

UNIVERSITAT DE BARCELONA

DEPARTAMENT DE BIOLOGIA CEL·LULAR ANIMAL I VEGETAL

**Respuesta defensiva inducida por *Perkinsus atlanticus*.
Reacción celular y expresión de p225 en *Tapes* spp.**

Juan Francisco Montes Castillo

Barcelona 1997

UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE BIOLOGIA

DEPARTAMENT DE BIOLOGIA CEL·LULAR ANIMAL I VEGETAL

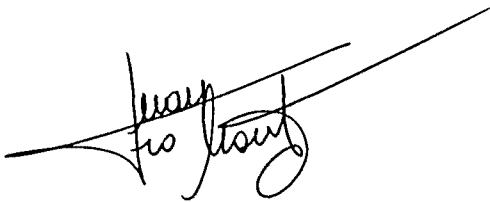
Programa Biologia Cel·lular

Bienio 1991-93

Memoria presentada por **Juan Francisco Montes Castillo** para optar al grado de Doctor en Biología.

El presente trabajo ha sido realizado bajo la dirección del **Dr. José García Valero** en el Departament de Biologia Cel·lular Animal i Vegetal.

El interesado



Juan Francisco Montes Castillo

Vº Bº del Director de la Tesis



Dr. José García Valero

Barcelona, Marzo 1997

A mis padres

Agradecimientos

Deseo expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que de una u otra forma han contribuido en la realización de esta Tesis Doctoral.

Mi infinita gratitud al Dr. Josep García Valero por su constante dedicación, entusiasmo y rigor científico, pero sobretodo por su amistad.

Mi más sincero agradecimiento a la Dra. Mercè Durfort Coll, Directora del Departamento, por abrirme las puertas del mismo, procurándome condiciones y confianza para la realización de la presente memoria.

A los integrantes del grupo de Histopatología de Moluscos quiero agradecerles la colaboración y el apoyo recibido a lo largo de este trabajo, especialmente a la Dra. Elena Sagristà Mateo.

Al Dr. Senén Vilaró Coma, al Dr. Eduardo Soriano García y a la Dra. Dolores López Tejero quiero darles las gracias por su estímulo y ayuda desinteresada.

Mi agradecimiento a todos los miembros del Servei de Microscopia Electrònica de la Universitat de Barcelona por su constante apoyo y cordialidad. Especialmente, deseo expresar mi reconocimiento a Almudena García por su amabilidad, afecto e inestimable ayuda.

A Lola y Mar quiero agradecerles su inestimable cooperación. Gracias por todas las incubaciones compartidas.

A Ricardo, a Toni y a Carme Auladell les agradezco no sólo su desinteresado apoyo, sino también su generosidad y amistad.

A los ex-Becarios de Colaboración Docente - Albert, Carme, David, Muntsa y Roser - gracias por todo. Gracias por los buenos momentos compartidos en el laboratorio y en las prácticas.

A Isabel, Marta, Mònica y David quiero agradecerles su generosidad y sobretodo sus sonrisas. También quiero agradecer a Jordi su contribución en la realización de los dibujos.

Por último, quiero dar las gracias a mis padres por ser fuente inagotable de estímulo.

Índice

Listado de abreviaturas	<i>iii</i>
Introducción	1
1. Estrategias defensivas	1
2. Características de los mecanismos defensivos de invertebrados	1
2.1. Defensa humoral	1
2.1.1. Lectinas	2
2.1.2. Proteínas semejantes al complemento	2
2.1.3. Hemolina	3
2.1.4. Péptidos antimicrobianos inducibles	3
2.2. Defensa celular	4
2.2.1. Fagocitosis	4
2.2.2. Encapsulación	5
2.3. Señalización y mediadores de los mecanismos defensivos	5
3. Mecanismos defensivos de moluscos con especial referencia a bivalvos	6
3.1. Defensa humoral	6
3.1.1. Lectinas	6
3.1.2. Péptidos con actividad antimicrobiana	7
3.2. Defensa celular	8
3.2.1. Fagocitosis	9
3.2.2. Encapsulación	10
3.3. Señalización y mediadores de los mecanismos defensivos	11
4. <i>Perkinsus</i>	11
4.1. Taxonomía y filogenia	12
4.2. Ciclo vital y estructuras de las fases	12
4.3. Relación huésped-parásito	14
Objetivos	17

Resultados	19
Capítulo I. Cellular defence mechanism of the clam <i>Tapes semidecussatus</i> against infection by the protozoan <i>Perkinsus</i> sp.	19
Capítulo II. Characterization and localization of an Mr 225 kDa polypeptide specifically involved in the defence mechanisms of the clam <i>Tapes semidecussatus</i>	39
Capítulo III. When the venerid clam <i>Tapes decussatus</i> is parasitized by the protozoan <i>Perkinsus</i> sp. it synthesizes a defensive polypeptide that is closely related to p225	63
Capítulo IV. The protozoan parasite <i>Perkinsus atlanticus</i> elicits a unique defensive response in the clam <i>Tapes semidecussatus</i>	81
Discusión general	103
Conclusiones	107
Bibliografía	109

Listado de abreviaturas

<i>A. fulica</i>	<i>Achatina fulica</i> (Molusco, Gasterópodo)
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
<i>B. glabrata</i>	<i>Biomphalaria glabrata</i> (Molusco, Gasterópodo)
BrdU	5'-Bromodeoxiuridina
<i>C. gigas</i>	<i>Crassostrea gigas</i> (Molusco, Bivalvo)
<i>C. virginica</i>	<i>Crassostrea virginica</i> (Molusco, Bivalvo)
Endo H	Endo- β -N-acetilglucosaminidasa
FTM	Medio de tioglicolato
GalNAc	N-acetil-D-galactosamina
<i>H. ruber</i>	<i>Haliotis ruber</i> (Molusco, Gasterópodo)
IL	Interleuquina
kDa	Kilodaltons
<i>L. flavus</i>	<i>Limax flavus</i> (Molusco, Gasterópodo)
LD	Densidad de marca
LPS	Lipopolisacárido
<i>M. balthica</i>	<i>Macoma balthica</i> (Molusco, Bivalvo)
<i>M. edulis</i>	<i>Mytilus edulis</i> (Molusco, Bivalvo)
<i>M. mercenaria</i>	<i>Mercenaria mercenaria</i> (Molusco, Bivalvo)
NO	Óxido nítrico
<i>P. atlanticus</i>	<i>Perkinsus atlanticus</i> (Apicomplejo, Perkinsea)
<i>P. fucata</i>	<i>Pinctada fucata</i> (Molusco, Bivalvo)
<i>P. karlssoni</i>	<i>Perkinsus karlssoni</i> (Apicomplejo, Perkinsea)
<i>P. marinus</i>	<i>Perkinsus marinus</i> (Apicomplejo, Perkinsea)
<i>P. olseni</i>	<i>Perkinsus olseni</i> (Apicomplejo, Perkinsea)
PAS	Ácido periódico de Schiff
PO	Fenol oxidasa
ROIs	Intermediarios de oxígeno reactivo
<i>T. decussatus</i>	<i>Tapes decussatus</i> (Apicomplejo, Perkinsea)
<i>T. semidecussatus</i>	<i>Tapes semidecussatus</i> (Molusco, Bivalvo)
TNF	Factor de necrosis tumoral
<i>V. ater</i>	<i>Viviparus ater</i> (Molusco, Gasterópodo)

Introducción

1. ESTRATEGIAS DEFENSIVAS

Todos los metazoos presentan sistemas de defensa que permiten discriminar alteraciones en la organización de los tejidos. La totalidad de las estrategias o mecanismos defensivos resultan de la interacción de factores humorales y celulares. Entre estos mecanismos, el sistema inmunitario de los vertebrados es el más complejo, siendo sus características diferenciales la especificidad, la memoria y la diversidad (revisado por Roitt, 1991; Paul, 1993).

