estudiados y en la anguila encontraron que estos productos extracelulares fueron letales.

Carballal *et al.* (1997) determinaron las enzimas hidrolíticas de *M. galloprovincialis* mediante el kit API ZYM para evaluar las variaciones estacionales y las variaciones respecto a la edad, ellos reportaron actividad enzimática de fosfatasas, esterases, proteasas y glucosidasas, y encontraron diferencias significativas en la actividad enzimática durante el periodo de estudio.

López-Cortes *et al.* (1999) realizaron un estudio para medir la actividad fagocítica y de quimioatracción de los hemocitos de *Tapes decussatus* y *T. philippinarus*, mediante la infección con *V. tapetis* y *E. coli*. Ellos encontraron que los productos extracelulares de los dos tipos de cepas son quimioatrayentes para los hemocitos, aunque los índices de migración de hemocitos fueron significativamente diferentes entre las dos cepas.

En la mayoría de los estudios sobre respuesta inmune, el análisis concierne sólo a algunas enzimas. Sin embargo, el proceso de resistencia a una infección puede involucrar una reacción general más 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).

El papel bactericida de las hidrolasas lisosomales en los bivalvos fue reportado inicialmente por McDade y Tripp (1967a). Ellos reportaron que las lisozimas de *C. virginica* inhiben el crecimiento bacteriano de *Micrococcus lysodeikticus*, *Bacillus subtilis* y *B. megaterium*. Alternativamente, reportaron que la hemolinfa de la ostra no afectó el crecimiento de otras especies de bacilos como *E. coli*, *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *S. aureus*, *Serratia marcescens*, *Shigella sonnei*, *S. faecalis*, *S. faecalis* variedad *zymogenes*, *S. lactus* y *S. pyrogenes*. Subsecuentemente, Rodrick y Cheng (1974) demostraron que la lisozima en *C. virginica* causaba la lisis de *E. coli*, *Gaffkya tetragena*, *Salmonella pullorum*, *S. sonnei*, *M. lysodeikticus*, *B. subtilis* y *B. megaterium*. Sin embargo, no fue activa contra *S. aureus*.

Desde los primeros estudios de McDade y Tripp (1967b) y Rodrick y Cheng (1974), se ha demostrado que el crecimiento *in vivo* e *in vitro* de hemocitos retados con bacterias inducen la hipersíntesis y la subsecuente liberación de enzimas lisosomales las cuales juegan un rol de protección (Cheng 1978, 1979, 1983).

Tripp (1992) midió la capacidad fagocítica de los hemocitos de *M. mercenaria* con 3 tipos de bacterias y células sanguíneas; encontró que la fagocitosis en hemocitos de *M. mercenaria* es muy fuerte pero aparentemente no es un proceso específico.

López *et al.* (1997) estudiaron a *Ruditapes decussatus*, una de las especies de mayor importancia comercial en Europa. Las poblaciones de esta especie son

afectadas por dos especies de epibiontes importantes: *Perkinsus atlanticus* (Azevedo 1989) y *Vibrio tapetis* (Paillard *et al.* 1994, Borrego *et al.* 1996). También se ha estudiado la caracterización morfológica de los hemocitos y la habilidad de fagocitar de esta especie. López *et al.* (1997) encontraron dos tipos de células, los hialinocitos y los granulocitos y se ha comprobado que los granulocitos tienen mayor habilidad fagocítica que los hialinocitos (López *et al.* en prensa).

El papel de las lisozimas en los hemocitos y sus componentes enzimáticos en la respuesta inmune de los moluscos bivalvos es muy reconocido (Chu 1988). Las lisozimas están dentro de los hemocitos granulares de muchos bivalvos (Rodrick y Cheng 1974) y son liberadas por procesos de degranulación durante la fagocitosis (Darnell *et al.* 1986). En cuanto a la liberación de enzimas líticas, la membrana lipídica de los lisosomas puede desestabilizarse durante el curso normal del proceso inmune (Mohandas *et al.* 1985).

Chu y La Peyre (1989) midieron el efecto de los factores ambientales y el parasitismo sobre las concentraciones proteicas y de lisozima en *C. virginica* y encontraron que las concentraciones de proteína y la lisozima presentan fluctuaciones a lo largo del año, siendo mayores durante el verano y sin una aparente relación con la infección de *P. marinus*.

La circulación de hemocitos juega un rol esencial en los mecanismos de defensa de los invertebrados, ya que estos son los encargados de la actividad fagocítica y la secreción de los factores humorales (Pipe *et al.* 1997). Los principales estudios relacionados con las características de los hemocitos se centran en las especies de moluscos bivalvos de mayor interés económico como *C. gigas*,

C. virginica, *M. edulis*, *M. galloprovincialis*, *P. maximus*, ya que los ataques de parásitos provocan altas mortalidades y grandes pérdidas económicas (Tubhías *et al.* 1965, Sugumar *et al.* 1998, Vargas-Albores y Barracco 2001). Las descripciones morfológicas e histoquímicas han ayudado a entender los mecanismos de defensa de los invertebrados, como lo es la fagocitosis y la digestión intracelular (Auffret 1989). Por esto, la necesidad de información básica de la fisiología (Fisher y Newell 1986, Fisher *et al.* 1987) y patología (Balouet *et al.* 1986, Poder y Auffret 1986, Cooper *et al.* 1982) de los hemocitos de las especies de bivalvos nos pueden indicar como se comporta el sistema inmunológico dependiendo de las variaciones del ambiente. Renwranz *et al.* (1979) reportaron tres subpoblaciones de granulocitos y una población simple de hialinocitos como el resultado de un estudio morfométrico en *C. virginica*. Estos fueron divididos en hialinocitos y granulocitos pequeños, medianos y grandes. Los hemocitos granulares son comúnmente llamados fagocitos (Auffret 1988), aunque los hialinocitos también tienen capacidad fagocítica (Le Gall *et al.* 1991, Mortensen y Glette 1996).

Una de las técnicas que se ha utilizado para la caracterización de los tipos de células circulantes en el plasma es la citometría, la cual se ha usado rutinariamente en investigaciones biomédicas de vertebrados. La primera descripción de citometría como una herramienta para la caracterización de hemocitos de bivalvos fue publicada por Thompson (1977), en un trabajo con *P. magellanicus*, seguido por Friedl *et al.* (1988) en el inicio de los estudios de la patología en bivalvos. Esta técnica ha sido usada para describir las características de las poblaciones de hemocitos (Álvarez *et al.* 1989, Renault *et al.* 2001), o los cambios asociados con la

patología o el estrés ambiental (Bass *et al.* 1983, Rothe y Valet 1990, Van-Eeden *et al.* 1999).

Cheng *et al.* (1980) sometieron hemocitos de *C. virginica* a centrifugación por gradiente diferencial discontinuo, reportando cuatro subpoblaciones de granulocitos y una subpoblación de hialinocitos. Además, el resultado probó las diferentes habilidades de los granulocitos de cada subpoblación mediante la detección de algunas lectinas. Esto sugiere que hay diferencias funcionales entre los granulocitos de cada subpoblación (Cheng *et al.* 1980).

Auffret (1989) realizó un estudio comparativo de los hemocitos de *O. edulis* y *C. gigas*. En el estudio encuentra que en ambas especies hay un tipo de hemocito granular que se caracteriza por tener gránulos citoplásmicos conspicuos de similitudes morfológicas y citoquímicas. Además, observó que en *C. gigas* hay un tipo de gránulos suplementarios, los gránulos acidofílicos y un nuevo tipo de células llamadas hemocitos vesiculares.

Ford *et al.* (1994) hace una comparación de varios métodos citométricos y microscópicos en los hemocitos de *C. virginica*, como el microscopio por fase de contraste de luz, la citometría de flujo y el Coulter counter. Los autores reportaron que los resultados obtenidos con los dos métodos automáticos estuvieron inversamente relacionados con la complejidad, y el tipo y talla, de las células que fueron analizadas. También mencionan que la microscopia genera información más detallada, pero las mediciones con citometría de flujo claramente sobrepasaron la habilidad discriminatoria del Coulter counter. Por último, mencionan que la citometría de flujo describió tres subpoblaciones de hemocitos: dos granulares y una agranular.

Pipe *et al.* (1997) separan y caracterizan los hemocitos de *Mytilus edulis* mediante gradientes continuos de Percoll. Separan los hemocitos en tres capas distintas, la primera compuesta de 97% de células basofílicas, la tercera compuesta de 84% de células eosinofílicas y la capa media compuesta de una mezcla de células eosinofílicas y basofílicas. Además, encuentran varias enzimas asociadas a las capas celulares.

Dyrynda *et al.* (1997) determinan las subpoblaciones de hemocitos en adultos de *M. edulis*, utilizando los anticuerpos monoclonales. Encuentran reacción en cinco tipos de anticuerpos en células de larva trocofora y veliger, por lo que sugieren que los epitopes en adultos están presentes en muchos estadios tempranos del desarrollo.

En *C. gigas*, *M. edulis*, *R. 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, Pipe 1990a y b, Noël *et al.* 1994, Friebe y Renwanz 1995, López *et al.* 1997, 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.

3. HIPÓTESIS

La almeja mano de león, *Nodipecten subnodosus*, presentará una reacción inmunológica evidente cuando ésta sea infectada con una dosis subletal de *Vibrio alginolyticus*, controlando la infección a medida que el patógeno sea eliminado y logrando que su sistema se normalice.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Caracterizar la respuesta inmune de la almeja mano de león *Nodipecten subnodosus* mediante el estudio de las enzimas lisosomales, al ser retada con la bacteria *V. alginolyticus*.

4.2. Objetivos específicos

1. Determinar la dosis subletal de *V. alginolyticus* APSA2 para *N. subnodosus*.
2. Cuantificar el número total de hemocitos en la hemolinfa de *N. subnodosus* retada con una dosis subletal de *V. alginolyticus* APSA2.
3. Determinar las enzimas lisosomales en la hemolinfa de *N. subnodosus* retada con una dosis subletal de *V. alginolyticus* APSA2.
4. Determinar la variación de la composición bioquímica en la hemolinfa de *N. subnodosus* después de ser retada con una dosis subletal de *V. alginolyticus* APSA2.
5. Determinar las lesiones en el tejido de los organismos después de ser retados con la dosis subletal de *V. alginolyticus* APSA2.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Colecta de organismos

En total, se obtuvieron 117 almejas de entre 7 y 10 cm de largo proporcionadas por la Sociedad de Producción Pesquera Pescadores Unidos de Guerrero Negro, B.C.S. Estas provenían de un sistema de cultivo en suspensión, localizado en la laguna Guerrero Negro, B.C.S., México y se trasladaron vivas a las instalaciones de la unidad Pichilingue de la Universidad Autónoma de Baja California Sur (UABCS). Se colocaron en tanques de 60 L conteniendo agua de mar filtrada a 24 ± 1 °C y 36 UPS de salinidad durante 10 d para su acondicionamiento y se alimentaron con *Chaetoceros gracilis* y *Tetracelmis* sp. (2:1) (Fig. 1). Diariamente se realizó un recambio de agua del 50%. Para medir las variaciones en la temperatura se utilizó un sensor automático (Optic Shuttle™) programado para tomar los datos cada 4 horas.



Figura 1. (a) Tanque de alimentación y (b), tolvas donde se produjo el alimento para el mantenimiento de los organismos en el laboratorio húmedo de la unidad Pichilingue de la UABCS.

5.2. Cepa bacteriana

La cepa bacteriana utilizada en este trabajo fue nombrada APSA2. Ésta se aisló de los tanques de cultivo de postlarvas de camarón blanco (*Farfantepenaeus vannamei*), de la empresa Acuacultores de La Paz S.A., durante la fase exponencial de crecimiento bacteriano. La cepa fue conservada en medio Lauria-Bertani (LBM) conteniendo 3% de NaCl a 4 °C. Para la obtención de biomasa, la bacteria se cultivó en caldo de tripticasa de soya (Difco®). Una vez que los cultivos estuvieron listos, éstos se incubaron a 28 °C por 24 horas para el óptimo crecimiento de la bacteria. Una vez que la cepa fue aislada, ésta se deshidrató y se mantuvieron criopreservadas en nitrógeno líquido en el banco de Germoplasma del Laboratorio de Ecología Microbiana del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C. La cepa fue atenuada mediante choques de calor (cambios drásticos de temperatura) para disminuir su patogenicidad. Para conseguir las concentraciones bacterianas utilizadas en este estudio, se hicieron diluciones de la cepa en solución salina.

5.3. Experimento I

5.3.1. Dosis subletal de *V. alginolyticus*

Para establecer la dosis letal y subletal de *V. alginolyticus* sobre la almeja mano de león, del total de los organismos aclimatados, se tomaron 40 y se dividieron en 5 lotes de 8 organismos cada uno, los cuales se sometieron a una infección por inyección en el músculo aductor con concentraciones conocidas ($\approx 1 \times 10^3$ UFC $\cdot$ mL $^{-1}$, $\approx 1 \times 10^4$ UFC $\cdot$ mL $^{-1}$, $\approx 1 \times 10^5$ UFC $\cdot$ mL $^{-1}$, $\approx 1 \times 10^6$ UFC $\cdot$ mL $^{-1}$, $\approx 1 \times 10^7$ UFC $\cdot$ mL $^{-1}$) de *V. alginolyticus* por 10 d. Un lote de 12 organismos no se sometió a la infección para ser

usado como control, sin embargo, se les inyectó solución salina (3% de NaCl). Al final del experimento se estimó la supervivencia y con ello la dosis subletal.

5.4. Experimento II

5.4.1. Infección de organismos con la dosis subletal de *V. alginolyticus*

Una vez que la dosis subletal fue establecida en el experimento anterior (1×10^5 UFC•mL⁻¹), un lote de 50 organismos sanos se utilizó para el siguiente ensayo. De ellos, 30 organismos se infectaron con la dosis subletal, inyectando la bacteria en el músculo aductor y los 20 restantes fueron utilizados como control inyectándoles solución salina.

5.4.2. Extracción de la hemolinfa

Se hicieron muestreos a diferentes tiempos: 6 h, 24 h y 3, 6 y 10 d después de haber sido infectados, en cada caso se tomaron al azar 6 almejas infectadas y 4 del control. A cada organismo se le extrajo una muestra de hemolinfa (3 mL) del músculo aductor con una jeringa estéril de plástico de 5 mL (Fig. 2). Las muestras se colocaron en tubos Eppendorf estériles preenfriados en hielo y se conservaron en frío durante todo su manejo.



Figura 2. Extracción de hemolinfa de los organismos.

5.4.3. Cuantificación de hemocitos

De la muestra de hemolinfa, una parte (50 μ L/organismo) se usó para la cuantificación de hemocitos, tanto de los organismos infectados como del control. Este volumen se diluyó 1:1 (v/v) en una solución de formol al 4 % para evitar que los hemocitos se aglutinaran (Luna-González 2002). El conteo de los hemocitos se realizó con una cámara de Neubauer de acuerdo a la metodología establecida por Luna-González (2002).

5.4.4. Medición del diámetro y área de los hemocitos

De la misma muestra de hemolinfa tomada para la cuantificación de hemocitos, se usó una parte para la digitalización de imágenes de los hemocitos (Fig. 3). De cada organismo se midieron 50 hemocitos, tanto de los infectados como

del control, para determinar su diámetro medio y su área. Para la medición del diámetro y área se utilizó el software Sigma Scan Pro ver. 5.0.