2. CARACTERÍSTICAS DE LOS MECANISMOS DEFENSIVOS DE INVERTEBRADOS

Los invertebrados, a diferencia de los vertebrados, constituyen un grupo polifilético que presenta, en consecuencia, una gran variedad de mecanismos defensivos (revisado por Ratcliffe y Rowley, 1981; Ratcliffe y cols., 1985; Šíma y Větvíčka, 1992; Rinkevich y Müller, 1996). Estos mecanismos no son anticipativos (Klein, 1989), en contraposición a la inmunidad adaptativa de los vertebrados (Roitt 1991; Paul, 1993). En este sentido, los invertebrados carecen de los elementos que caracterizan el sistema inmunitario de los vertebrados superiores, incluyendo (i) los genes de reordenamiento de las inmunoglobulinas (Klein, 1989), (ii) diversos linajes de linfocitos (Anderson, 1981) y (iii) las proteínas del complejo principal de histocompatibilidad de clase I y II (Smith y Davidson, 1992). Es un hecho aceptado que las respuestas defensivas de invertebrados adolecen de especificidad y memoria (Anderson, 1981; Klein, 1989; Marchalonis y Schluter, 1990; Smith y Davidson, 1992).

A pesar de las carencias señaladas, los invertebrados son capaces de desarrollar eficaces respuestas defensivas basadas en la acción coordinada de sus efectores humorales y celulares (revisado por Ratcliffe y cols., 1985; Loker, 1994; Rinkevich y Müller, 1996). Estas respuestas exhiben notables similitudes con las que son características de la inmunidad innata de los vertebrados (Abbas y cols., 1994; Hoffmann y cols., 1996). Por último, se ha sugerido que varias moléculas que evidencian cierta similitud estructural con las citoquinas de vertebrados, podrían actuar como mediadores químicos en los sistemas defensivos de algunos grupos de invertebrados (revisado por Beck y Habicht, 1991, 1994; Ottaviani y cols., 1995).

2.1. Defensa humoral

Numerosos factores humorales de origen hemocitario y/u orgánico han sido implicados en reacciones defensivas de naturaleza inespecífica (revisado por Ratcliffe y cols., 1985; Loker, 1994; Rinkevich y Müller, 1996). Algunos de estos factores, como lectinas, aglutininas, el sistema de activación de la fenol oxidasa y la hemolina, actúan como moléculas de reconocimiento,

incrementando o modulando la reactividad de los efectores celulares circulantes (Rinkevich y Müller, 1996). La asunción generalizada es que estas moléculas no sólo reconocen estructuras microbianas muy conservadas, como lipopolisacáridos (LPS) de bacterias Gram-negativas, peptidoglucanos de bacterias Gram-positivas y β -1,3-glucanos fúngicos (Janeway, 1989), sino también polianiones y restos celulares liberados a raíz de un daño tisular (Ratcliffe y cols., 1985; Hoffmann, 1995). Por otra parte, varios componentes humorales, fundamentalmente péptidos de bajo peso molecular, presentan actividad antimicrobiana (revisado por Ratcliffe y cols., 1985; Boman, 1995; Hoffmann y cols., 1996; Karp, 1996). Aunque la expresión de algunos efectores humorales de invertebrados es inducible tras estimulación antigénica, éstos carecen de las propiedades anamnésicas que muestran las inmunoglobulinas de vertebrados (Ratcliffe y cols., 1985; Loker, 1994).

2.1.1. Lectinas

Las lectinas/aglutininas son proteínas ubicuas que reconocen secuencias específicas de residuos glucídicos localizados en posición terminal o subterminal (Goldstein y Poretz, 1988; Drickamer y Taylor, 1993; Drickamer, 1995). Estas moléculas han sido consideradas como uno de los principales factores defensivos de invertebrados e implicadas en el reconocimiento de lo no propio (revisado por Renwranz, 1983; Ratcliffe y cols., 1985; Vasta y Marchalonis, 1985; Olafsen, 1986; Richman y Kafatos, 1995; Leclerc, 1996; Vasta y Ahmed, 1996). Así, varias lectinas participan en la opsonización de bacterias y hongos, proporcionando un vínculo entre los mecanismos de defensa humoral y celular (Bayne, 1990). Además, dado que estas moléculas pueden establecer dos o más enlaces con las glucoproteínas o glucolípidos de las superficies celulares, también han sido asociadas con la inactivación de bacterias mediante su aglutinación (Ratcliffe y cols., 1985; Kamiya, 1995).

Por otra parte, existen evidencias de que algunas lectinas intervienen en la hemostasis de estos organismos, mediando la agregación de células circulantes (revisado por Srimal, 1996). En este sentido, ha sido caracterizada una lectina de insectos, la hemocitina, implicada en la aglutinación de bacterias mediante la agregación de los hemocitos (Kotani y cols., 1995). Esta lectina, sintetizada por los hemocitos, es una molécula de adhesión de 260 kDa perteneciente al grupo de lectinas de tipo C. Además, la secuencia de la hemocitina exhibe gran homología con el factor de von Willebrand y con los factores de coagulación V y VIII de mamíferos.

2.1.2. Proteínas semejantes al complemento

En equinodermos, se ha descrito actividad semejante a la del complemento de vertebrados (Bertheussen, 1982, 1983; Leonard y cols., 1990), aunque estas moléculas no han sido identificadas en otros grupos de invertebrados (Renwranz, 1983; Ratcliffe y cols., 1985).

2.1.3. Hemolina

La hemolina, una proteína humoral de insectos, es la primera molécula perteneciente a la superfamilia de las inmunoglobulinas que ha sido implicada en las respuestas defensivas de invertebrados (Sun y cols., 1990; Lindström-Dinnetz y cols., 1995). Esta proteína de 48 kDa es sintetizada por los cuerpos grasos y hemocitos como consecuencia de una infección bacteriana (Wang y cols., 1995). Sin embargo, a diferencia del resto de proteínas inducibles que han sido identificadas en invertebrados, la hemolina no exhibe actividad antibacteriana directa (Zhao y Kanost, 1996). Diferentes análisis funcionales revelan que esta proteína se une a las paredes celulares bacterianas y a los hemocitos (Zhao y Kanost, 1996), estimulando la fagocitosis y evitando la agregación hemocitaria (Ladendorff y Kanost, 1991; Lanz-Mendoza y cols. 1996). Recientemente, se ha sugerido que la hemolina podría ser una molécula de reconocimiento básica para la regulación de las respuestas defensivas de insectos (Lindström-Dinnetz y cols., 1995; Lanzmendoza y cols., 1996).

2.1.4. Péptidos antimicrobianos inducibles

Los péptidos antimicrobianos inducibles componen el grupo de factores defensivos humorales mejor caracterizado de invertebrados (revisado por Cociancich y cols., 1994; Hetru y cols., 1994; Boman, 1995; Hoffmann y cols., 1996; Karp, 1996). Estas moléculas, por lo general de pequeño tamaño y catiónicas, han sido clasificadas en cinco familias atendiendo a la homología de secuencia, estructura tridimensional y función (Cociancich y cols., 1994; Boman, 1995). Exhiben actividad frente a numerosas bacterias y/u hongos, siendo la expresión inducible a raíz de un proceso infeccioso o daño tisular (Hoffmann, 1995; Hoffmann y cols., 1996). Por otra parte, en las regiones promotoras de numerosos genes de insectos que codifican péptidos antibióticos se han identificado secuencias diana κ B, homólogas a aquéllas de mamíferos implicadas en la transcripción de la cadena ligera κ de las inmunoglobulinas y de varias proteínas reactivas de fase aguda (Engström y cols., 1993; Kappler y cols., 1993). De este modo, se ha sugerido que algunas vías reguladoras de las respuestas defensivas de insectos comparten características esenciales con aquéllas involucradas en la inmunidad innata de los vertebrados (Boman, 1995; Hoffmann y cols., 1996).

Las defensinas constituyen la familia de péptidos antimicrobianos más abundante y extendida de invertebrados (revisado por Hoffmann y Hetru, 1992; Cociancich y cols., 1994; Boman, 1995; White y cols., 1995; Hoffmann y cols., 1996). Aquéllas de insectos son péptidos pequeños, ligeramente catiónicos y no glicosilados, constituidos por 34-43 aminoácidos con seis restos cisteína que establecen tres puentes disulfuro intramoleculares (White y cols., 1995). Las defensinas de insectos, sintetizadas por los cuerpos grasos y los hemocitos, son secretadas en la hemolinfa como consecuencia de una infección bacteriana. Cociancich y cols. (1993) han determinado que la actividad bactericida de estas moléculas es consecuencia de la formación de canales dependientes de voltaje que provocan la permeabilidad de las membranas bacterianas al K^+ .

Aunque las defensinas de insectos muestran homología de secuencia con las defensinas de mamíferos, difieren de éstas en algunos aspectos. Así, las defensinas de humanos, sintetizadas por neutrófilos y células de Paneth, no son inducibles ni secretadas en sangre (Lehrer y cols., 1993; Boman, 1995; Selsted y Ouellette, 1995). Asimismo, mientras las defensinas de insectos son predominantemente activas contra bacterias Gram-positivas (Hoffman y Hetru, 1992; White y cols., 1995), aquéllas de mamíferos lo son, además, frente a bacterias Gram-negativas y hongos (Lehrer y cols., 1993; Boman, 1995).

2.2. Defensa celular

Las células circulantes de los invertebrados, denominadas **hemocitos** en aquellos organismos que poseen un hemocele o **celomocitos** en animales que muestran un celoma bien desarrollado, son los elementos determinantes en la defensa de estos organismos (revisado por Ratcliffe y Rowley, 1981; Ratcliffe y cols., 1985; Šíma y Větvička, 1992). A diferencia de los efectores celulares de vertebrados, aquéllos de invertebrados presentan una gran diversidad morfológica (Anderson, 1981). Los hemocitos/celomocitos, movilizados rápidamente hacia los lugares de infección, daño tisular o inflamación, pueden fagocitar partículas u organismos de pequeño tamaño, participar en la encapsulación de cuerpos extraños demasiado voluminosos y sintetizar diferentes moléculas efectoras (revisado por Ratcliffe y Rowley, 1981; Ratcliffe y cols., 1985; Bayne, 1990; Šíma y Větvička, 1992; Loker, 1994; Rinkevich y Müller, 1996).

2.2.1. Fagocitosis

La **fagocitosis** es el mecanismo defensivo más importante de invertebrados, constituyendo, además, la característica que define a sus efectores celulares (Ratcliffe y Rowley, 1981; Ratcliffe y cols., 1985; Šíma y Větvička, 1992). Se han descrito fenómenos de opsonización, mediados por lectinas u otros factores humorales, en numerosos grupos de invertebrados, incluyendo protóstomos y deuteróstomos (revisado por Ratcliffe y cols., 1985; Olafsen, 1986; Bayne, 1990; Rinkevich y Müller, 1996). Asimismo, también se ha demostrado la existencia de procesos de fagocitosis independientes de opsoninas (revisado por Bayne, 1990).

En numerosos grupos de invertebrados, la fagocitosis también está vinculada con subsecuentes actividades antimicrobianas y citotóxicas mediadas por enzimas lisosomales (Feng, 1988; Bayne, 1990), radicales citotóxicos de oxígeno (Adema y cols., 1991; Torreilles y cols., 1996) y óxido nítrico (revisado por Franchini y cols., 1995a), intensificando, así, la eficacia de este proceso.

2.2.2. Encapsulación

La **encapsulación** constituye una estrategia defensiva desarrollada por todos los metazoos que facilita la inmovilización y, en ocasiones, la destrucción de aquellos parásitos demasiado voluminosos para ser fagocitados por una sola célula (Bayne, 1990). Los efectores celulares circulantes de invertebrados intervienen directamente en la elaboración de estas cápsulas, cooperando, a veces, otros modelos celulares, principalmente de origen conjuntivo (revisado por Ratcliffe y Rowley, 1981; Ratcliffe y cols., 1985). Además, durante la encapsulación puede producirse la degranulación de los hemocitos con la consiguiente secreción de hidrolasas lisosomales, contribuyendo, de esta forma, a la inactivación de los parásitos (Bayne, 1990).

El depósito de melanina sobre la superficie de parásitos es un fenómeno asociado con frecuencia a la formación de cápsulas en insectos (Salt, 1963; Poinar y cols., 1968; Christensen y Forton, 1986; Guo y cols., 1995), crustáceos (Johansson y Söderhäll, 1989), anélidos (Porchet-Henneré y Vernet, 1992) y nemátodos (Nayar y Knight, 1995; Steiner, 1996). Este proceso, denominado **melanización**, es el resultado de la actividad del enzima fenol oxidasa (PO), una tirosinasa dependiente de cobre que cataliza la conversión de fenoles y aminas aromáticas en *o*-quinonas, que posteriormente polimerizan dando lugar a melanina (revisado por Richman y Kafatos, 1995; Johansson y Söderhäll, 1996). En los hemocitos de artrópodos, este enzima se presenta como precursor inactivo, la proPO, siendo liberado tras lisis celular en las proximidades de los parásitos. La proPO es activada mediante proteólisis por serina proteasas humorales específicas (Aspán y cols., 1990; Aspán y cols., 1995), activadas éstas, a su vez, por diversos componentes de las paredes celulares microbianas, como LPS, peptidoglucanos y β -1,3-glucanos (Johansson y Söderhäll, 1996). De este modo, se ha sugerido que en un numeroso grupo de invertebrados, el sistema de activación de la proPO forma parte de un sistema de reconocimiento innato (Richman y Kafatos, 1995; Johansson y Söderhäll, 1996). En este sentido, la PO ha sido involucrada en la melanización de diversos parásitos, aunque sin intervención hemocitaria directa (Poinar y Leutenegger, 1971; Vey and Götze, 1975; Paskewitz y cols., 1988).