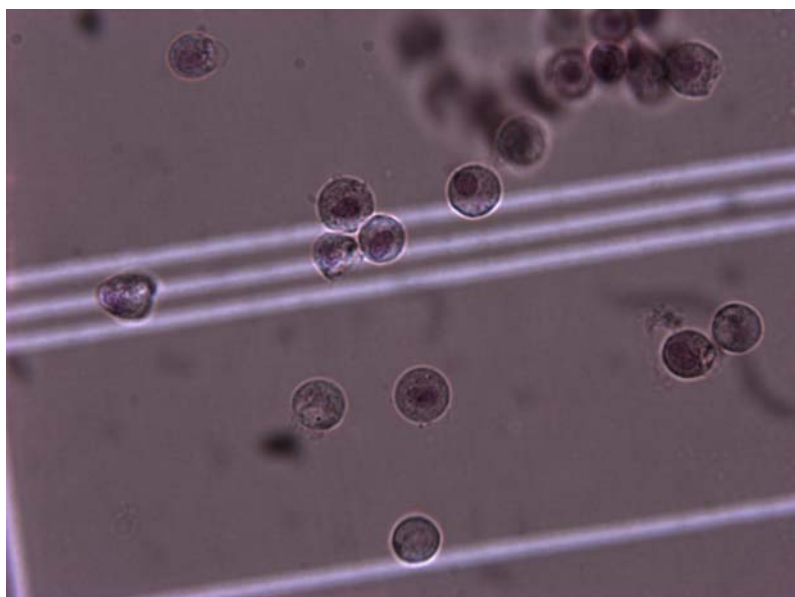


Figura 3. Imagen digitalizada de las muestras de hemolinfa, en ella se observan los hemocitos.

5.4.5. Separación del plasma y hemocitos

El resto de la muestra de hemolinfa se destinó para medir el comportamiento de los componentes humorales y determinar las diferencias en la actividad enzimática entre ellos después de someterse a la infección. Para cada una de las muestras de hemolinfa se separó el plasma de los hemocitos, de acuerdo al siguiente procedimiento establecido por Luna-González (2002). Inmediatamente después del muestreo, las muestras se centrifugaron a 500 x g por 10 min a 4 °C y el sobrenadante (plasma) se guardó en un ultracongelador a -51 °C para su utilización

en los ensayos posteriores. Los hemocitos se resuspendieron y se lavaron con búfer Tris salino preenfriado (50 mM Tris; 400 mM NaCl, pH 7.5) por centrifugación a 500 x g por 10 min a 4 °C. Finalmente, los hemocitos se resuspendieron en 2 mL de búfer Tris-HCl (250 mM Tris, pH 6.5). Esta suspensión de hemocitos se congeló a -51°C, congelando y descongelando 2 veces para el rompimiento de las membranas celulares. El homogenizado se centrifugó a 20,500 x g por 30 min a 4 °C y el sobrenadante del lisado de hemocitos (SLH) se usó en los ensayos posteriores.

5.4.6. Determinación de las enzimas hidrolíticas

Para la determinación de las enzimas hidrolíticas se utilizó el kit comercial API ZYM (BioMérieux) (Fig. 4), el cual es un método colorimétrico semicuantitativo que detecta 19 enzimas hidrolíticas y que ya ha sido satisfactoriamente usado en moluscos bivalvos (Carballal *et al.* 1997, López *et al.* 1997, Luna-González *et al.* 2002, 2004). Éste se usó de acuerdo al manual de instrucciones del fabricante.

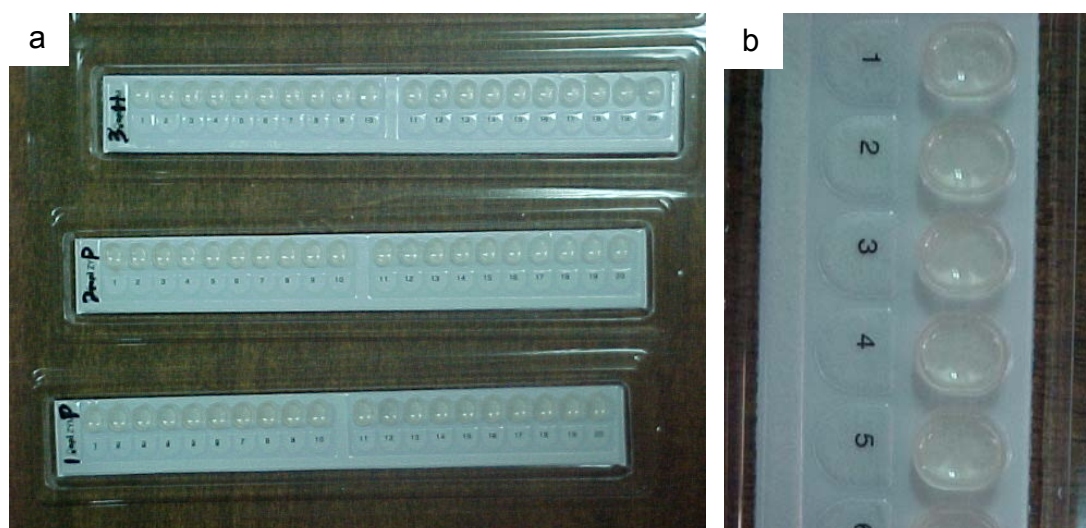


Figura 4. a) Placas de determinación de enzimas del kit API ZYM; b) Pozos de las placas.

5.4.7. Detección de la actividad de la lisozima

Debido a que el Kit API ZYM sólo detecta 19 enzimas hidrolíticas, se realizó un ensayo estándar adicional en caja de Petri para detectar la actividad de la lisozima. Para esto, se preparó una solución de 4 mg/mL de agua destilada de la bacteria liofilizada *Micrococcus luteus* (Sigma). También se preparó un búfer Tris ácido 50 mM, pH 5.2, con el cual se preparó agarosa al 1%. Se dejó reposar hasta que se enfrió a 40 °C y a 14 mL del bufer Tris–agarosa se le agregó 1 mL de la solución bacteriana. Una vez hecha la mezcla, se vació la solución en la caja de Petri para que solidificara. Cuando la mezcla se solidificó, se hicieron 8 pozos de 6 mm de diámetro. Los pozos se llenaron con 30 µL del pool de la muestra por cada tiempo y el control (saliva diluida 1:9 en solución salina 0.1% NaCl). Después de 24 y 48 h de incubación a temperatura ambiente se midió el diámetro del halo de lisis. El diámetro del halo de lisis se obtuvo midiendo el diámetro total menos el diámetro del pozo. Los resultados se expresaron en unidades por mg de proteína (0.1 mm = 1 U/mg de proteína). La proteína fue determinada de las muestras de plasma y SLH obtenidas de los organismos mediante el método de Bradford (1976). Cada una de las muestras tuvo 4 replicas (4 pozos por caja de Petri).

5.4.8. Análisis bioquímico de la hemolinfa

Para verificar la condición fisiológica de los organismos ante la infección de la bacteria, se tomaron 400 µL de cada una de las muestras y se mezclaron para analizar la variación de los principales sustratos metabólicos: proteínas por el método de Bradford (1976); carbohidratos por el método de Van Handel (1965); lípidos

totales por el método de Barnes y Blackstock (1973) y triglicéridos con el kit GOP-PAP, Merck. Las muestras de plasma se diluyeron 1:100 en una solución salina isotónica.

5.4.9. Análisis histológicos

Las muestras de manto, músculo, glándula digestiva, gónada y branquia fueron procesadas mediante el protocolo clásico de tratamiento de tejido para análisis histológicos, deshidratándose mediante alcoholes en gradientes de menor a mayor concentración e incluidas en paraplast. Las muestras fueron cortadas a 3 μm , teñidas con hematoxilina-eosina y montadas con Cytoseal.

5.5. Análisis estadístico

Los niveles enzimáticos entre los tratamientos y el control y entre el plasma y el SLH fueron analizados por medio de la prueba de Kolmogorov-Smirnov para evaluar la normalidad de los datos. En caso de ser datos normales se realizó un análisis de varianza de una vía (ANDEVA), usando la prueba de Tukey (HSD) para determinar las diferencias, y la prueba de Kruskal-Wallis cuando estos datos tuvieron un comportamiento no normal. Para relacionar las concentraciones de lisozima y el número de hemocitos se utilizó un análisis de correlación. Para todos los análisis se usó el programa Statistica ver. 6.0 y el nivel de significancia (α) se fijó en 0.05.

6. RESULTADOS

6.1. Determinación de la dosis subletal

Dentro del primer experimento, el control y los lotes infectados con menor concentración bacteriana (1×10^2 hasta 1×10^4 UFC•mL⁻¹) presentaron el 100% de sobrevivencia durante todo el experimento (Fig. 5). Las primeras mortalidades se presentaron después de 24 h en los dos lotes a los que se les aplicaron las mayores concentraciones bacterianas (1×10^5 y 1×10^6 UFC•mL⁻¹) (Fig. 5). A 24 h del inicio del ensayo, en el lote con mayor concentración de bacterias (1×10^6 UFC•mL⁻¹), la sobrevivencia fue del 75% y el lote de 1×10^5 UFC•mL⁻¹ presentó una sobrevivencia del 87.5%. Después de 48 h no se presentaron mortalidades en el lote con 1×10^5 UFC•mL⁻¹; sin embargo, en el lote de mayor concentración, la sobrevivencia disminuyó a 62.5%. Después de este día, solamente hubo mortalidades en el lote de mayor concentración y a las 72 h la sobrevivencia fue de 0%. Dado que la concentración de bacteria de 1×10^5 UFC•mL⁻¹, fue la próxima menor a la concentración que mató al total de los organismos, se determinó que ésta sería tomada como la dosis subletal.

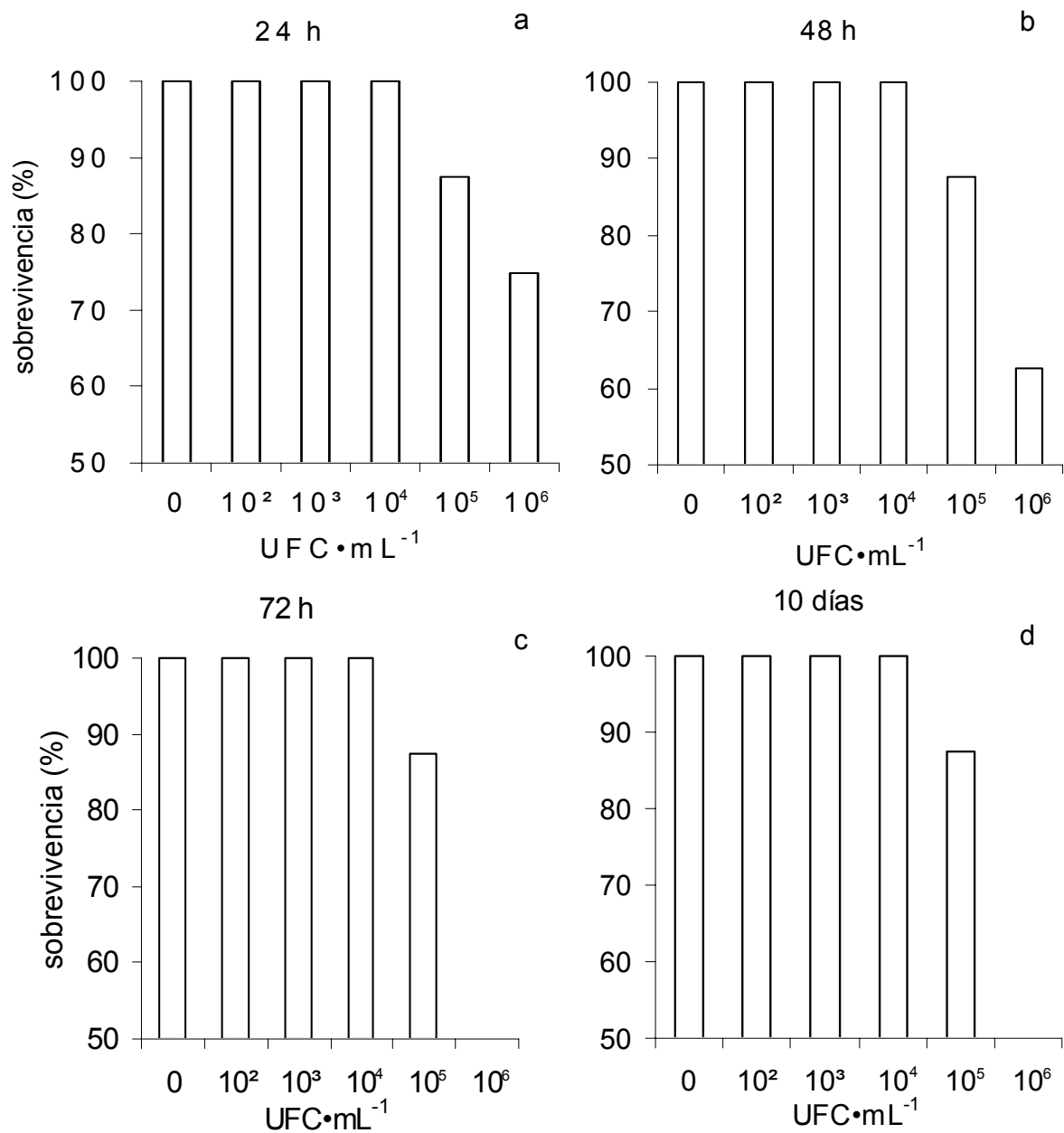


Figura 5. Sobrevivencia de *N. subnodosus* después de ser infectada con *V. alginolyticus*. a, b, c, muestran la sobrevivencia durante los tres primeros días. d, indica el día final del experimento (n= 8 para cada concentración de bacterias).

6.2. Cuantificación de hemocitos

En la figura 6 se muestra el número promedio de hemocitos cuantificado en cada uno de los controles durante el experimento. Se encontraron diferencias significativas en el número de hemocitos entre los controles a las 6 h, 24 h, 3 d, 6 d y 10 d ($F_{4,99} = 3.911$ $P = 0.001$) (Anexo I a). Estos se agruparon para comparar su media con los resultados de los diferentes tiempos experimentales de organismos infectados. El promedio de hemocitos en los controles fue de 8 288 000 células/mL.

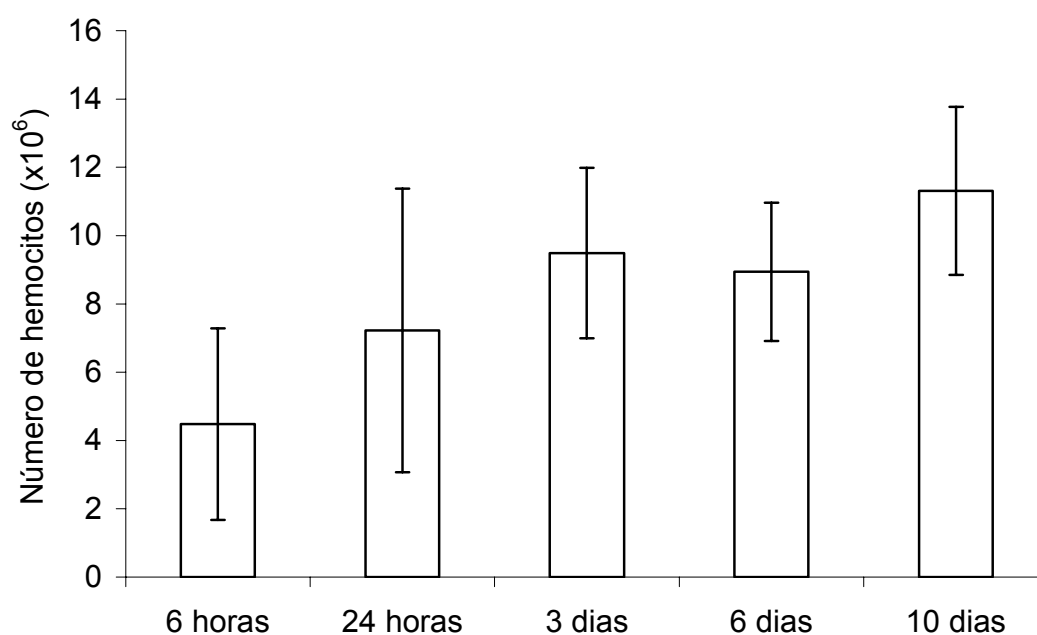


Figura 6. Número promedio de hemocitos cuantificados en los controles. Las barras corresponden a la desviación estándar. ($n = 4$ por cada lote)

No se encontraron diferencias significativas entre las tallas de los organismos ($F_{27} = 0.202$ $P = 0.935$) (Anexo I b) por lo que se considera que este factor no afecta los resultados y por lo tanto éstos son comparables.

En los organismos infectados, a las seis h de iniciado el experimento, el número promedio de hemocitos cuantificados (3 804 444) fue significativamente menor ($P = 0.03$) que el del control; sin embargo, aumentó significativamente ($P = 0.010$) ($\bar{x} = 12\,340\,000$ hemocitos) a las 24 h de iniciado el experimento. Al tercer y sexto día se observó una disminución en el número de células (9 400 000 y 4 046 666 hemocitos, respectivamente). Al décimo día después de la infección, el número promedio de hemocitos cuantificados, nuevamente aumentó significativamente ($P = 0.036$) ($\bar{x} = 9\,646\,667$ hemocitos) (Fig. 7).

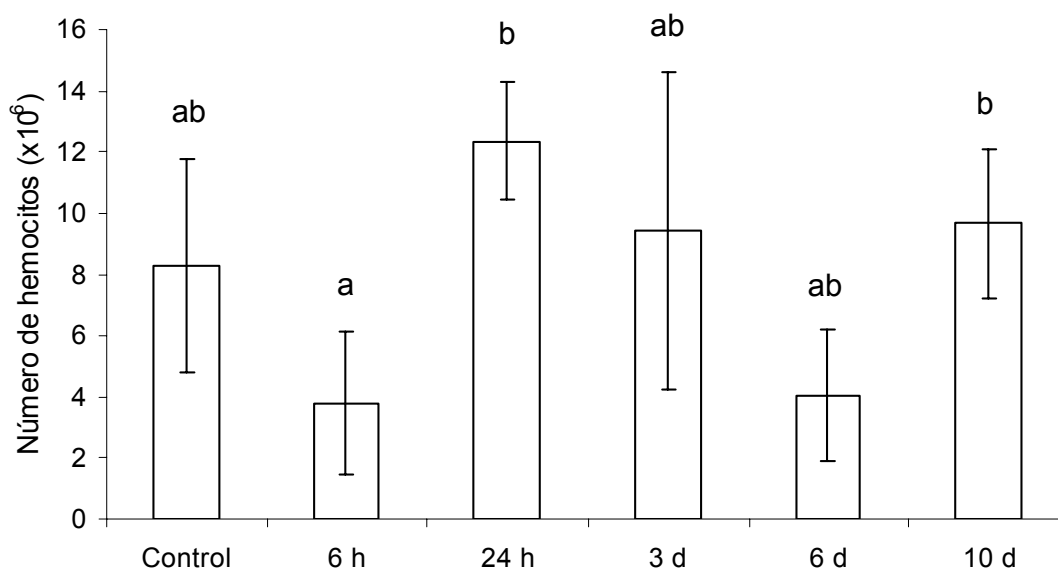


Figura 7. Número promedio de hemocitos cuantificados en cada tiempo de muestreo y el control. Las barras corresponden a la desviación estándar. Medias con diferentes letras son significativamente diferentes ($P < 0.05$) ($n = 6$ por lote)

6.3. Diámetro de hemocitos

En la figura 8 se muestra el diámetro medio de los hemocitos en cada uno de los controles. No se encontraron diferencias significativas ($P > 0.05$) en el diámetro medio de hemocitos entre controles a las 6 h, 24 h, 3 d, 6 d y 10 d; por lo tanto, éstos se agruparon para comparar su media ($15.40 \mu\text{m}$) con los resultados de los diferentes tiempos experimentales de organismos infectados (Anexo I c).

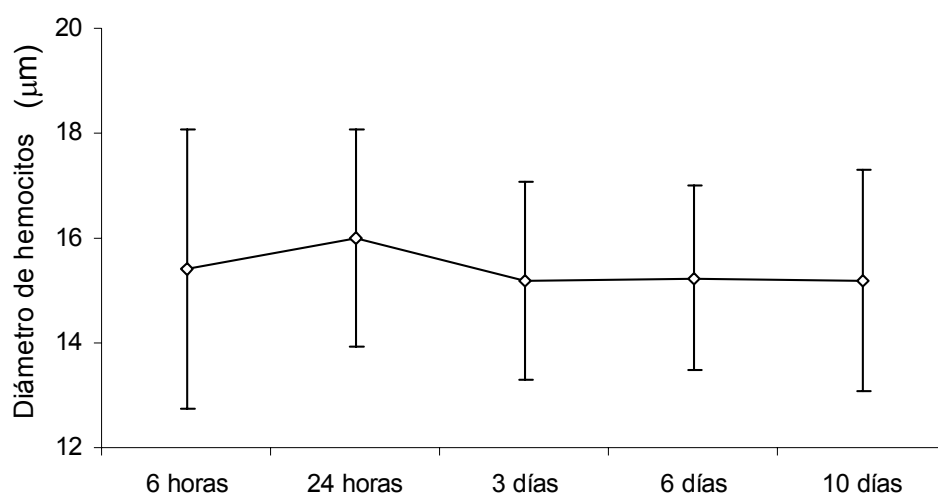


Figura 8. Promedio de los diámetros de los hemocitos medidos en los controles en cada uno de los tiempos de muestreo. Las barras corresponden a la desviación estándar.

En la figura 9 se muestra el diámetro promedio de los hemocitos de los organismos infectados durante el experimento. A las seis horas de ensayo, el diámetro medio de los hemocitos fue significativamente mayor ($P= 0.000$)

($\bar{x} = 16.15 \mu\text{m}$) que el control, mientras que disminuyó significativamente ($P = 0.001$) ($\bar{x} = 15.10 \mu\text{m}$) a las 24 h. Posteriormente, se observó un aumento en el diámetro medio a los tres días ($\bar{x} = 15.76 \mu\text{m}$), y este llegó a un diámetro significativamente ($P = 0.000$) más bajo a los seis días después de la infección ($\bar{x} = 14.5 \mu\text{m}$). Al final del experimento (décimo día), el diámetro aumentó nuevamente a $15.32 \mu\text{m}$, un valor muy cercano al diámetro promedio de los hemocitos del control.

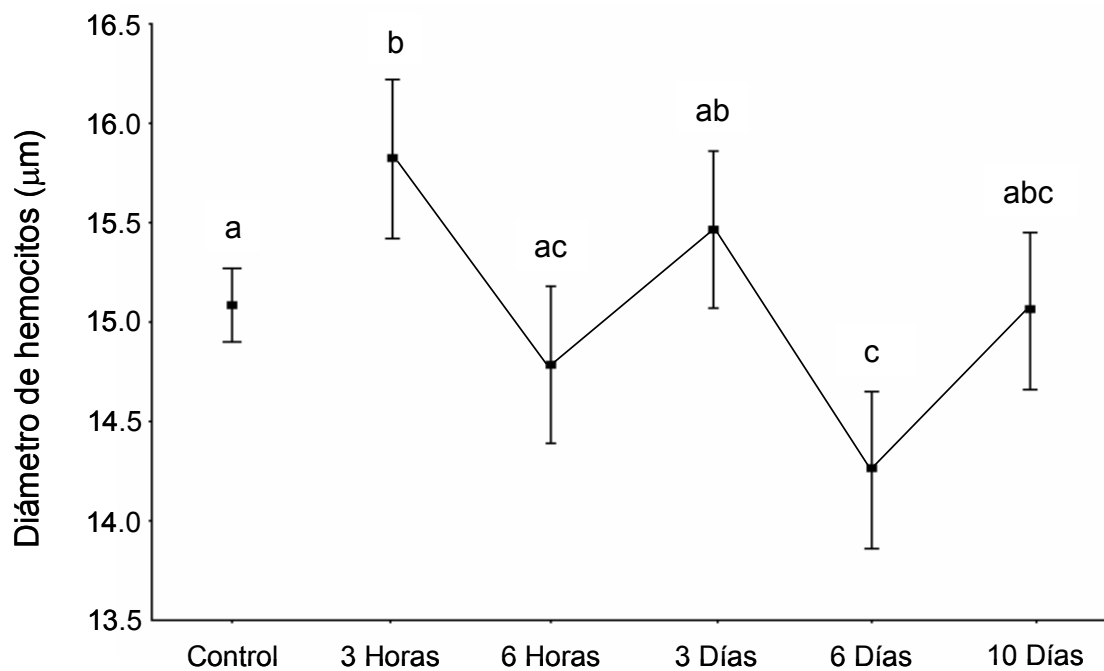


Figura 9. Diámetro medio de los hemocitos observado durante el periodo de experimentación. Las barras corresponden a la desviación estándar. Medias con diferentes letras son significativamente diferentes ($P < 0.05$).

6.4. Área de los hemocitos

Se encontraron diferencias significativas ($F=2.86$ $P= 0.023$) en las áreas de los hemocitos en los controles ($\bar{x}= 182.138 \mu\text{m}^2$) (Anexo I d). Estos, se agruparon para comparar su media con las áreas medias de los hemocitos de los lotes con organismos infectados (Fig. 10).

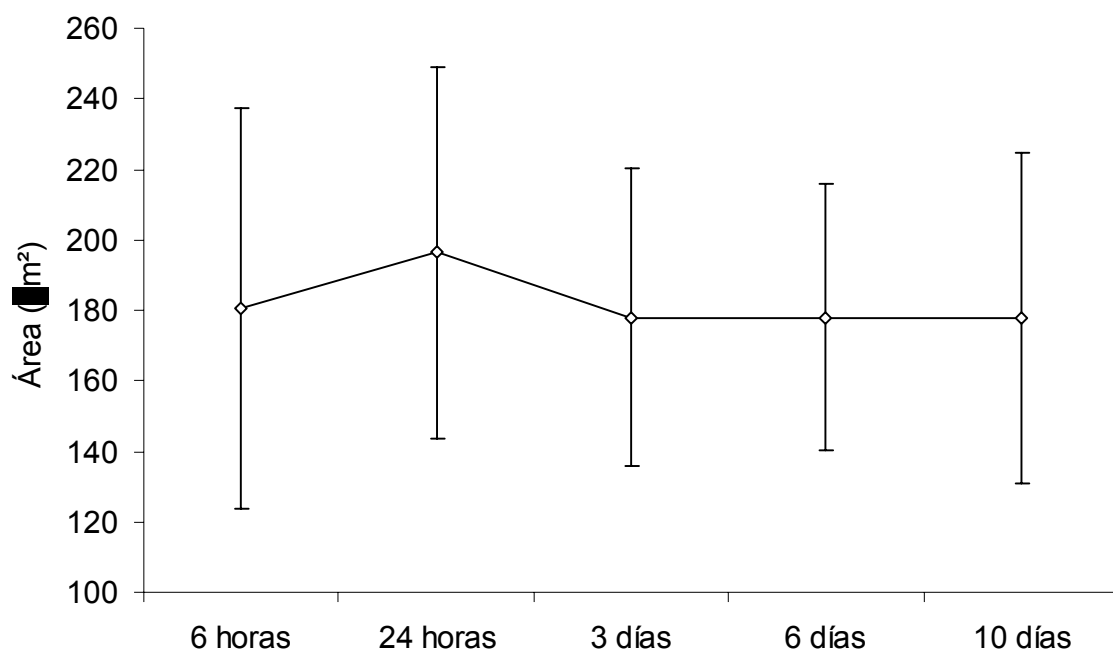


Figura 10. Promedio de áreas de hemocitos medidos en los controles en cada uno de los tiempos de muestreo. Las barras corresponden a la desviación estándar.

En la figura 11 se muestra el área media de los hemocitos de los organismos infectados y del control. Se observó que el área de los hemocitos aumentó significativamente ($P= 0.001$) ($\bar{x}= 199.142 \mu\text{m}^2$) a las seis horas de iniciado el

experimento, pero ésta disminuyó significativamente ($P= 0.001$) una vez mas ($\bar{x}= 174.356 \mu\text{m}^2$) a las 24 h. Después de las 24 h se observó un aumento significativo ($P= 0.001$) a los 3 días ($\bar{x}= 191.191 \mu\text{m}^2$), para luego disminuir significativamente ($P= 0.000$) a los seis días de iniciado el ensayo ($174.694 \mu\text{m}^2$). Al final del experimento (décimo día), el área fue de $181.941 \mu\text{m}^2$, medida que es la más cercana al control ($182.138 \mu\text{m}^2$).

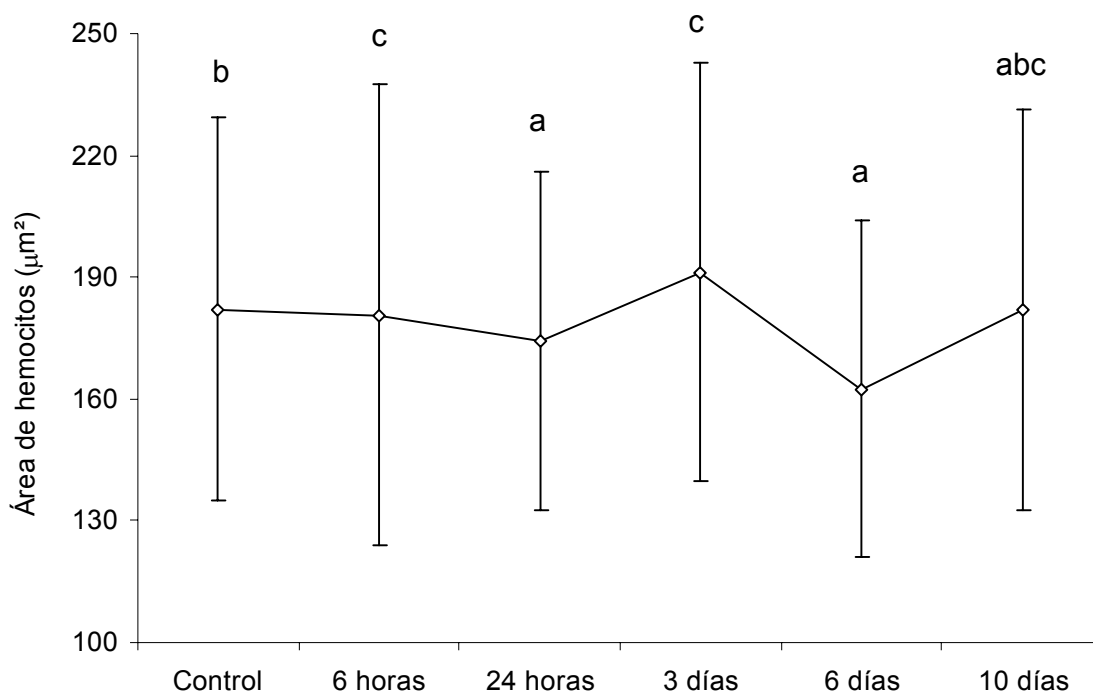


Figura 11. Áreas promedio de los hemocitos durante el experimento. Las barras corresponden a la desviación estándar. Medias con diferentes letras son significativamente diferentes ($P < 0.05$).

6.5. Detección de la actividad enzimática

Los resultados obtenidos del ensayo realizado en la hemolinfa con el kit de detección enzimática API ZYM, tanto en SLH como en plasma se presentan en las tablas 1 y 2.

6.5.1. Detección de la actividad enzimática en SLH

El mayor número de enzimas activas fue encontrado en el SLH con 11 tipos de enzimas hidrolíticas (Tabla 1). Se encontraron diferencias significativas ($F_5 = 16$, $P = 0.000$) en la concentración enzimática entre los tiempos de muestreo (Anexo I e). También, se encontraron diferencias significativas de la actividad enzimática entre los distintos tipos de enzimas ($F_{10} = 22.11$, $P = 0.004$) (Anexo I e). Las enzimas con mayor actividad en SLH, fueron leucil arilamidasa y esterasa. De estas dos enzimas, la primera aumenta significativamente ($P = 0.004$) respecto al control durante las primeras 24 horas de ensayo, y disminuye significativamente ($P = 0.004$) a partir del tercer día. La concentración de esterasa se mantiene significativamente baja ($P = 0.004$) en comparación al control durante las primeras seis h de ensayo. Su concentración aumenta significativamente ($P = 0.000$) a las 24 h, para luego disminuir significativamente ($P = 0.000$) durante el tercero y sexto día de experimentación. Para el décimo día, ésta enzima se incrementa nuevamente de manera significativa ($P = 0.000$). Las enzimas que no tuvieron variación significativa o no estuvieron presentes en el SLH durante el experimento fueron: lipasa, tripsina, α -galactosidasa, α -glucosidasa, β -glucosidasa, N-acetil-beta glucosaminidasa, α -manosidasa y α -fucosidasa.