2.3. Señalización y mediadores de los mecanismos defensivos

Varias moléculas con cierta similitud estructural a las **citoquinas**, polipéptidos que regulan la amplitud y duración de las respuestas inflamatorias e inmunitarias de los mamíferos (Roitt, 1991; Paul, 1993), han sido identificadas no sólo en invertebrados deuteróstomos (revisado por Beck y Habicht, 1991, 1994; Cooper, 1995; Matranga, 1996; Saito, 1996), sino también en protóstomos, incluyendo moluscos (revisado por Ottaviani y cols., 1995; Clatworthy, 1996), anélidos (Cooper y cols., 1995) y artrópodos (Scharer y cols., 1996). Los datos existentes en la actualidad sugieren que estas moléculas podrían constituir potentes mediadores en los sistemas defensivos de estos organismos (Beck y Habicht, 1994; Ottaviani y cols., 1995).

3. MECANISMOS DEFENSIVOS DE MOLUSCOS CON ESPECIAL REFERENCIA A BIVALVOS

3.1. Defensa humoral

Lectinas y péptidos con actividad antimicrobiana son los factores humorales que han sido implicados en las respuestas defensivas de moluscos (revisado por Bayne, 1983; Olafsen, 1986, 1988; Fryer y Bayne, 1996).

3.1.1. Lectinas

Las **lectinas** son componentes habituales de la hemolinfa de moluscos, llegando a representar, en algunas especies, hasta el 80% de la proteína soluble (Odo y cols., 1995). Numerosas lectinas de moluscos se caracterizan por la facultad de aglutinar y, en ocasiones, opsonizar bacterias u otros parásitos (revisado por Ratcliffe y cols., 1985; Olafsen, 1986, 1988; Chu, 1988; Bayne, 1990; Clatworthy, 1996). Por este motivo, las lectinas de moluscos son consideradas como las moléculas de reconocimiento de estos organismos. También se caracterizan por su elevada capacidad para aglutinar eritrocitos de diferentes especies de vertebrados, incluyendo humanos (Boyd y cols., 1966; Tripp, 1966; Hammarström, 1974; Hardy y cols., 1977; Bretting y cols., 1983), caballos (Tripp, 1966; Hardy y cols., 1977; Suzuki y Mori, 1989), conejos (Jenkin y Rowley, 1970; Tuan y Yoshino, 1987; Fisher y DiNuzzo, 1991), ovejas (Acton y cols., 1969), ratas (Jenkin y Rowley, 1970) y gallinas (Fisher y DiNuzzo, 1991).

En general, se desconocen los órganos, tejidos o células responsables de la síntesis de las lectinas de moluscos. No obstante, los hemocitos, en el gasterópodo *Lymnaea stagnalis* (van der Knaap y cols., 1981), y células granulares del manto, en el bivalvo *Pinctada fucata* (Suzuki y Mori, 1991), han sido implicados en la producción de diversas lectinas de estos organismos.

En cambio, varias lectinas de moluscos se incluyen entre las lectinas mejor caracterizadas de invertebrados, como las de los gasterópodos *Helix pomatia* (Hammarström y cols., 1972; Hammarström, 1974; Vretblad y cols., 1979), *Limax flavus* (Miller y cols., 1982), *Biomphalaria glabrata* (Bretting y cols., 1983) y *Achatina fulica* (Basu y cols., 1986), y las de los bivalvos *Crassostrea gigas* (Hardy y cols., 1977), *Tridacna maxima* (Baldo y cols., 1978) y *Tridacna derasa* (Odo y cols., 1995). Las lectinas de moluscos suelen evidenciar una estructura común compuesta de pequeñas subunidades idénticas de 20-21 kDa, unidas por enlaces no covalentes. Además, acostumbra a ser moléculas no dializables, inactivadas a temperaturas de 65-70°C y que requieren iones calcio para desarrollar su actividad aglutinadora (Olafsen, 1986, 1988; Chu, 1988).

Muchas lectinas de bivalvos actúan como opsoninas, incrementando, en estas ocasiones, la eficiencia de las células fagocitarias (revisado por Chu, 1988; Olafsen, 1988; Clatworthy, 1996). La

gigalina H y la gigalina E son dos lectinas humorales de la ostra *C. gigas* con capacidad para aglutinar, respectivamente, eritrocitos humanos y de caballo. Además diferentes ensayos experimentales demuestran que estas lectinas actúan como opsoninas de diferentes especies bacterianas (Hardy y cols., 1977). La gigalina H está compuesta por múltiples subunidades de 21 y 22.5 kDa que forman en su estado nativo agregados moleculares que oscilan entre 500 y 1600 kDa. Esta lectina presenta especificidad por los restos glucídicos N-acetil-D-glucosamina, N-acetil-D-galactosamina (GalNAc) y por el ácido N-acetil-neuramínico. Aunque se desconoce la especificidad de la gigalina E, ésta no presenta afinidad por el ácido siálico. Ambas proteínas son extremadamente hidrofóbicas con tendencia a la agregación, especialmente en presencia de calcio (Olafsen, 1986). Por último, Olafsen y cols. (1992) han sugerido que estas lectinas pueden constituir una primera línea de defensa de carácter inducible, dado que en esta ostra la inoculación de la bacteria *Vibrio anguillarum* provoca un incremento en la concentración y actividad de ambas moléculas.

Asimismo, en la almeja *Mercenaria mercenaria* Arimoto y Tripp (1977) han caracterizado una aglutinina específica para restos GalNAc que también incrementa la capacidad fagocítica de los hemocitos de esta almeja por las bacterias. Renwranz y Stahmer (1983) han purificado una aglutinina de 480 kDa de la hemolinfa del mejillón *Mytilus edulis*. Esta lectina, afín por la mucina submaxilar bovina, estimula la fagocitosis hacia levaduras. Finalmente, Yang y Yoshino (1990) han identificado una aglutinina compuesta por dos subunidades idénticas de 20 kDa y que presenta afinidad por los restos glucídicos 2-deoxi-D-glucosa y GalNAc. Diversos experimentos realizados *in vitro* evidencian que esta lectina, aislada de la hemolinfa de la almeja *Corbicula fluminea*, desarrolla una actividad opsonizante.