Tabla 1. Actividad enzimática en el SLH medida con el kit API ZYM. La actividad fue expresada en nm/mg de proteína (media $\pm$ desviación estándar) (n= 48).

Enzimas	Control	6 horas	24 horas	3 días	6 días	10 días
Fosfatasas						
fosfatasa acida	1,97 $\pm$ 0,5	2,89 $\pm$ 0	3,11 $\pm$ 0	2,09 $\pm$ 0	1,84 $\pm$ 0	2,7 $\pm$ 1,3
naftol fosfohidrolasa	3,44 $\pm$ 2,3	2,89 $\pm$ 0	3,11 $\pm$ 0	2,09 $\pm$ 0	3,69 $\pm$ 0	1,85 $\pm$ 0
fosfatasa alcalina	2,06 $\pm$ 0,6	1,44 $\pm$ 0	1,55 $\pm$ 0	1,56 $\pm$ 0,7	0,92 $\pm$ 0	1,85 $\pm$ 0
Esterasas						
esterasa	3,34 $\pm$ 2,5	2,89 $\pm$ 0	12,47 $\pm$ 0	4,18 $\pm$ 0	1,84 $\pm$ 0	5,55 $\pm$ 2,6
Lipasas						
esterasa lipasa	0 $\pm$ 0	2,89 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
lipasa	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
Proteasas						
leucil arilamidasa	15,36 $\pm$ 0,5	23,16 $\pm$ 0	24,95 $\pm$ 0	16,74 $\pm$ 0	14,76 $\pm$ 0	14,82 $\pm$ 0
valil arilamidasa	1,47 $\pm$ 0,4	1,44 $\pm$ 0	1,55 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	1,38 $\pm$ 0,6	1,38 $\pm$ 0,6
cistil arilamidasa	2,46 $\pm$ 0,9	2,17 $\pm$ 1	0 $\pm$ 0	1,04 $\pm$ 0	1,38 $\pm$ 0,6	1,38 $\pm$ 0,6
tripsina	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
alfa quimiotripsina	0,59 $\pm$ 0,2	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0,92 $\pm$ 0
Glicosidasas						
alfa galactosidasa	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
beta galactosidasa	1,77 $\pm$ 0,5	1,44 $\pm$ 0	3,11 $\pm$ 0	1,04 $\pm$ 0	1,38 $\pm$ 0,6	0,92 $\pm$ 0
beta glucoronidasa	0,49 $\pm$ 0,1	0 $\pm$ 0	1,55 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
alfa glucosidasa	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
beta glucosidasa	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
N acetil beta						
glucosaminidasa	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
alfa manosidasa	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
alfa fucosidasa	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0

6.5.2. Detección de la actividad enzimática en plasma

En el plasma se encontraron solamente 6 tipos de enzimas hidrolíticas (Tabla 2). Se encontraron diferencias significativas en la concentración enzimática de los diferentes tipos de enzimas ($F_5 = 22.11$, $P = .000$), así como en las concentraciones enzimáticas entre los tiempos de muestreo ($F_5 = 16$, $P = .000$). (Anexo I e) Al igual que en SLH, las enzimas de mayor actividad hidrolítica fueron la esterasa y la leucil arilamidasa. La esterasa, que fue la enzima con mayor concentración en plasma, disminuyó significativamente ($P = 0.000$) con respecto al control a partir de las 24 h de ensayo, hasta un mínimo a los tres días de iniciado el experimento. Su concentración aumentó significativamente ($P = 0.000$) al sexto día, para luego disminuir al final del experimento a un valor similar al del control. La leucil arilamidasa, en general presentó menor concentración que la esterasa a lo largo del experimento. Esta enzima aumentó significativamente ($P = 0.000$) su concentración a las 24 h de iniciado el ensayo, para luego disminuir concomitantemente hasta el final del experimento. Las enzimas que no variaron significativamente o que no estuvieron presentes durante el experimento fueron todas las glicosidasas y proteasas, a excepción de leucil arilamidasa.

Tabla 2. Actividad enzimática en el plasma medida con el kit API ZYM. La Actividad fue expresada en nm/mg de proteína (media $\pm$ desviación estándar) (n= 48).

Enzimas	Control	6 horas	24 horas	3 días	6 días	10 días
Fosfatasas						
fosfatasa acida	3,87 $\pm$ 0,8	0 $\pm$ 0	1,37 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	1,42 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
naftol fosfohidrolasa	1,34 $\pm$ 1,05	1,37 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	2,37 $\pm$ 0
fosfatasa alcalina	4,76 $\pm$ 0,0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	22,62 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
Esterasas						
esterasa	11,62 $\pm$ 5,4	10,98 $\pm$ 0	6,86 $\pm$ 5,8	5,65 $\pm$ 0	14,22 $\pm$ 4	9,48 $\pm$ 0
Lipasas						
esterasa lipasa	2,38 $\pm$ 0,4	0 $\pm$ 0	1,37 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	9,48 $\pm$ 0
lipasa	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
Proteasas						
leucil arilamidasa	8,19 $\pm$ 1	6,86 $\pm$ 5,8	16,48 $\pm$ 0	5,65 $\pm$ 0	4,26 $\pm$ 2	7,11 $\pm$ 3,3
valil arilamidasa	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
cistil arilamidasa	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
tripsina	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
alfa quimiotripsina	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
Glicosidasas						
alfa galactosidasa	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
beta galactosidasa	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
beta glucoronidasa	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
alfa glucosidasa	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
beta glucosidasa	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
N acetil beta						
glucosaminidasa	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
alfa manosidasa	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
alfa fucosidasa	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0

6.6. Detección de la actividad de la lisozima

La formación de un halo de inhibición fue evidente (Fig. 12), y solamente en algunos casos no existió lisis (SLH, 6 h y 3 d). El halo de lisis en el control (saliva diluida) fue mayor que el observado en las muestras.

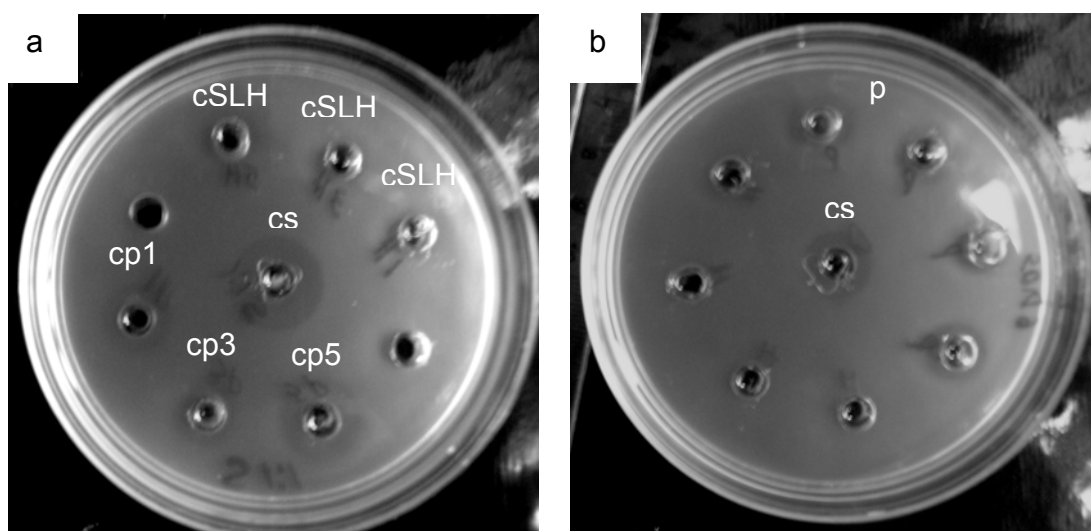


Figura 12. Placas de la solución de agar y *Micrococcus luteus* donde se observa el halo de lisis en los pozos. En el centro se puede observar el control (saliva). a) controles 1,3 y 5. b) muestras tomadas a los 6 días. Abreviaturas: cs = saliva diluida, cp = controles plasma, cSLH = controles sobrenadante, p = plasma, SLH = sobrenadante de lisado de hemocitos.

6.6.1. Detección de la actividad de lisozima en SLH

La tabla 3 muestra las variaciones en la concentración de lisozima en SLH observadas durante el periodo experimental. No se encontraron diferencias significativas ($P = 0.05$) en las concentraciones de lisozima entre los tiempos de muestreo (Anexo I f). Sin embargo, se observó un aumento (2.25 veces) en la concentración de lisozima de las seis horas a las 24 h de ensayo cuando llegó a su

máxima concentración (302.8450 U/mg de proteína). Al tercer día, la actividad disminuyó nuevamente 1.7 veces (171.755 U/mg de proteína), para luego aumentar hasta el final del experimento.

6.6.2. Detección de la actividad de lisozima en plasma

Para el plasma, no se encontraron diferencias significativas ($P = 0.05$) en la actividad de la lisozima entre los tiempos de muestreo (Anexo I f). Sin embargo, se puede observar que a las 24 h ocurre una disminución en la concentración de lisozima (451.35 U/mg de proteína) en comparación con la concentración presente a las seis horas de infección (530.06 U/mg de proteína). Se observó luego un incremento al tercer día del experimento (517.325 U/mg de proteína) hasta alcanzar un máximo al sexto día (612.985 U/mg de proteína). Sin embargo, al décimo día, la actividad disminuyó nuevamente a 491.297 U/mg de proteína (Tabla 3).

Tiempo	SLH	Plasma
Control	313.47±48.61	503.30± 22.88
6 Horas	134.88±10.31	530.21±32.13
24 Horas	302.85±24.70	451.04±10.14
3 Días	171.76±13.88	517.33±23.87
6 Días	248.18±20.40	612.99±40.42
10 Días	279.67±16.04	491.30±12.07

Tabla 3. Concentraciones de lisozima encontradas en SLH y en plasma expresadas en U/mg⁻¹ de proteína (media ± desviación estándar).

6.6.3. Relación de la actividad de lisozima en SLH con el número de hemocitos

Después de obtenerse las concentraciones de lisozima en plasma y SLH, éstas se compararon con el número de hemocitos para determinar su relación en estas variaciones.

Se encontró una correlación positiva ($r = 0.88$), aunque ésta no fue significativa ($P > 0.963$), entre la actividad de lisozima en el SLH y el número de hemocitos durante los tres primeros días de experimento, que es el periodo donde se observó la mayor actividad lítica (Fig. 13). La concentración aumenta de las seis a las 24 h, donde la concentración es la máxima observada (302.8450 U/mg proteína). La concentración disminuye hacia el tercer día. El comportamiento en el número de hemocitos presentó la misma tendencia que la concentración enzimática, aumentando después de las seis h, y disminuyendo después de las 24 h.

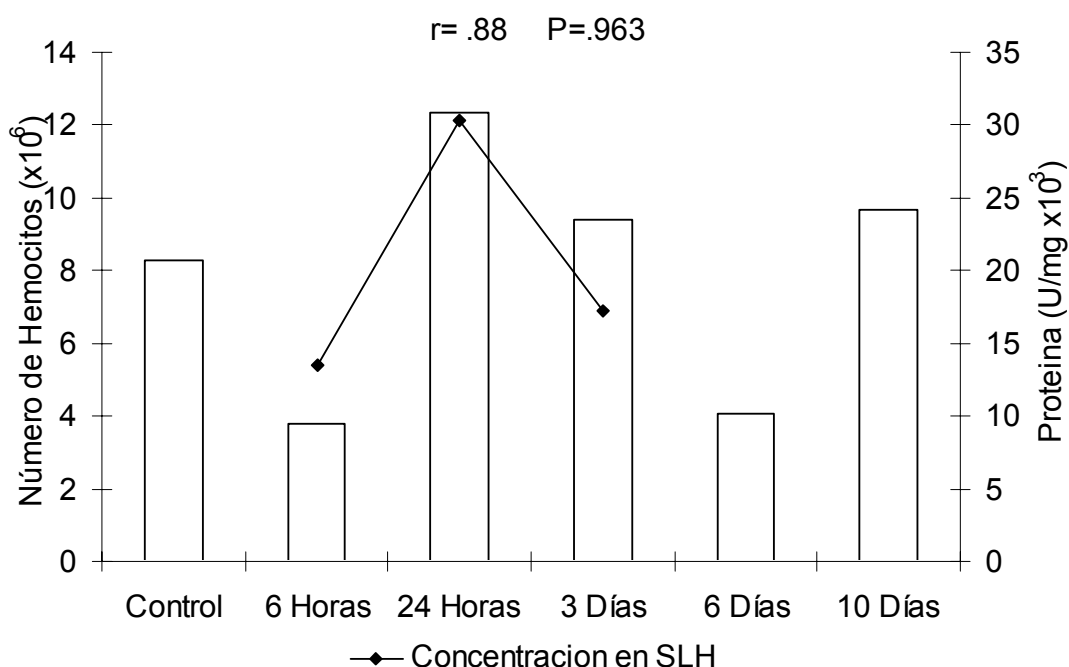


Figura 13. Comparación de las concentraciones de lisozima en SLH y el número de hemocitos desde las seis horas hasta el tercer día de experimento.

6.6.4. Relación de la actividad de lisozima en plasma con el número de hemocitos

La concentración de lisozima en plasma disminuyó después de las 24 h de experimento, aumentando al tercer día de iniciado el experimento. El número de hemocitos presentó una correlación negativa, aunque no significativa, con la concentración de lisozima ($r = -0.88$, $P = 0.3$) (Fig. 14). El número de hemocitos es menor cuando la concentración de lisozima es alta (seis h), después aumenta el número de hemocitos y la concentración disminuye, aumentando nuevamente la concentración cuando el número de hemocitos disminuye (tres días).

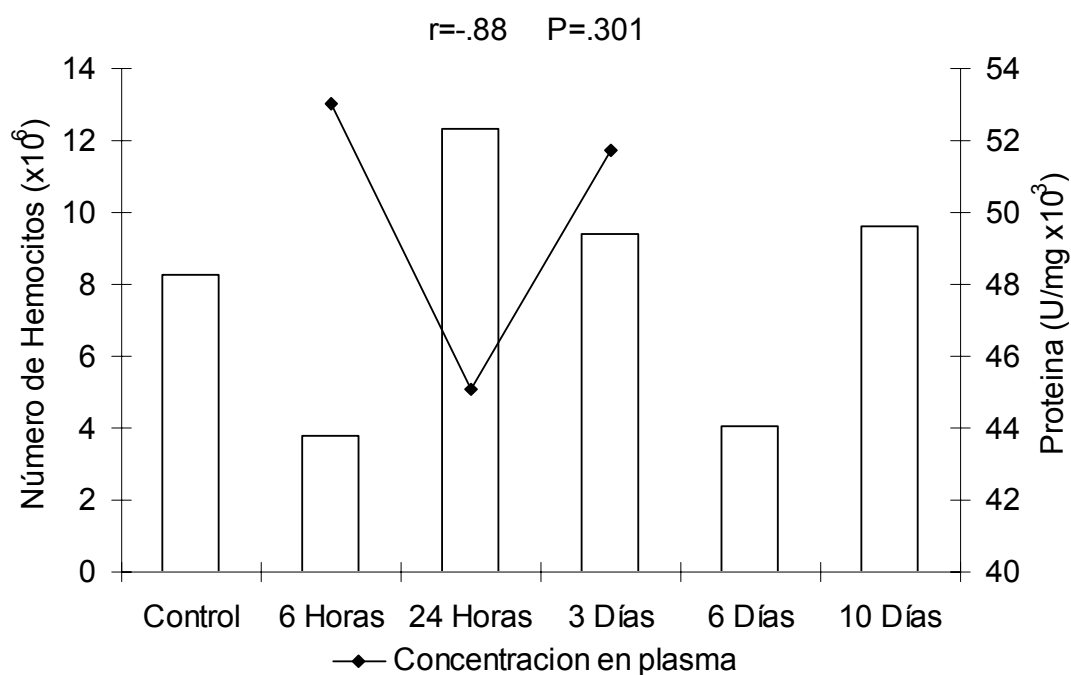


Figura 14. Comparación de las concentraciones de lisozima en plasma y el número de hemocitos desde las seis horas hasta el tercer día de experimento.

6.7. Análisis bioquímicos

6.7.1. Proteínas

En los controles se detectó una correlación significativa negativa ($r = -0.54$, $P < 0.05$) de la concentración de proteína entre el plasma y el SLH. (Fig. 15a).

En la figura 15b se observan las variaciones en la concentración de proteína de los organismos infectados en el periodo experimental. Se detectó una correlación significativa negativa ($r = -0.54$, $P < 0.05$) entre las concentraciones de proteína de plasma y SLH. Las concentraciones tienden a disminuir en plasma y a aumentar en SLH a medida que el experimento avanza. La concentración de proteínas en plasma disminuye desde el inicio del experimento (1.8199 mg/mL) hasta el final de éste (1.0547 mg/mL). Las concentraciones más altas se observaron en SLH durante el periodo final del experimento (seis y diez días). La concentración aumenta desde las 24 h de experimento 1.6027 mg/mL donde la concentración es la más baja, hasta el sexto día, donde sufre una disminución (2.6988 mg/mL).

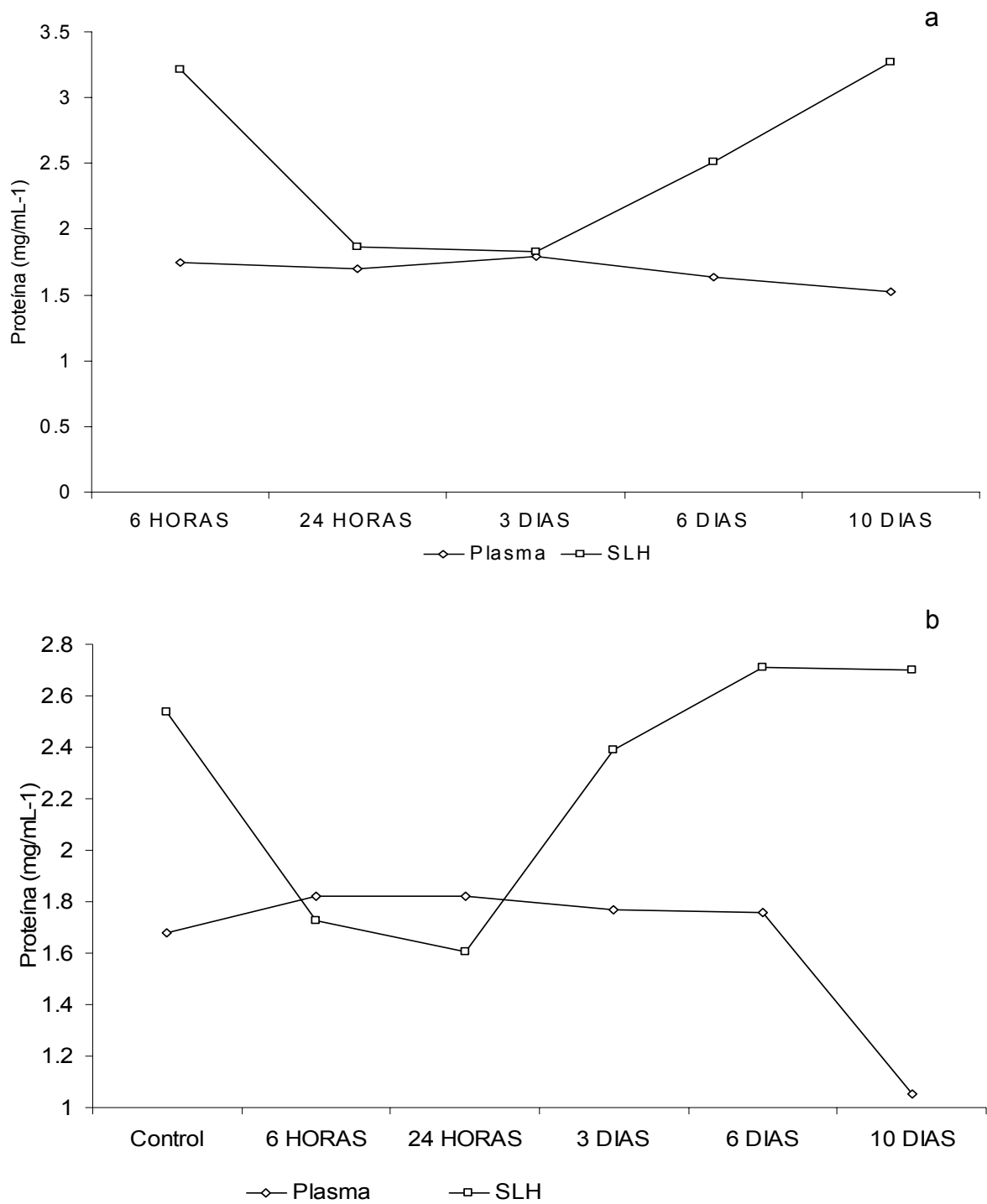


Figura 15. Concentración de proteínas en plasma y SLH por cada tiempo de muestreo en a) controles y b) organismos infectados.

6.7.2. Carbohidratos y Lípidos

No se encontró una correlación significativa ($r = 0.543$, $P = 0.4$) entre la concentración de lípidos en plasma y SLH de los organismos infectados (Fig. 16a). Sin embargo, la concentración se incrementó a su máximo (0.0725 mg/mL) a las 24 h de iniciado el experimento, disminuyendo paulatinamente hasta su concentración más baja (0.0466 mg/mL) al sexto día; al décimo día la concentración de lípidos es similar a la del control. Las concentraciones de lípidos en SLH no tienen una tendencia clara. Asimismo, las tendencias en las concentraciones de carbohidratos no son claras tanto en plasma, como en SLH. Sin embargo, en este sustrato se encontró una correlación positiva significativa ($r = 0.4027$, $P < 0.05$) entre las concentraciones de plasma y SLH (Fig. 16b). La máxima concentración de carbohidratos en plasma (0.0842 mg/mL) se presentó al inicio del experimento, sin embargo, esta disminuyó durante las siguientes horas hasta un mínimo de 0.0597 mg/mL⁻¹ al final del experimento. La concentración en SLH aumenta desde el inicio del experimento hasta el sexto día (0.0657 mg/mL), donde sufre una abrupta disminución.

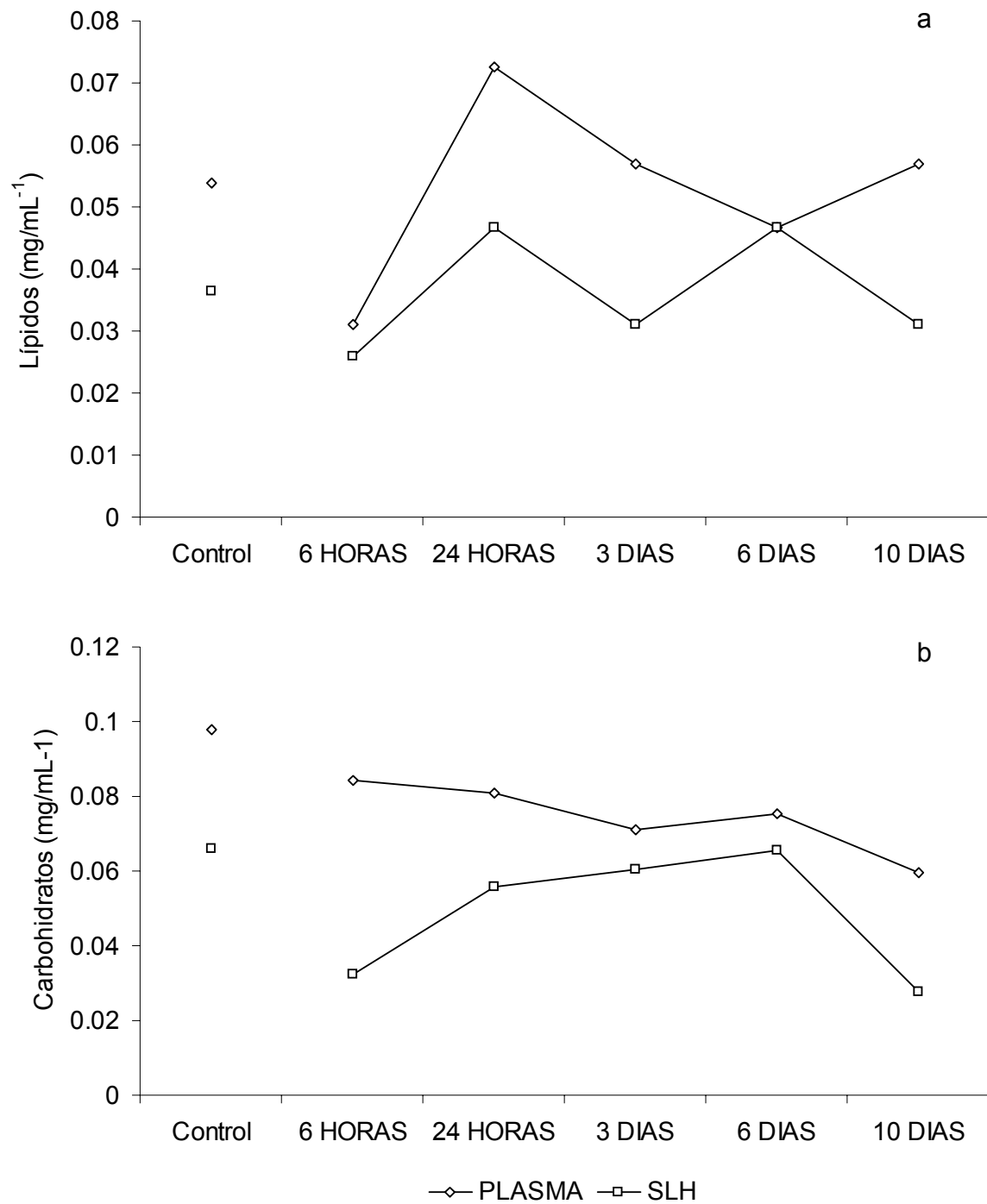


Figura 16. Concentración de a) lípidos y b) carbohidratos encontrados en cada uno de los tiempos de muestreo en plasma y SLH.

6.8. Temperatura

La figura 17 muestra las variaciones de la temperatura durante el periodo experimental. La temperatura promedio fue de 18.81 ± 1.65 °C. Las variaciones se observaron desde los 14.66 °C (1 de marzo) hasta los 23.08 °C (18 de marzo). Se encontraron diferencias significativas ($F = 66.61$) entre los periodos de muestreo.

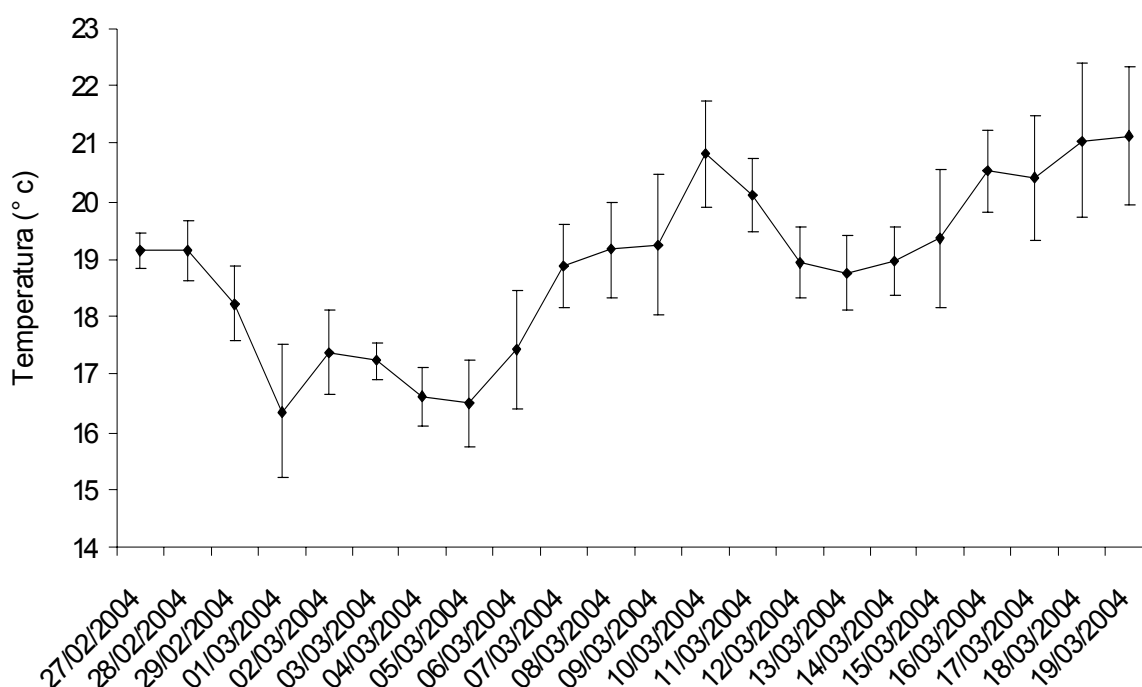


Figura 17. Temperaturas observadas durante el periodo experimental. Las barras representan la desviación estándar.

6.9. Análisis histológicos

En los análisis histológicos no se encontraron lesiones causadas por la acción de las bacterias. Los tejidos se observan en condiciones normales, sin ningún tipo de alteración (Fig. 18a, b, c y d), incluyendo al músculo, que es donde se aplicó la inyección.

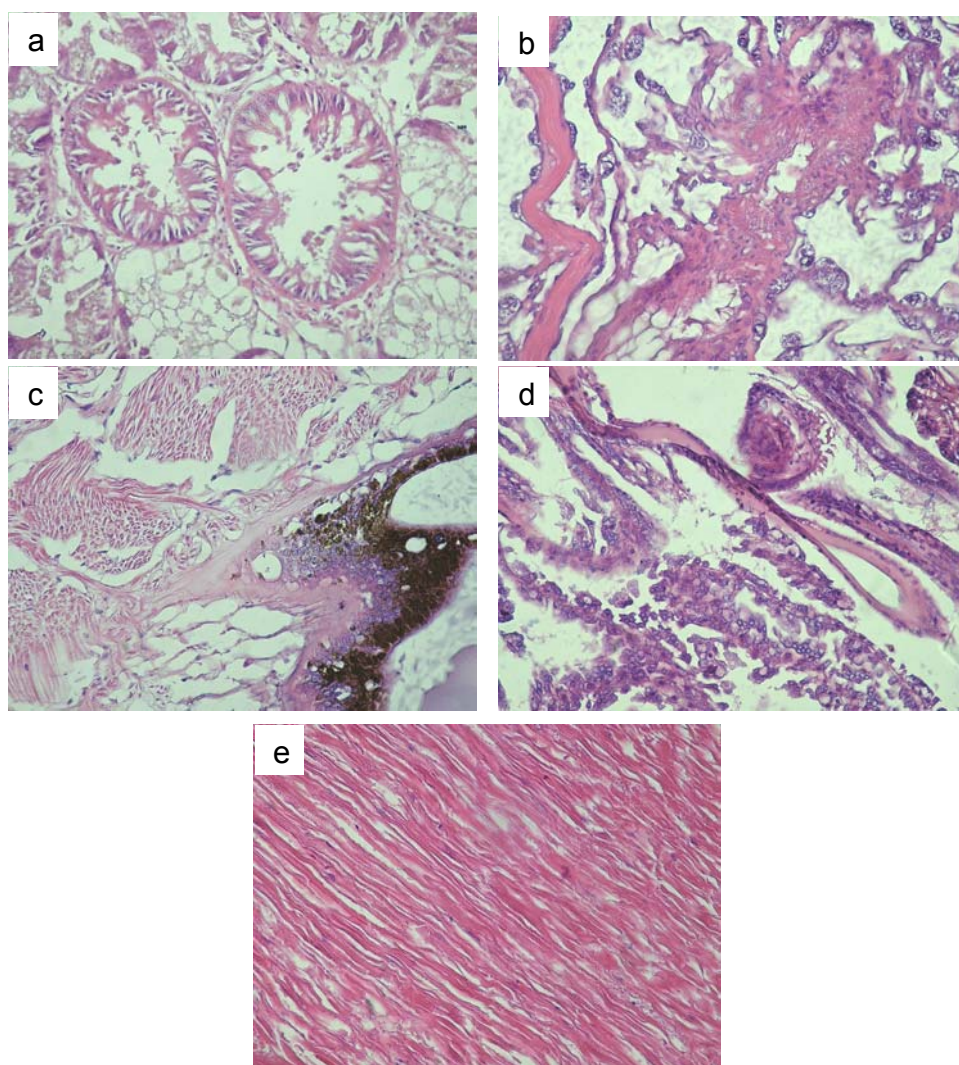


Figura 18. Observaciones histológicas en distintos órganos de *N. subnodosus* durante la infección con la bacteria *V. alginolyticus*, a) glándula digestiva; b) gónada; c) manto; d) branquias; e) músculo.