Es interesante resaltar que numerosas lectinas de moluscos presentan como característica común el reconocimiento de restos de ácido siálico, como la LFA de *L. flavus* (Miller y cols., 1982), la lectina I de *B. glabrata* (Bretting y cols., 1983), la gigalina H de *C. gigas* (Hardy y cols., 1977), la achatinina H de *A. fulica* (Basu y cols., 1986) y la lectina descrita en *P. fucata* (Suzuki y Mori, 1989, 1990). A pesar de la coincidencia en la diana, el ácido siálico es ausente tanto en las glucoproteínas de moluscos (Bolognani Fantin y Bolognani 1964a, b; Ottaviani y cols., 1990), como en los glicoconjugados de bacterias, protozoos y hongos (Varki, 1992). Esta aparente paradoja, también observada en algunos grupos de artrópodos (Ratcliffe y cols., 1985; Olafsen, 1986), ha sido interpretada como una posible estrategia que permite el reconocimiento de polianiones de las superficies microbianas, evitando, a su vez, el autoreconocimiento (Vasta y Marchalonis, 1983; Ratcliffe y cols., 1985).

3.1.2. Péptidos con actividad antimicrobiana

Recientemente, se han identificado diversos péptidos antimicrobianos en la hemolinfa de bivalvos (Charlet y cols., 1996; Hubert y cols., 1996a, b). Entre estas moléculas, las mitilinas, aisladas de la hemolinfa de *M. edulis*, componen una nueva familia de péptidos antibióticos (Charlet

y cols., 1996). Las mitilinas, moléculas de 3.7 kDa ricas en restos cisteína, exhiben una potente actividad bactericida frente a bacterias Gram-positivas. Cabe destacar, por otra parte, la caracterización de dos péptidos catiónicos de bajo peso molecular semejantes estructural y funcionalmente a las defensinas de insectos, la defensina A de *M. edulis* (Charlet y cols., 1996) y la defensina 1 (MGD-1) de *Mytilus galloprovincialis* (Hubert y cols., 1996b). Mientras en insectos la expresión de estos péptidos es inducida de forma transitoria a raíz de una infección bacteriana (Hoffmann y cols., 1996), Charlet y cols. (1996) han determinado que en *M. edulis* la síntesis de estas moléculas es constitutiva. De este modo, estos autores han sugerido que la presencia permanente de los péptidos antimicrobianos en la hemolinfa de los moluscos denota una situación poco evolucionada de los mecanismos defensivos de estos organismos.

3.2. Defensa celular

La defensa celular de moluscos es mediada por los **hemocitos**, término propuesto por Farley (1968) para designar a las células de la hemolinfa de estos organismos. Los hemocitos de moluscos son células multifuncionales que también han sido relacionados con otras actividades fisiológicas, incluyendo la cicatrización de heridas, la formación y la reparación de la concha, la digestión y el transporte de nutrientes, y la excreción (revisado por Cheng, 1981, 1984; Cowden y Curtis, 1981; Sminia, 1981; Sparks y Morado, 1988). El sistema circulatorio abierto de estos organismos, con la excepción de numerosos cefalópodos, facilita la movilización de estas células entre la hemolinfa y el tejido conjuntivo de todos los órganos.

Varios órganos y tejidos han sido implicados en el origen y renovación de los hemocitos de moluscos (revisado por Cheng, 1981, 1984; Cowden y Curtis, 1981; Sminia, 1981; Ratcliffe y cols., 1985; Šíma y Větvička, 1992). En gasterópodos, se ha determinado que los hemocitos pueden ser originados tanto en el tejido conjuntivo (Sminia, 1974; Sminia y cols., 1983; Monteil y Matricón-Gondran, 1991; Furuta y cols., 1994), como en áreas anatómicas concretas del pulmón (Lie y cols., 1975), región pericárdica próxima al manto (Jeong y cols., 1983; Ottaviani, 1988) y riñón (Joky y cols., 1985). En bivalvos, a pesar de la ausencia de evidencias experimentales convincentes, se ha sugerido que los hemocitos tienen su origen en células del tejido conjuntivo (Cheng, 1981; Suzuki y Awaji, 1995). En cefalópodos, por último, se ha demostrado que los cuerpos blancos, situados detrás de las depresiones orbitales, son el único órgano hemopoiético de estos organismos (Cowden y Curtis, 1981).

En la hemolinfa de bivalvos se pueden distinguir dos tipos de células, los hemocitos granulares o granulocitos y los hemocitos agranulares o hialinocitos (revisado por Cheng 1975, 1981, 1984; Auffret, 1988). Aunque los hialinocitos han sido considerados como precursores inmaduros de los granulocitos (Mix, 1976), se supone que ambos tipos de hemocitos representan modelos celulares maduros pertenecientes a linajes independientes (Cheng, 1981, 1984; Auffret, 1989).

Los efectores celulares de moluscos han sido implicados en diferentes respuestas de naturaleza defensiva, como la fagocitosis, encapsulación y reacciones citotóxicas dirigidas contra agentes infecciosos o cuerpos extraños introducidos experimentalmente (revisado por Cheng, 1981, 1984; Cowden y Curtis, 1981; Sminia, 1981; Bayne, 1983; Ratcliffe y cols., 1985; Feng, 1988; Loker, 1994; Bachère y cols., 1995; Fryer y Bayne, 1996).

3.2.1. Fagocitosis

La fagocitosis constituye la principal línea de defensa de los moluscos, siendo los hemocitos granulares, por lo general, las células fagocitarias más activas (Foley y Cheng, 1975; Tripp, 1992a; Fawcett y Tripp, 1994; Cajaraville y Pal, 1995; Fryer y Bayne, 1996). Aunque diversas lectinas pueden actuar como opsoninas (revisado por Olafsen 1986, 1988; Chu, 1988; Clatworthy, 1996), estas moléculas no son requeridas universalmente. Así, los hemocitos del mejillón *M. edulis* (Renwranz y Stahmer, 1983) y de la almeja *M. mercenaria* (Tripp, 1992b) pueden fagocitar *in vitro*, en ausencia de hemolinfa, diferentes partículas. Por otra parte, se han identificado diversas lectinas asociadas a las membranas hemocitarias de varias especies de bivalvos (Vasta y cols., 1982; Renwranz y Stahmer, 1983), sugiriéndose que estas lectinas podrían desempeñar la función de receptores de superficie mediando la fagocitosis (Chu, 1988). En este sentido, Renwranz y Stahmer (1983) han demostrado que los iones calcio, en ausencia de otros factores humorales, incrementan la actividad fagocítica de los hemocitos de *M. edulis*.

Se han descrito varios mecanismos de citotoxicidad como parte integral del proceso de fagocitosis de los hemocitos de moluscos. Uno de estos mecanismos implica la secreción de enzimas lisosomales en un proceso que comporta la degranulación ocasional de la célula (Foley y Cheng, 1977; Mohandas y cols., 1985). De este modo, se ha sugerido que las hidrolasas lisosomales no sólo participan en la degradación intrahemocitaria de microorganismos, sino que también pueden intervenir en la destrucción extracelular de éstos. Entre las hidrolasas lisosomales de origen hemocitario detectadas en la hemolinfa de moluscos se incluyen la fosfatasa ácida y básica, esterasas no específicas, peroxidasa, lisozima, glucuronidasa, lipasa, aminopeptidasa y amilasa (Cheng y cols., 1975; Cheng, 1976a; Cheng y Yoshino, 1976a, b; Cheng y cols., 1978; Cheng y Mohandas, 1985; Pipe, 1990a; Zelck y cols., 1996).