7. DISCUSIÓN

7.1. Dosis subletal

Las bacterias juegan un papel muy importante dentro del ambiente marino ya que éstas llevan a cabo un sinfín de procesos biológicos y bioquímicos que mantienen en equilibrio el ecosistema (Kaneko y Colwell 1973, Oubella *et al.* 1994). En este sentido, todos los animales marinos son capaces de coexistir con bacterias, ya sea porque su concentración no es suficiente para causarles daño o porque su sistema inmune es capaz de controlarlas. Sin embargo, para realizar este estudio era necesario que la respuesta inmunológica fuera muy evidente y por ello se usaron concentraciones altas de *Vibrio alginolyticus* que en raras ocasiones se alcanzan en el ambiente marino.

Se encontró que en el lote infectado con la mayor concentración bacteriana (1×10^6 UFC•mL⁻¹), el total de los organismos murieron al tercer día del experimento, mientras que en las concentraciones menores a 1×10^5 UFC•mL⁻¹ la sobrevivencia fue del 100%. Así, considerando que el lote con la concentración de 1×10^5 UFC•mL⁻¹ presentó una sobrevivencia del 87.5 %, y que la única muerte se presentó a las 24 h de iniciado el experimento, esta se consideró como la dosis subletal.

La mayor parte de los estudios relacionados con inducciones a infecciones bacterianas se centran en los primeros estadios de desarrollo larvario en especies de interés comercial como *Pecten maximus*, *Mercenaria mercenaria*, *Ostrea edulis*, *Torpedo navalis* (Tubiash *et al.* 1965), *Haliotis rufescens* (Anguiano-Beltrán *et al.*

1998), *Argopecten ventricosus* (Sainz et al. 1997, Luna-González et al. 2002), *Nodipecten subnodosus*, *Atrina maura* y *Crassostrea gigas* (Luna-González et al. 2002). Sin embargo, debido a que el sistema inmune de las larvas y los juveniles de bivalvos no se encuentra en un estado de desarrollo avanzado, en comparación con el de los adultos, las comparaciones entre uno y otro resultan erróneas.

En contraste, son pocos los estudios sobre el sistema inmune realizados en organismos adultos. Estrada-Muños (2005) observó que en *N. subnodosus* las concentraciones menores a 30-50 ng eq sax/cel del dinoflagelado *Gymnodinium catenatum* no causan ninguna respuesta inmunológica. No obstante, al aplicarles concentraciones mayores, si se presentó mortalidad. A pesar de que no se pueden hacer comparaciones directas entre los resultados de Estrada-Muños (2005) y los del presente trabajo una vez que las fuentes de infección son diferentes, si se puede establecer que el sistema inmune de *N. subnodosus* es capaz de controlar agentes infecciosos a bajas concentraciones. Los síntomas provocados por una infección dependen del agente infeccioso. En el caso de *N. subnodosus* infectados con *G. catenatum*, los efectos (contracciones tónico clónicas al momento de la infección, pérdida de la capacidad del cierre de las valvas y contracciones del manto) fueron provocadas por concentraciones de toxinas (Estrada-Muños 2005). En este trabajo, a pesar de que no se consideró la evaluación de los efectos provocados por la dosis letal, se pudieron observar organismos moribundos con valvas abiertas, abundante moco en el manto y el desprendimiento masivo de branquias, principalmente en organismos muertos. Esto mismo ya ha sido reportado para la misma especie

(Luna-González *et al.* 2002) y otras especies como *A. ventricosus* (Sainz *et al.* 1997, Luna-González 2002), *A. maura* y *C. gigas* (Luna-González *et al.* 2002).

7.2. Número y talla de hemocitos

En los invertebrados, los hemocitos constituyen la primera línea de defensa contra los patógenos y partículas extrañas, y una variación en el número de células circulantes es uno de los primeros eventos que se manifiesta como una respuesta del sistema inmune ante una agresión (Oubella *et al.* 1993, Montes *et al.* 1997). En este estudio se presentó una variación significativa en el número de hemocitos a lo largo de todo el experimento. Después de presentar una drástica disminución en el número de hemocitos a las 6 horas de experimento, el mayor número de hemocitos se alcanzó a las 24 h después de la infección; posteriormente disminuyó hasta el sexto día y se estabilizó en el décimo, donde la cantidad de hemocitos fue similar a la del control. Un aumento repentino en el número de hemocitos ha sido observado en otras especies como *Biomphalaria glabrata* (Mounkassa y Jourdane 1990), *C. virginica* (Anderson *et al.* 1992, Ford *et al.* 1993) y *Tapes semidecussatus* (Montes *et al.* 1997). El aumento de células en las primeras horas del experimento se debe a una hipersíntesis de hemocitos (Mounkassa y Jourdane 1990, Anderson *et al.* 1992, Ford *et al.* 1993, Montes *et al.* 1997), como una respuesta del sistema inmune. Cuando el ataque bacteriano es muy fuerte, esta infección puede lisar o inhabilitar a los hemocitos por saturación y de ahí la importancia de aumentar la producción de estas células.

Por otro lado, se ha reportado que la posterior disminución en el número de hemocitos puede deberse, precisamente a que estos son lisados por las bacterias (Cheng *et al.* 1978, Mohandas *et al.* 1985) o bien, a la infiltración de estos a los tejidos para tratar de controlar una probable zona de lesión (Oubella *et al.* 1994). La infiltración de hemocitos a los tejidos ha sido comprobada en *N. subnodosus* (Estrada-Muños 2005) y *C. virginica* (Anderson *et al.* 1992, Ford *et al.* 1993), como respuesta a una proliferación de parásitos (Anderson *et al.* 1992). Sin embargo, se ha observado que además de la infiltración de hemocitos a los tejidos causada por el grado de infección, los organismos siguen produciendo hemocitos (Suzuki y Awaji 1995, Montes *et al.* 1997, Sonnenholzner *et al.* 2002).

En este experimento, y aunque parezca contradictorio, durante las primeras horas de experimento hubo una disminución en el número de células. En este sentido, es probable que durante el inicio de la infección los hemocitos existentes sean lisados, lo que consecuentemente provoca su disminución en número y que al mismo tiempo la producción de nuevos hemocitos tarde algunas horas y por lo tanto, el aumento en el número de hemocitos se haya visto reflejado hasta después de 24 horas.

En contraste, las tallas de los hemocitos presentaron una tendencia inversa a la que presentó el número de hemocitos. El mayor diámetro y área se encontraron a las seis horas y tres días después de iniciado el experimento cuando el número de hemocitos es significativamente menor. Por el contrario, cuando el número de los hemocitos aumenta, las tallas son menores, y esto fue más evidente a las 24 horas. Las variaciones en las tallas observadas en nuestro trabajo, se entienden como una

nueva generación de células producidas por el organismo para contrarrestar la infección, y éstas al ir madurando van incrementando su tamaño.

Finalmente, se observa que en el día 10 el número de hemocitos y el diámetro es similar al control, lo que indica que fisiológicamente, el sistema inmune regresó a sus niveles basales de expresión, lo que indica que la infección fue controlada.

7.3. Detección de la actividad enzimática

Las enzimas hidrolíticas llevan a cabo procesos de degradación de los agentes extraños, tanto dentro como fuera de las células (Cheng 1983), fagocitando bacterias y otros organismos invasores (Feng 1988). También, al llevar a cabo el reconocimiento de los agentes infecciosos, se encargan de modificar la conformación de la pared celular de los mismos, favoreciendo su fagocitosis (Cheng 1981, 1992).

En este trabajo se detectaron 11 enzimas con actividad en SLH y 6 en plasma, asimismo, la concentración fue mayor en SLH en comparación con la de plasma. En este sentido, una mayor concentración enzimática en SLH, en comparación con el plasma, también ha sido reportada para otras especies (*Crassostrea virginica*, *C. gigas*, *A. ventriculus*, *A. maura*) (Cheng 1983, 1992, Xue y Renault 2000, Luna-González *et al.* 2002). Las mayores concentraciones de enzimas encontradas en SLH se deben a que los hemocitos son los encargados de sintetizar estas enzimas y al aumentar el número y maduración de los hemocitos la concentración enzimática aumenta (Cheng 1992). Así, una de las estrategias que los moluscos bivalvos utilizan para la eliminación de patógenos es mediante la liberación de las

enzimas al plasma por degranulación y lisis de los hemocitos (Cheng 1983, 1992) para que una vez liberadas puedan actuar contra los patógenos.

En este estudio se encontró que las seis enzimas detectadas en plasma fueron detectadas también en SLH, por lo tanto, se puede asumir que el total de las enzimas detectadas en plasma de *N. subnodosus* fueron producidas por los hemocitos. No obstante, se ha reportado que probablemente las enzimas hidrolíticas puedan originarse en lugares distintos a los hemocitos (Xue y Renault 2000), sin embargo, esto no pudo ser corroborado en este trabajo.

En este estudio, las enzimas que presentaron mayor concentración lítica tanto en SLH como en plasma fueron la leucil arilamidasa y la esterasa. Probablemente, estas enzimas son las encargadas en mayor grado de la degradación de la pared bacteriana, además de que probablemente, también sean las encargadas del reconocimiento bacteriano, por lo que los hemocitos las sintetizan en mayor cantidad para que el control de la infección sea eficiente (Cheng y Rodrick 1975, Cheng 1976). Así, se puede asumir que éstas podrían representar el principal mecanismo de control bacteriano en *N. subnodosus*. La presencia de leucil arilamidasa y esterasa ha sido reportada en otros trabajos (Xue y Renault 2000, Carballal *et al.* 1997, López *et al.* 1997, Luna-González 2002), así como naftol fosfohidrolasa y fosfatasa ácida (Cheng y Rodrick 1975, Rodrick y Ulrich 1984, Cheng 1992, Carballal *et al.* 1997, López *et al.* 1997).

Por otro lado, la enzima β -glucoronidasa estuvo presente solamente en SLH. Esta enzima es considerada como una molécula de defensa no específica muy importante, debido a que puede hidrolizar mucopolisacáridos ácidos, los cuales son

componentes de células bacterianas y tegumento de helmintos (Cheng 1976). En este y en otros trabajos realizados en bivalvos se reportan concentraciones o composiciones enzimáticas diferentes entre sí (Cheng y Rodrick 1975, Cheng 1992, Oubella *et al.* 1994, Carballal *et al.* 1997, López *et al.* 1997, Xue y Renault, 2000, Luna-González 2002), y aunque hay algunas enzimas que sí son comunes, es probable que dichas discrepancias sean producto de diferencias reales en los sistemas inmunes entre especies.

La lisozima es un componente humoral no específico del sistema inmune de los invertebrados, la cual funciona como una proteína antibacterial (Möck *et al.* 1992). Esta enzima hidroliza el ácido murámico glicosidado de la pared celular de las bacterias, causándoles lisis (Möck *et al.* 1992). Se sabe que las variaciones en la concentración de lisozima se deben a alteraciones que sufren los organismos debido a un estrés fisiológico al que son sometidos, por lo que la lisozima es liberada al plasma cuando existe un estímulo, ya sea una infección o algún otro agente extraño (Cheng *et al.* 1974, 1975). También se ha reportado que las variaciones de la lisozima están relacionadas con los cambios estacionales (Chu y La Peyre 1989, Carballal *et al.* 1997, López *et al.* 1997) o con el desarrollo gametogénico (Feng y Canzonier 1970, Chu y La Peyre 1989, Santarem *et al.* 1994). En este estudio, se descarta la influencia del grado de desarrollo gonádico, ya que de acuerdo con el análisis histológico se pudo comprobar que los organismos se encontraban en periodo de reposo reproductivo.

En este trabajo se encontró que las mayores concentraciones de esta enzima se presentaron en el plasma, contrario a lo sucedido con las enzimas hidrolíticas, lo

que hace suponer que la lisozima se puede producir fuera de los hemocitos, o bien, que ésta sea la primer enzima liberada por los mismos. Sin embargo, algunos trabajos en los que la infección fue indirecta, reportan que la concentración de lisozima es mayor en SLH que en el plasma (Cheng *et al.* 1974, 1975, Cronin *et al.* 2001, Luna-González *et al.* 2002). Los resultados encontrados en este trabajo contrastan con lo anterior probablemente debido a que una infección directa mediante una inyección pudo provocar una respuesta inmune muy rápida, con la consecuente liberación de la enzima y provocando la mayor concentración de lisozima en plasma.

Los constituyentes bioquímicos de la hemolinfa de los bivalvos se han utilizado para estimar el efecto de deterioro que sufre el hospedero a causa del parásito. Las proteínas, se han asociado a la lisozima ya que ésta es una proteína antibacterial (Sotelo-Mundo *et al.* 2003). Así, las concentraciones proteicas encontradas en este estudio, indican que durante las primeras horas de experimento la infección fue controlada mediante la liberación de enzimas al plasma, esto se puede suponer ya que las concentraciones de proteína aumentaron en el plasma y disminuyeron en el SLH. Al contrarrestarse la infección, la concentración proteica disminuyó en el plasma, y aumentó en el SLH, esto puede entenderse como una nueva síntesis enzimática de los hemocitos, para mantener en óptimas condiciones el sistema inmune (Cronin *et al.* 2001), aunado a que ya no es necesario liberar más enzima al plasma.

Por otro lado, se ha sugerido que las variaciones de la concentración proteica se deben a la gametogénesis, desoves y altas tasas metabólicas cuando la

temperatura del agua se incrementa (Chu y La Peyre 1989). En este experimento, como se mencionó anteriormente, estos posibles factores de influencia fueron eliminados, ya que los organismos utilizados se encontraban en periodo de reposo reproductivo. Sin embargo, las variaciones de temperatura observados en nuestro estudio, probablemente causaron un estrés en los organismos provocando que el numero de células circulantes en los organismos variara, sin tomar en cuenta la proliferación celular provocada por la infección.

Ahora bien, las reservas energéticas en los bivalvos están basadas principalmente en las concentraciones de lípidos y carbohidratos (Racotta *et al.* 2003). Sin embargo, poco se sabe del efecto de estos sustratos en el mantenimiento de la respuesta inmune, pero es innegable que una proliferación tan masiva de hemocitos debe ser muy costosa en términos energéticos para los organismos (Sonnenholzner *et al.* 2002). En este experimento, no se encontró una tendencia clara en la concentración de lípidos y carbohidratos, además de que no se pudo establecer una relación directa con la respuesta inmunológica.

Por otra parte, las observaciones histológicas de este estudio no mostraron ninguna lesión en los tejidos de los organismos, o evidencia de una infiltración de hemocitos a los mismos. Por esto, se asume que el organismo controló rápidamente la infección evitando que la bacteria causara lesiones o, probablemente, que el grado de infección no fue lo suficientemente grande para provocar estas alteraciones.