En moluscos, de manera semejante a vertebrados, uno de los principales mecanismos de citotoxicidad asociado a la fagocitosis lo representa el metabolismo oxidativo que conduce a la producción de diversos intermediarios de oxígeno reactivo (ROIs), incluyendo aniones superóxido, peróxido de hidrógeno, radicales hidroxilo y oxígeno simple (revisado por Badwey y Karnowsky, 1980; Adema y cols., 1991; Torreilles y cols., 1996). Estos agentes oxidantes, por sí solos o en cooperación con diferentes enzimas, constituyen potentes moléculas efectoras de los mecanismos defensivos antimicrobianos de numerosas especies de gasterópodos (Dikkeboom y cols., 1988; Adema y cols., 1992) y bivalvos (Le Gall y cols., 1991; Nakamura y cols., 1985; Bachère y cols., 1991;

Pipe, 1992; Noël y cols., 1993; Anderson y cols. 1992; Anderson, 1994; Greger y cols., 1995). A pesar de la universalidad de este proceso, no se han descrito fenómenos oxidativos relacionados con la fagocitosis en las almejas del orden Veneroidea *M. mercenaria* (Cheng, 1976b; Anderson, 1994), *Corbicula japonica* (Kumazawa y cols., 1993), *Cerastoderma edule* (López y cols., 1994) y *Tapes decussatus* (López y cols., 1994). De este modo, el sistema antimicrobiano de estas almejas podría estar limitado a los enzimas lisosomales. Por último, los enzimas antioxidantes superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa, identificados en hemocitos y hemolinfa, son responsables de la autoprotección de estos organismos frente a los ROIs generados por los hemocitos durante la fagocitosis (revisado por Torreilles y cols., 1996).

El óxido nítrico (NO) es un mensajero molecular de vertebrados que realiza numerosas funciones, incluyendo la regulación del tono vascular, la señalización celular en el cerebro y la eliminación de patógenos en respuestas defensivas no específicas (revisado por Liew y Cox, 1991; Knowles y Moncada, 1994; Lyons, 1995). En moluscos, del mismo modo que en vertebrados, la producción de NO también forma parte del proceso de fagocitosis (revisado por Franchini y cols., 1995a). Así, se ha identificado actividad antimicrobiana asociada a este radical citotóxico en el gasterópodo *Viviparus ater* (Ottaviani y cols., 1993a; Conte y Ottaviani, 1995; Franchini y cols., 1995b) y en el bivalvo *M. edulis* (Ottaviani y cols., 1993a).

3.2.2. Encapsulación

El parasitismo en moluscos es acompañado, con frecuencia, de la **encapsulación** de los parásitos, variando la naturaleza de la respuesta en función del huésped y del parásito (revisado por Bayne, 1983; Ratcliffe y cols., 1985). Los hemocitos granulares son las células implicadas de manera mayoritaria en la formación de estas cápsulas (Cheng y Garrabrant, 1977; Loker y cols., 1982; revisado por Ratcliffe y cols., 1985). No obstante, también han sido identificados otros modelos celulares y elementos tisulares, como hialinocitos (Harris, 1975), células pardas (Cheng y Rifkin, 1968; Rifkin y cols., 1969), células musculares (Cheng y Rifkin, 1970; Sminia y cols., 1974; McLean, 1988), fibroblastos (Cheng y Rifkin, 1968; Rifkin y Cheng, 1968; Pauley y Becker, 1968; Rifkin y cols., 1969; Sminia y cols., 1974) y fibras del tejido conjuntivo (Cheng y Rifkin, 1968; Rifkin y Cheng, 1968; Rifkin y cols., 1969; Sminia y cols., 1974; McLean, 1988). Se ha sugerido que los fibroblastos asociados con estos procesos de encapsulación, podrían ser hemocitos modificados (Rifkin y cols., 1969; Sminia y cols., 1974).

En *Tapes semidecussatus*, Cheng y Rifkin (1968) han descrito que los metacestodos de *Tylocephalum* son encapsulados por hemocitos y fibras del tejido conjuntivo, incluyendo la presencia de una capa interior, en contacto con el parásito, compuesta de células semejantes a fibroblastos.

Finalmente, aunque se ha detectado actividad PO en la hemolinfa de gasterópodos (De Aragao y Bacila, 1976) y bivalvos (Coles y Pipe, 1994; Renwranz y cols., 1996), los procesos de

encapsulación de moluscos no han sido asociados con fenómenos de melanización (Johansson y Söderhäll, 1996).

3.3. Señalización y mediadores de los mecanismos defensivos

En moluscos, igual que en otros grupos de invertebrados, se han identificado varias moléculas que evidencian cierta similitud estructural y funcional con las citoquinas de vertebrados (revisado por Ottaviani y cols., 1995; Clatworthy, 1996). Así, se ha observado reactividad cruzada con anticuerpos dirigidos contra las interleuquinas (IL) humanas IL-1, IL-2 y IL-6, y el factor de necrosis tumoral (TNF) en los hemocitos de numerosas especies de gasterópodos (Ottaviani y cols., 1993b; Granath y cols., 1994; Connors y cols., 1995) y bivalvos (Hughes y cols., 1990, 1991; Bachère y cols., 1995). Además, Ottaviani y cols. (1995) han mostrado que las citoquinas IL-1, IL-2 y TNF inducen la migración e intensifican la actividad fagocítica de los hemocitos de los gasterópodos *Planorbarius corneus* y *V. ater*. Asimismo, Hughes y cols. (1990) han determinado que los hemocitos de *M. edulis* reaccionan a la IL-1 y al TNF de un modo similar a como lo hacen los granulocitos humanos, aumentando su superficie.

Por último, es interesante señalar que una molécula semejante a la IL-1 ha sido asociada con la resistencia de algunas estirpes del caracol *B. glabrata* frente al parásito *Schistosoma mansoni* (Granath y cols., 1994; Connors y cols., 1995). Estos autores han indicado que esta menor susceptibilidad podría tener su origen en el efecto mediador que esta citoquina tiene sobre la fagocitosis y la producción de ROIs en los hemocitos de *B. glabrata*.

4. PERKINSUS

Los protozoos pertenecientes al género *Perkinsus* (Levine, 1978) son parásitos de numerosas especies de bivalvos y gasterópodos marinos (revisado por Lauckner, 1983; Perkins, 1993; Bower y cols., 1994). Han sido observadas grandes mortalidades atribuidas a este parásito en Estados Unidos (Mackin y cols., 1950; Andrews y Hewatt, 1957; Kern y cols., 1973; revisado por Andrews, 1988, 1996; Ford, 1996), Australia (Lester y Davis, 1981; Goggin y Lester, 1987; O'Donoghue y cols., 1991; revisado por Goggin y Lester, 1995), Italia (Da Ros y Canzonier, 1985), Portugal (Chagot y cols., 1987; Comps y Chagot, 1987; Azevedo, 1989) y España (Villalba y Navas, 1988; Sagristà y cols., 1991, 1995; Figueras y cols., 1992; Navas y cols., 1992; Santmartí y cols., 1995). Los efectos deletéreos de la infección de *Perkinsus* son dependientes de las condiciones medioambientales, habiéndose constatado que temperaturas y salinidades elevadas aumentan la prevalencia y la intensidad de la infección (Mackin, 1956; Soniat, 1985; Andrews, 1988; Craig y cols., 1989; Soniat y Gauthier, 1989; Crosby y Roberts, 1990; Ragone y Burreson, 1993; Burreson y Ragone, 1996).