8. CONCLUSIONES

1. La dosis subletal encontrada para adultos de *Nodipecten subnodosus* se estimó en 1×10^5 UFC•mL⁻¹.
2. La actividad hematopoyética se evidencia 24 h después de la infección, con las mayores cantidades de hemocitos.
3. Las mayores concentraciones de enzimas detectadas por el kit API ZYM se encontraron en SLH, en comparación con el plasma.
4. Las enzimas encontradas en mayores concentraciones fueron leucil arilamidasa y esterasa, por lo que se asume que éste puede ser el principal mecanismo de control bacteriano en *N. subnodosus*.
5. Las concentraciones de lisozima fueron mayores en plasma sugiriendo que ésta enzima se puede producir fuera de los hemocitos, o bien, que ésta sea la primer enzima liberada por los mismos.

9. RECOMENDACIONES

En el presente trabajo se generó información básica valiosa para entender el comportamiento del sistema inmunológico de *Nodipecten subnodosus*. Sin embargo, se sugiere tomar en cuenta los siguientes puntos para estudios posteriores:

1. Para evitar alteraciones en los organismos, se debe tener mayor control en las condiciones de su aclimatación y mantenimiento, ya que las fluctuaciones en la temperatura y la contaminación en el alimento suministrado, podría provocar alteraciones en la condición fisiológica del organismo.
2. Se debe dar un seguimiento a la hemolinfa mediante análisis microbiológicos durante todo el periodo experimental, esto para corroborar que no está ocurriendo un nuevo crecimiento de bacterias después de la infección con la dosis subletal

10. BIBLIOGRAFÍA

- Álvarez, M. R., F. E. Friedl, J. Johnson y G. W. Hinsch. 1989. Factor affecting *In vitro* phagocytosis by oyster hemocytes. *J. Invert. Pathol.* 54:233-241.
- Allam B. y C. Paillard. 1998. Defense factors in clam extrapallial fluids. *Dis. Aqua. Org.* 33:123-128.
- Anderson, R. S., K. T. Paynter y E. M. Bureson. 1992. Increased reactive oxygen intermediate production by hemocytes withdrawn from *Crassostrea virginica* infected with *Perkinsus marinus*. *Biol. Bull.* 183:467-481.
- Anguiano-Beltrán, C., R. Searcy-Bernal y M. L. Lizárraga-Partida. 1998. Pathogenic effects of *Vibrio alginolyticus* on larvae and postlarvae of the red abalone *Haliotis rufescens*. *Dis. Aqua. Org.* 33:119-122.
- Arellano-Martínez, M. 2005. Características ecofisiológicas de la reproducción de *Nodipecten subnodosus* (Sowerby, 1835) (PECTINIDAE) en la Laguna Ojo de Liebre. B.C.S. México. 151 pp. *Tesis doctoral*. CICIMAR-IPN. La Paz, B.C.S. México.
- Aspan, A. y 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.

- Auffret, M. 1989. Comparative study of the hemocytes of two oyster species: The european flat oyster, *Ostrea edulis*, Linnaeus, 1750 and the pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1973). *J. Shellfish Res.* 2:367-373.
- Azevedo, C. 1989. Fine structure of *Perkinsus atlanticus* n. sp. (Apicomplexa, Perkinsea) parasite of the clam *Ruditapes decussatus* from Portugal. *J. Parasitol.* 75:627-635.
- Bachère, E., D. Changot y H. Grizel. 1988. Separation of *Crassostrea gigas* haemocytes by gradient centrifugation and counterflow centrifugal elutriation. *Dev. Comp. Immunol.* 14:261-268.
- Bachère, B., E. Mialhe, D. Noël, V. Boulo, A. Morvan y J. Rodríguez. 1995. Knowledge and research prospects in marine mollusc and crustacean immunology. *Aquaculture* 132:17-32.
- Balouet, G. M. Poder, A. Cahour y M. Auffret. 1986. Proliferative hemocytic condition in European flat oyster (*Ostrea edulis*) from Breton coast: a six year survey. *J. Invertebr. Pathol.* 48:208-215.
- Barbosa V., A. Luna-González, G. Aguirre-Guzmán, C. Riquelme y F. Ascencio-Valle. 2001. Enfermedades microbianas de pectínidos cultivados en Iberoamérica. pp. 325-342 *En: Maeda-Martínez, A. N (ed). Los moluscos pectínidos de Iberoamérica: ciencia y acuicultura. Limusa. México.*
- Barnes, H. y J. Blackstock. 1973. Estimation of lipids in marine animals and tissue: detailed investigation of the sulphophosphovanillin method for total lipids. *J. Exper. Mar. Biol. Ecol.* 12:103-118.

- Bass D. A., J. W. Parce, L. R. Dechatelet, P. Szejda, M. C. Seeds y M. Thomas. 1983. Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: a graded response to membrane stimulation. *J. Immunol.* 130:1910e7.
- Beckmann, N., M.P. Morse y C.M. Moore. 1992. Comparative study of phagocytosis in normal and diseased hemocytes of the bivalve *Mya arenaria*. *J. Invertebr. Pathol.* 59: 124-132.
- Biosca E. G. y C. Amaro. 1996. Toxic and enzymatic activities of *Vibrio vulnificus* Biotype 2 with respect to host specificity. *Applied. Environ. Microbiol.* 62:2331-2337.
- Borrego, J. J., A. Luque, D. Castro, J.A. Santamaria, y E. Martínez-Manzanares. 1996. Virulence factor of *Vibrio* P1, the causative agent of brown ring disease in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*. *Aqua. Liv. Res.* 9:125-136.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- Cajaraville, M. P., S. G. Pal, y Y. Robledo. 1995. Light and electron microscopical localization of lysosomal acid hidrolases in bivalve haemocytes by enzyme cytochemistry. *Acta Histichem. Cytochem.* 28:409-416.
- Carballal, M. J., C. López, C. Azevedo y A. Villalba. 1997. Enzymes involved in defense function of haemocytes of mussel *Mytilus galloprovincialis*. *J. Invertebr. Pathol.* 70:96-105.

- Carballal, M. J., A. Villalva, y C. López. 1998. Seasonal variation and effects of age, food availability, size, gonadal development, and parasitism on hemogram of *Mytilus galloprovincialis*. *J. Invertebr. Pathol.* 72(3):304-312.
- Cheng, T. C. 1976. Beta – glucoronidase in the serum and hemolymph cells of *Mercenaria mercenaria* and *Crassostrea Virginica* (Mollusca: Pelecypoda). *J. Invertebr. Pathol.* 27:125-128.
- Cheng, T.C. 1978. The role of lysosomal hydrolases in molluscan cellular responses to immunologic challenge. *Comp. Pathobiol.* 4:59-71.
- Cheng, T. C. 1979. The role of hemocytic hydrolases in the defense of molluscs against invading parasites. *Haliotis* 8:193-209.
- Cheng, T.C., J. W. Huang, H. Karadogan, L. R. Renwranz y T. P. Yoshino. 1980. Separation of oyster hemocytes by density gradient centrifugation and identification of their surface receptors. *J. Invertebr. Pathol.* 36:35-40.
- Cheng, T. C. 1981. Bivalves. In “Invertebrates Blood Cells, Vol. 2” (N. A. Ratcliffe and A. F. Rowley, Eds.). pp. 231 – 300. Academic Press, London.
- Cheng , T. C. 1983. The role of lysosomes in molluscan inflammation. *Am. Zool.* 23:129-144.
- Cheng, T. C. 1988. *In vitro* effects of heavy metals on cellular defence mechanisms of *Crassostrea Virginica*: phagocytic and endocytic indices. *J. invertebr. Pathol.* 51:215-220.
- Cheng, T. C., G. E. Rodrick, D. A. Foley y S. A. Koehler. 1975. Released of lysozyme from hemolymph cells of *Mercenaria mercenaria* during phagocytosis. *J. Invertebr. Pathol.* 25:125-128.

- Cheng, T. C. y C. U. Downs. 1988. Intracellular acid phosphatase and lysosyme levels in subpopulations of oyster, *Crassostrea Virginica*, haemocytes. *J. Invertebr. Pathol.* 52:163-167.
- Cheng, T. C. 1992. Selective induction of release of hydrolase from *Crassostrea virginica* haemocytes by certain bacteria. *J. Invertebr. Pathol.* 59:197-200.
- Cheng, T. C. y G. E. Rodrick. 1974. Identification and characterization of lysozyme from the hemolymph of the softshelled clam, *Mya arenaria*. *Boil. Bull.* 147:311-320.
- Cheng, T. C. y G. E. Rodrick. 1975. Lysosomal and other enzymes in the hemolymph of *Crassostrea virginica* and *Mercenaria mercenaria*. *Comp Biochem Physiol.* 52B:443-447.
- Chu, F. E. 1988. Humoral defense factor in marine bivalves. *Am. fish. Soc. Spec. Pub.* 18:178-188.
- Chu, F. L. E. y J. F. La Peyre. 1989. Effect of environmental factors and parasitism on hemolymph lysozyme and protein of American oyster (*Crassostrea virginica*). *J. Invertebr. Pathol.* 54:224-232.
- Cooper, K. R., R. S. Brown y P. W. Chang. 1982. Accuracy of blood citological screening techniques for the diagnosis of a possible hematopoietic neoplasm in the bivalve mollusk, *Mya arenaria*. *J. Invertebr. Pathol.* 39:281-289.
- Cronin, M. A., S. C. Culloty y M. F. Mulcahy. 2001. Lysozyme activity and protein concentration in the haemolymph of the flat oyster *Ostrea edulis*. *Fish Shell Immunol.* 11:611-622.

- Darnell, J. E., H. F. Lodish y D. Baltimore. 1986. Molecular Cell Biology. Scientific American Books. 1192 pp.
- Dyrynda, E.A., R.K. Pipe y 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.
- Elston, R. 1984. Prevention and management of infectious diseases in intensive mollusk husbandry. *J. World Maricul Soc.* 15:284-300.
- Elston, R. A., L. Leybovits, D. Relyca y J. Zatila. 1981. Diagnosis of vibriosis in a commercial hatchery epizootic: diagnostics tool and management features. *Aquaculture* 24:53-62.
- Estrada-Muñoz, N. A. 2005. Efecto de las toxinas paralíticas (PSP) del dinoflagelado *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae) en el sistema de defensa de la almeja mano de león, *Nodipecten subnodosus* (Mollusca: Pectinidae). Tesis de maestría. CIBNOR, La Paz, B.C.S. México. 143pp.
- Feng, S. Y. y W. J. Canzonier, 1970. Humoral response in the American oyster (*Crassostrea virginica*) infected with *Buchcephalus* sp. and *Minchinia nelsoni*. *Am. Fish. Soc. Spec. Publ.* 5:479-510.
- Feng, S.Y. 1988. Cellular defence mechanisms of oysters and mussels. *Am. Fish. Soc. Spec. Publ.* 18:153-158.
- Fisher, W.S. 1988. Environmental influence on bivalve hemocyte function. *Am. Fish. Soc. Spec. Publ.* 18:225-237.

- Fisher, W. S. y R. I. E. Newell, 1986. Seasonal and environmental variation in protein and carbohydrate levels in the hemolymph from American oyster (*Crassostrea virginica* Gmelin). *Comp. Biochem. Physiol. A.* 85:365-372.
- Fisher, W. S., M. Auffret y G. Balouet. 1987. Response of European oyster (*Ostrea edulis*) hemocytes to acute salinity and temperature changes. *Aquaculture* 67:179-190.
- Ford, S.E., S. A. Kanaley, y D. T. J. Littlewood. 1993. Cellular responses of oysters infected with *Haplosporidium nelsoni*: changes in circulating and tissue-infiltrating hemocytes. *J. Invertebr. Pathol.* 61:49-57.
- Ford, S.E., K. A. Ashton-Alcox y S. A. Kanaley. 1994. Comparative cytometric and microscopic analyses of oyster hemocytes. *J. Invertebr. Pathol.* 64:114-122.
- Friebel, B. y L. Renwranzt. 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.
- Friedl, F. E., M. R. Alvarez, J. S. Johnson y H. G. Gratzner. 1988. Cytometric investigations on hemocytes of the American oyster, *Crassostrea virginica*. *Tiss. Cell.* 20:933-939.
- Fujimoto K., N. Okino, S. Kawabata, S. Iwanaga y E. Ohnishi. 1995. Nucleotide sequence of the cDNA encoding the proenzyme of phenol oxidase A1 of *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92:7769-7773.

- Gutiérrez-Villaseñor, C. E. y G. Chi-Barragán. 1997. Effect of temperature and feeding ratio on the conditioning of *Lyropecten subnodosus* Sowerby, 1835. pp. 73-75. En: Felix-Pico, E. F. (ed.) Boock of abstracts 11th International Pectinid Workshop, CICIMAR, La Paz, B.C.S., México.
- Harvell, C. D., K. Kim, J. M. Berkholder, R. R. Colwell, P. R. Epstein, D. J. Grimes. 1999. Emergen marine diseases-climate link and antropogenic factors. *Science* 285:1505-1510.
- Hauton, C., L. E. Hawkins y S. Hutchinson. 2001. Response of haemocytes lysosomes to bacterial inoculation in the oyster *Ostera edulis* L. and *Crassostrea gigas* (Thunberg) and the scallop *Pecten maximus* (L.). *Fish Shell. Immunol.* 11:143-153.
- Hawkins, L. E., S. Hutchinson, J. D. Brookes y D. Bucke. 1992. Diferential response of three strain of *O. edulis* to environmental stress. Quantified phenotypic response in morphology and physiology. Proceedings of the twenty seventh European Marine Biology Symposium. 7-11th September 1992. Dublin, Ireland.
- Hine, P.M. 1999. The inter-relationships of bivalve haemocytes. *Fish Shell Immunol.* 9:367-385.
- Hine, P.M. & B. Wesney. 1994. The functional cytology of *Bonamia* sp. (Haplosporidia) infecting oysters *Triostrea chilensis*. *Dis. Aquat. Org.* 20:219-229.
- Iwanaga, S. 1993. The limulus clotting reaction. *Curr. Opin. Immunol.* 5:74-82.

- Iwanaga, T., H. Han, H. Kanazawa y T. Fujita. 1992. Immunohistochemical localization of protein gene product 9.5 (PGP 9.5) in sensory paraneurons of the rat. *Biomed. Res.* 13:225-230.
- Kaneko, T., y R. R. Colwell. 1973. Ecology of *Vibrio parahaemolyticus* in the Chesapeake Bay. *J. Bacteriol.* 113:24-32.
- Kawabata, T., Y. Yasuhara, M. Ochai, S. Matsuura y M. Ashida. 1995. Molecular cloning of insect pro-phenoloxidase: a copper-containing protein homologous to arthropod hemocyanin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92:7774-7778.
- Keen A. M. y E. Coan. 1974. Marine molluscan genera of western north America, an illustrated key. Stanford University Press. 208 pp.
- Le Gall, G., E. Bachère y E. Mialhe. 1991. Chemiluminescence analysis of the activity of *Pecten maximus* hemocytes stimulated with zymosan and host-specific *Rickettsiales-like* organism. *Dis. Aquat. Org.* 11:181-186.
- López-Cortes, L., D. Castro, J. I. Navas, y J. J. Borrego. 1999. Phagocytic and chemotactic response of manila and carpet shell clam haemocytes against *Vibrio tapetis*, the causative agent of brown ring disease. *Fish Shell Immunol.* 9:543-555.
- Lópes, C., M. J. Carballal, C. Azevedo y A. Villalba. 1997. Enzyme characterization of the circulating haemocytes of the carpet shell clam, *Ruditapes decussatus* (Mollusca: Bivalva). *Fish Shell Immunol.* 7:595-608.
- Luna-González, A., A. N. Maeda-Martínez, J. C. Sainz y F. Ascencio-Valle. 2002. comparative susceptibility of veliger larvae of four bivalve molluscs to a *Vibrio alginolyticus* strain. *Dis. Aquat. Organ.* 49:221-226.