4.1. Taxonomía y filogenia

La primera descripción de este parásito fue realizada en 1950 por Mackin, Owen y Collier. Estos autores describieron a *Dermocystidium marinum* como el agente causal de las extensivas y recurrentes mortalidades estivales de la ostra *Crassostrea virginica* en el Golfo de México. Fue identificado originalmente como un hongo, dada su similitud morfológica con el causante de la blastomicosis humana (Mackin, 1951; Ray, 1952). Con posterioridad, se realizaron diferentes descripciones, clasificándolo sucesivamente tanto en grupos taxonómicos de hongos (Mackin y Boswell, 1956; Mackin y Ray, 1966; Perkins y Menzel, 1967), como de protozoos (Sprague, 1954; Cheng, 1973). Perkins (1976a) describió que las zoosporas de este parásito, uno de los estadios de su ciclo vital, presentaban estructuras muy similares a la envoltura o complejo apical de los protozoos del sub-tipo Apicomplejos. Para acomodar estas observaciones, Levine (1978) estableció la clase Perkinsea para el tipo Apicomplejos y denominó a la especie *Perkinsus marinus*. No obstante, la posición taxonómica y filogenética de este protozoo parásito ha seguido siendo objeto de controversia (Vivier, 1982; Canning, 1986; Levine, 1988; Cavalier-Smith, 1993; Goggin y Barker, 1993; Corliss, 1994). Recientemente, los estudios basados en el análisis comparativo de las secuencias de los genes que codifican para el ARN ribosómico 5S de la subunidad grande (Goggin, 1994; Marsh y cols., 1995) o para el de la subunidad menor (Fong y cols., 1993; Escalante y Ayala, 1995) de diferentes protistas, indican que *Perkinsus* es más próximo a los dinoflagelados que a los apicomplejos. Por otra parte, dado que apicomplejos y dinoflagelados son dos grupos de protozoos relacionados evolutivamente (Wolters, 1991), se ha sugerido que la similitud morfológica de *Perkinsus* con los apicomplejos y filogenética con los dinoflagelados, podría indicar que este protozoo representa el vínculo viviente entre estos dos grandes grupos de protistas (Goggin y Lester, 1995).

Se han descrito cuatro especies pertenecientes al género *Perkinsus*; *P. marinus* (Mackin y cols., 1950) en la ostra *C. virginica*, *P. olseni* (Lester y Davis, 1981) en la oreja de mar *Haliotis ruber*, *P. atlanticus* (Azevedo, 1989) en la almeja *T. decussatus* y *P. karlssoni* (McGladdery y cols., 1991) en la vieira *Argopecten irradians*. No obstante, Goggin y cols. (1996) han indicado que la descripción de *P. karlssoni* como una especie del género *Perkinsus* es errónea, ya que este parásito no zoosporula, representando ésta una de las características que definen a este género de protozoos. Por otra parte, los resultados obtenidos mediante el estudio comparativo de las secuencias del espaciador de transcripción interna del ADN que codifica para el ARN ribosómico de estas especies, muestran que *P. atlanticus* y *P. olseni* constituyen una única especie que difiere de *P. marinus* (Goggin, 1994).

4.2. Ciclo vital y estructura de las fases

El ciclo vital conocido de los protozoos del género *Perkinsus* se compone de tres fases (Lester y Davis, 1981; Azevedo, 1989; Perkins, 1996). A consecuencia de las evidencias actuales que sitúan

a este protozoo más próximo a los dinoflagelados que a los apicomplejos (Fong y cols., 1993; Goggin, 1994; Escalante y Ayala, 1995; Marsh y cols., 1995), estos tres estadios han sido denominados como trofozoitos, hipnosporas y zoosporas (Perkins, 1996). Los dos primeros términos, trofozoitos e hipnosporas, reemplazan, respectivamente, a los utilizados anteriormente, merontes y prezoosporangios (Perkins, 1991). En el ciclo vital de *Perkinsus*, no se han identificado estadios sexuales ni formas de resistencia. Tampoco ha sido descrita la existencia de huéspedes alternativos necesarios para completar el ciclo biológico de estos parásitos, siendo la transmisión directa a través del agua (revisado por Lauckner, 1983; Perkins, 1988, 1993, 1996; Goggin y Lester, 1995).

Los **trofozoitos** constituyen el estadio vegetativo de este parásito que prolifera en el tejido conjuntivo del huésped (Perkins, 1976, 1988, 1993; Lester y Davis, 1981; Azevedo y cols., 1990b). Son células uninucleadas de sección circular, delimitadas por una pared y con un diámetro que oscila entre 8 y 20 μm . El citoplasma contiene numerosas mitocondrias tubulovesiculares, cisternas del retículo endoplasmático, polisomas y gotas lipídicas. El núcleo, voluminoso y de localización excéntrica, se caracteriza por su aspecto eucromático y gran nucléolo (revisado por Perkins, 1988, 1996).

Los trofozoitos de *Perkinsus* proliferan mediante un proceso palintómico (Perkins, 1996), de manera semejante a algunas fases del ciclo vital de dinoflagelados y ciliados (Margulis y cols., 1993). En la palintomía, la citocinesis no prosigue de manera inmediata a la división nuclear. Así pues, los trofozoitos se multiplican a través de repetidos ciclos de cariocinesis seguidos por múltiples eventos citocinéticos, y así repetidamente, hasta formarse de 2 a 64 trofozoitos inmaduros, con frecuencia 8 ó 16, contenidos en una sola pared celular (revisado por Perkins, 1996). La ruptura posterior de esta pared libera los trofozoitos inmaduros, con un diámetro de 2-4 μm . Posteriormente, éstos incrementan su tamaño hasta convertirse en trofozoitos maduros. Este proceso de maduración implica el desarrollo de una gran vacuola de localización excéntrica que, a menudo, contiene un vacuoplasto refringente.

Las **hipnosporas** representan la fase de crecimiento previa a la zoosporulación de este protozoo. En huéspedes moribundos y en aquellos tejidos de moluscos que han sido incubados en el medio de tioglicolato (FTM) en condiciones anaeróbicas (Ray, 1952, 1966), los trofozoitos incrementan su tamaño hasta transformarse en hipnosporas (revisado por Perkins, 1976b, 1988, 1993, 1996; Lauckner, 1983; Auzoux-Bordenave y cols., 1995; Goggin y Lester, 1995). Estas células, delimitadas por una gruesa pared celular, tienen un diámetro que varía entre 15 y 100 μm . Poseen una gran vacuola que ocupa la mayor parte del volumen citoplasmático, desplazando al resto de citoplasma y núcleo hacia la periferia celular.