- Luna-González, A., A. N. Maeda-Martínez, F. Ascencio-Valle y M. Robles-Mungaray. 2004. Ontogenetic variations of hydrolytic enzymes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Fish Shell Immunol.* 16 (3):287-294.
- Luna-González, A. 2003. Susceptibilidad a *Vibrio alginolyticus* y mecanismos de defensa de moluscos bivalvos. Tesis doctoral. CIBNOR, La Paz, B.C.S. México. 108 pp.
- McDade, J. E. y M. R. Tripp. 1967a. Lysozyme in the hemolymph of the oyster, *Crassostrea virginica*. *J. invertebr. Pathol.* 9:531-535.
- McDade, J. E. y M. R. Tripp. 1967b. Mechanisms of agglutination of red blood cells by oyster hemolymph. *J. invertebr. Pathol.* 9:523-530.
- Möck, A., D. Mitterhuber y L. Renwanz. 1992. Lysozyme activity in the Cephalochordate *Branchiostoma lanceolatum*. *J. Inver. Pathol.* 60:308-309.
- Mohandas, A., T.C. Cheng y 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., J. A. Del Río, M. Durfort y J. García-Valero. 1997. The protozoan parasite *Perkinsus atlanticus* elicits a unique defensive response in the clam *Tapes semidecussatus*. *Parasitology* 114:339-349.
- Moore, C. A. y S. R. Gelder. 1985. Demonstration of lysosomal enzymes in hemocytes of *Mercenaria mercenaria* (Mollusca: bivalvia). *Trans. Am. Microsc. Soc.* 104:242-249.

- Morales-Hernandez, F. y C. Cáceres-Martínez. 1996. Pesquería de la almeja mano de león *Lyropecten subnodosus*. pp. 87-100. En: Casas-Valdez, M. y G. Ponce-Días (eds). Estudio del potencial pesquero y acuícola de Baja Californias Sur. La Paz, B.C.S. México.
- Mortensen, S.H. y J. Glette. 1996. Phagocytic activity of scallop (*Pecten maximus*) haemocytes maintained *in vitro*. *Fish Shell Immunol.* 6:111-121.
- Mounkassa, J. B. y J. Jourdane. 1990. Dynamic of the leukocytic response of *Biomphalaria glabata* during the larval development of *Schistosoma mansoni* and *Echistosoma lici*. *J. Invertebr. Pathol.* 55:306-311.
- Muta T. y S. Iwanaga. 1996. The role of hemolymph coagulation in innate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 8:41-47.
- Nakayama, K., A.M. Nomoto, M. Nishijima y T. Maruyama. 1997. Morphological and functional characterization of hemocytes in the giant clam *Tridacna crocea*. *J. Invertebr. Pathol.* 69:105-111.
- Noël, D., R. Pipe, R. Elston, E. Bachère y E. Mialhe. 1994. Antigenic characterization of hemocyte sub-populations in the mussel *Mytilus edulis* by means of monoclonal antibodies. *Mar. Biol.* 119:549-556.
- Oubella, R., P. Maes, C. Paillard y M. Auffret. 1993. Experimentally induced variation in hemocyte density for *Ruditapes philippinarum* and *Ruditapes decussatus* (Mollusca, Bivalvia). *Dis. Aqua. Org.* 15:193-197.
- Oubella, R., C. Paillard, P. Maes y M. Auffret. 1994. Changes in hemolymph parameters in the manila clam *Ruditapes philippinarum* (Mollusca: Bivalvia) following bacterial challenge. *J. Invertebr. Pathol.* 64:33-38.

- Paillard, C., P. Maes y R. Oubella. 1994. Brown ring disease in clam. *Annu. Rev. Fish Dis.* 4:219-240.
- Pipe, R. K. 1990a. Hydrolytic enzymes associated with the granular haemocytes 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., S.R. Farley y J.A. Coles. 1997. The separation and characterisation of haemocytes from the mussel *Mytilus edulis*. *Cell Tissue Res.* 289:537-545.
- Poder, M. y M. Auffret. 1986. Sarcomatous lesion in the cockle *Cerastoderma edule*: I. Morphology and population survey in Brittany (France). *Aquaculture* 58:1-8.
- Racotta, I., J. L. Ramírez, A. M. Ibarra, M. Rodríguez, D. Carreño y E. Palacios. 2003. Growth and gametogenesis in the lion paw scallop *Nodipecten (Lyropecten) subnodosus*. *Aquaculture* 217(1-4): 335-349.
- Renault, T., Q. G. Xue y S. Chilmonczyk. 2001. Flow cytometric analysis of European flat oyster, *Ostrea edulis*, haemocytes using monoclonal antibody specific for granulocytes. *Fish Shell Immunol.* 11:269-274.
- Renwranz, L. R., T. Yoshino, T. C. Cheng, y K. Auld. 1979. Size determination of hemocytes from the american oyster *Crassostrea virginica*, and the description of a phagocytosis mechanism. *Zool. J. Physiol.* 83:1-12.
- Rodrick, G. E. y Cheng, T. C. 1974. Kinetic properties of lysozyme from the hemolymph of *Crassostrea virginica*. *J. Invertebr. Pathol.* 24:41-48.

- Rodrick, G. E. y S. A. Ulrich. 1984. Microscopical studies on the hemocytes of bivalves and their phagocytic interaction with selected bacteria. *Hengel Meeresun* 37:167-176.
- Rothe G. y G. Valet. 1990. Flow cytometric analysis of respiratory burst activity in phagocytes with hydroethidine and 2,7-dichlorofluorescein. *J. Leukocyte Biol.* 47:440-448.
- Sainz, J. C., A. N. Maeda-Martínez y F. Ascencio-Valle. 1997. Experimental vibriosis induction with *Vibrio alginolyticus* of larvae of the catarina scallop (*Argopecten ventricosus-circularis*) (Sowerby II, 1842). *Microb. Ecol.* 35:188-192.
- Santarem, M. M., J. A. Robledo y A. Figueras. 1994. Seasonal changes in hemocytes and serum defense factor in the blue mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Dis. Aquat. Org.* 18:217-222.
- Simudu, U. Y K. Tsukamoto. 1985. Habitat segregation and biochemical activities of marine members of the family vibrionaceae. *Appl. Environ. Microbiol.* 50:781-790.
- Sindermann, C.J. 1988. Vibriosis of larval oysters. pp. 271-273. *En: Sindermann, C.J. y D.V Lightner, (Eds) Disease Diagnosis and Control in North American Aquaculture. Develop. Aqua. Fish. Sci.* 17, Elsevier, Amsterdam.
- Song Y. y L. Huang. 2000. Applications of immunoestimulant to prevent shrimp diseases. pp 173-187. *En: Fingerman M. y R. Negabhusanam (Eds). Recent advances in marine biotechnology. Science Publishers inc. Plymouth, UK.*

- Sonnenholzner, S., J. Rodríguez, F. Pérez, I. Betancourt, F. Echeverría y J. Calderón. 2002. Sobrevivencia y respuesta inmune de camarones juveniles, *L. vannamei*, desafiados a WSSV a diferentes temperaturas. *Panorama acuícola magazine*. Mar-Abr 2002, 50-51.
- Sotelo-Mundo, R. R., M. A. Islas-Osuna, E. De-La-Re-Vega, J. Hernández-López, F. Vargas-Albores y G. Yepiz-Plascencia. 2003. CDNA cloning of the lysozyme of the white shrimp *Penaeus vannamei*. *Fish Shell Immunol.* 15(4):325-331.
- Söderhäll, K., L. Cerenius y M. W. Johansson. 1994. The prophenoloxidase activating system and its role in vertebrate defense. Primordial immunity: foundations for the vertebrate immune system. 712 of the Ann. N.Y. Acad. Sci. 712:155-161.
- Sugumar, G., T. Nakai, Y. Hirata, D. Matsubara y K. Muroga. 1998. *Vibrio splendidus* biovar II as the causative agent of bacillary necrosis of Japanese oyster *Crassostrea gigas* larvae. *Dis. Aquatic Org.* 33:111-118.
- Suzuki, T. y M. Awaji. 1995. Wound-induced hematopoiesis in connective tissues of digestive canal in pearl oyster, *Pinctada fucata martensii*. *J. Mar. Biotechnol.* 3:168-170.
- Torreilles, J., M. C. Guérin y P. Roch. 1997. Peroxidase-release associated with phagocytosis in *Mytilus galloprovincialis* haemocytes. *Dev. Comp. immunol.* 21:267-275.
- Thompson, R. J. 1977. Blood chemistry, biochemical composition, and the annual reproductive cycle in the giant scallop, *Placopecten magellanicus*, from southeast Newfoundland. *J. Fish. Res. Board. Canad.* 34:2104-2116.

- Tripp, M. R. 1992. Phagocytosis by hemocitos of the hard clam, *Mercenaria mercenaria*. *J. Invertebr. Pathol.* 59:222-227.
- Tubiash, H. S., P. E. Chanley y E. Leipson. 1965. Bacillar necrosis a disease of larval bivalve mollusks. 1. Etiology and epizootiology. *J. Bacteriol.* 90:1036-1044.
- Tubiash, H.S. y S.V. Otto. 1986. Bacterial problems in oysters: a review. *En: Vivares; C. P., J. R. Bonami y E. Jasper (eds). Pathology in marine aquaculture. European Aquaculture Society, Special Publ. No. 8. Breden. pp. 233-242.*
- Uriarte, I., G. Rupp y A. Abarca. 2001. Producción de juveniles de pectínidos iberoamericanos bajo condiciones controladas. *En: Maeda-Martínez, A. N (ed.). Los moluscos pectínidos de Iberoamérica: ciencia y acuacultura. Limusa. México.*
- Van Eeden, F. J., M. Granato, J. Odenthal, y P. Haffter. 1999. Developmental mutant screens in the zebrafish. *Methods. Cell. Biol.* 60:21-41.
- Van Handel, E. 1965. Estimation of glycogen in small amounts of tissue. *Analyt. Biochem.* 11(2):256-265.
- Vargas-Albores, F. y M. A. Barracco. 2001. Mecanismos de defensa de los moluscos bivalvos, con énfasis en pectínidos. 33, 127-146. *En: Maeda-Martínez, A. N., (ed). Los moluscos pectinidos de Iberoamerica: ciencia y acuacultura. Editorial Limusa.*
- Villalejo-Fuerte M., M. Arellano-Martínez, M. Robles-Mungaray y B. P. Ceballos-Vázquez. 2004. Growth of lion-paw scallop *Nodipecten* (= *Lyropecten*) *subnodosus* (Sowerby, 1835) maintained in suspended culture in Bahía Juncalito, Golfo de California, México. *Hidrobiológica* 14:1-5.

- Wootton, E. C., E. A. Dyrinda y N. A. Ratcliffe. 2003. Bivalve immunity: comparison between the marine mussel (*Mytilus edulis*), the edible cockle (*Cerastoderma edule*) and the razor-shell (*Ensis siliqua*). *Fish Shell. Immunol.* 15:195-210.
- Xue, Q. Y T. Renault. 2000. Enzymatic activities in European flat oyster, *Ostrea edulis*, and pacific oyster, *Crassostrea gigas*, hemolymph. *J. Invertebr. Pathol.* 76:155-163.
- Yoshino, T. P. y T. C. Cheng. 1976. Fine structural localization of acid phosphatase in granulocytes of the pelecypod *Mercedenaria mercenaria*. *Trans. Amer. Micros. Soc.* 95:215-220.

ANEXO I

a) Análisis de varianza de los conteos de hemocitos.

Análisis de varianza de los tratamientos y control.

Variable	SC	GL	CM	F	p
Tratamientos	41E13	9	45E12	3.911	.001*

Prueba de Tukey para observar las diferencias estadísticas en el número de hemocitos.

	Control	6 horas	24 horas	3 días	6 días	10 días
Control		0.045529	0.206871	0.959725	0.067017	0.939406
6 horas	0.045529		0.002212	0.678449	0.999994	0.031230
24 horas	0.206871	0.002212		0.164565	0.003087	0.776029
3 días	0.959725	0.678449	0.164565		0.748741	0.745017
6 días	0.067017	0.999994	0.003087	0.748741		0.043257
10 días	0.939406	0.031230	0.776029	0.745017	0.043257	

b) Análisis de varianza de las tallas de los organismos.

Effect	SC	GL	CM	F	p
Tallas	3.454	4, 5	.863	.202	.935

c) Análisis de varianza de la medición de Diámetros.

Análisis de varianza de los tratamientos y control.

Variable	SC	GL	CM	F	p
Diámetros	159.8	5	31.96	7.345	.000*

Prueba de Tukey para observar las diferencias estadísticas en el diámetro de los hemocitos.

	Control	6 horas	24 horas	3 días	6 días	10 días
Control		0.013640	0.771568	0.621029	0.001088	0.999479
6 horas	0.013640		0.004996	0.773238	0.000021	0.058921
24 horas	0.771568	0.004996		0.219859	0.320928	0.972599
3 días	0.621029	0.773238	0.219859		0.000287	0.683987
6 días	0.001088	0.000021	0.320928	0.000287		0.056307
10 días	0.999479	0.058921	0.972599	0.683987	0.056307	

d) Análisis de varianza de la medición de áreas.

Análisis de varianza de los tratamientos y el control.

Variable	SC	GL	CM	F	p
Tratamiento	818E2	5	164E2	7.363	.000*

Prueba de Tukey para observar las diferencias estadísticas en el área de los hemocitos.

	Control	6 horas	24 horas	3 días	6 días	10 días
Control		0.012694	0.659514	0.496105	0.001962	1.000000
6 horas	0.012694		0.002755	0.840482	0.000021	0.101918
24 horas	0.659514	0.002755		0.116529	0.478110	0.865578
3 días	0.496105	0.840482	0.116529		0.000253	0.734394
6 días	0.001962	0.000021	0.478110	0.000253		0.041021
10 días	1.000000	0.101918	0.865578	0.734394	0.041021	

e) Análisis de varianza de la concentración enzimática.

Análisis de varianza de la concentración enzimática de SLH entre tiempos

Variable	GL	CM	F	p
Tiempo	10	51.05	22.11	.000*

Análisis de varianza de la concentración enzimática de SLH entre enzimas

Variable	GL	CM	F	p
Enzimas	5	51.05	16.09	.004*

Análisis de varianza de la concentración enzimática de plasma entre enzimas.

Variable	GL	CM	F	p
Enzimas	4	51.05	22.11	.000*

Análisis de varianza de la concentración enzimática de plasma entre tiempos.

Variable	GL	CM	F	p
Tiempos	5	51.05	16.00	.000*

f) Análisis de varianza de la concentración de lisozima.

Análisis de varianza de la concentración de lisozima en SLH.

Variable	SC	GL	CM	F	p
Tiempos	1625	5	325.0	3.974	.013*

Prueba de Tukey para observar las diferencias estadísticas de la concentración de lisozima en SLH entre los lotes.

	Control	6 horas	24 horas	3 días	6 días	10 días
Control		0.104627	0.999811	0.084591	0.973969	0.999903
6 horas	0.104627		0.166814	0.999997	0.353504	0.067992
24 horas	0.999811	0.166814		0.136713	0.996391	0.995963
3 días	0.084591	0.999997	0.136713		0.299884	0.054477
6 días	0.973969	0.353504	0.996391	0.299884		0.921927
10 días	0.999903	0.067992	0.995963	0.054477	0.921927	

Análisis de varianza de la concentración de lisozima en plasma.

Variable	SC	GL	CM	F	p
Tiempo	1256	5	251.2	2.244	0.94

Prueba de Tukey para observar las diferencias estadísticas de la concentración de lisozima en plasma entre los lotes.

	Control	6 horas	24 horas	3 días	6 días	10 días
Control		0.358749	0.917438	0.450357	0.053120	0.655862
6 horas	0.358749		0.891375	0.999976	0.872454	0.994685
24 horas	0.917438	0.891375		0.945098	0.300510	0.993774
3 días	0.450357	0.999976	0.945098		0.792439	0.999245
6 días	0.053120	0.872454	0.300510	0.792439		0.592843
10 días	0.655862	0.994685	0.993774	0.999245	0.592843	