Por otra parte, la evolución de la forma vegetativa hacia hipnosporas constituye la base de una técnica diagnóstica que permite detectar esta parasitosis (Ray, 1952, 1966). Así, tras la incubación de diferentes tejidos en el FTM durante varios días, la pared celular de las hipnosporas adquiere afinidad por el colorante Lugol (revisado por Bushek y cols., 1994; Fisher y Oliver, 1996). Este test

ha sido modificado por Gauthier y Fisher (1990) para poder utilizar hemolinfa en lugar de otros tejidos, permitiendo, de este modo, un muestreo no destructivo de los ejemplares.

La incubación de las hipnosporas en agua de mar, tras el cultivo en el FTM, induce en estas células un proceso de zoosporulación palintómica que conduce a la formación y posterior liberación de miles de zoosporas (Perkins, 1988, 1996; Chu y Greene, 1989; Azevedo y cols., 1990a; Auzoux-Bordenave y cols., 1995; Sagristà y cols., 1996). Las zoosporas son células biflageladas que evidencian el característico complejo apical de los apicomplejos, incluyendo conoide, anillo polar, roptrías, micronemas y microtúbulos subpeliculares (revisado por Perkins, 1988, 1996). Aunque la formación de zoosporas sólo ha sido observada bajo condiciones experimentales, existe la presunción de que la zoosporulación también sucede en el hábitat natural (Perkins, 1993; Volety y Chu, 1994; Auzoux-Bordenave y cols., 1995). Sustentando esta hipótesis, Kleinschuster y cols. (1994) han descrito la zoosporulación de las hipnosporas sin tratamiento previo en el FTM, tras la obtención *in vitro* del ciclo vital completo de *P. atlanticus* a partir de trofozoitos aislados de la almeja *Macoma balthica*. Finalmente, se ha sugerido que cuando las zoosporas infectan a los huéspedes dan lugar a los trofozoitos, completándose, de este modo, el ciclo vital (Auzoux-Bordenave y cols., 1995; Goggin y Lester, 1995). No obstante, la evolución de zoosporas hacia trofozoitos sólo ha sido descrita *in vitro* (Kleinschuster y cols., 1994; La Peyre y Faisal, 1995).

4.3. Relación huésped-parásito

Aunque se desconoce cuál es la fase o fases infectantes que suceden de manera natural, se ha comprobado experimentalmente que tanto trofozoitos (Chu y La Peyre, 1993; Volety y Chu, 1994; Chu, 1996), hipnosporas (Volety y Chu, 1994; Chu, 1996) y zoosporas (Perkins y Menzel, 1966; Goggin y cols., 1989; Rodríguez y cols., 1994) pueden iniciar la infección. No obstante, diferentes ensayos comparativos han demostrado que los trofozoitos y las zoosporas de *P. marinus* representan los estadios más eficientes en la transmisión de la infección (Perkins, 1993; Volety y Chu, 1994; Chu, 1996).

En 1951, Mackin sugirió que las formas infectantes de *P. marinus* acceden al tejido conjuntivo de sus huéspedes mediante la lisis de las láminas basales de los epitelios externos, siendo las branquias, el manto y el hepatopáncreas los órganos más susceptibles de invasión (revisado por Lauckner, 1983; Perkins, 1988). Los resultados obtenidos por La Peyre y cols. (1995a) parecen sustentar esta hipótesis, dado que estos autores han demostrado la secreción de enzimas proteolíticas del tipo serina proteasa en cultivos *in vitro* de *P. marinus*. Por otra parte, se ha sugerido que una vez que el parásito ha alcanzado el tejido conjuntivo, los trofozoitos serían distribuidos a través de la hemolinfa a todos los órganos del huésped (Mackin, 1951; Lauckner, 1983; Andrews, 1988).

La infección de *Perkinsus* influye de manera negativa en numerosas actividades fisiológicas de los organismos parasitados (revisado por Paynter, 1996), incluyendo el crecimiento (Burreson, 1991; Paynter y Burreson, 1991). Choi y cols. (1994) han indicado que *P. marinus* provoca una reducción del desarrollo gonadal de *C. virginica*, ya que en esta ostra se ha demostrado una correlación negativa entre la intensidad de la infección y la producción de gametos. Asimismo, la infección de *P. marinus* puede interferir con los mecanismos implicados en la tolerancia a la salinidad (Soniati y Koenig, 1982). Así, los niveles intracelulares de aminoácidos libres, en ostras adaptadas a salinidades elevadas, son significativamente menores en aquéllas parasitadas por *P. marinus* (Paynter y cols., 1995). Recientemente, Dwyer y Burnett (1996) han demostrado que la infección de *P. marinus* también causa una acidosis severa en *C. virginica*.

En la ostra *C. virginica*, Mackin (1951, 1962) describió la necrosis de los tejidos parasitados por *P. marinus*. Se ha sugerido que la actividad serina proteasa identificada en los cultivos de *P. marinus*, podría ser la responsable de los procesos de degradación y desorganización tisular observados en *C. virginica* (La Peyre y cols., 1995a). Sin embargo, estos fenómenos necróticos no han sido descritos en *T. decussatus* (Chagot y cols., 1987; Comps y Chagot, 1987; Figueras y cols., 1992; Montes y cols., 1996) y *T. semidecussatus* (Montes y cols., 1995a; Sagristà y cols., 1995) parasitadas por *P. atlanticus*. Se ha sugerido que las mortalidades observadas en estas almejas podrían ser consecuencia de la masiva respuesta inflamatoria desarrollada contra este parásito, dado que esta hiperplasia reaccional puede llegar a obliterar los senos venosos y, como resultado, provocar la muerte de estas almejas por anoxia (Montes y cols., 1995a; Auzoux-Bordenave y cols., 1995).

El parasitismo de *Perkinsus* elicitó diferentes respuestas defensivas según el huésped y la especie. Así, cabe destacar, que *C. gigas* es más resistente a la infección de *P. marinus* que *C. virginica* (revisado por Chu y cols., 1996). La menor susceptibilidad de *C. gigas* a la parasitosis ha sido atribuida a una respuesta más eficiente de sus mecanismos defensivos. En efecto, se ha descrito que como consecuencia de la infección, la concentración de hemocitos circulantes, el porcentaje de granulocitos y el título de hemaglutininas humorales aumenta en *C. gigas* (La Peyre y cols., 1995b); mientras que en *C. virginica* no se han observado incrementos similares (Chu y La Peyre, 1993; Chu y cols., 1993; Chintala y cols., 1994; La Peyre y cols., 1995b; revisado por Anderson, 1996). No obstante, en *C. virginica* sí se ha descrito una gran producción de ROIs, fundamentalmente de ácido hipocloroso, como respuesta a la infección (Anderson y cols., 1992, 1995; Austin y Paynter, 1995). Sin embargo, se ha sugerido que la actividad citotóxica de este radical podría ser inhibida por las elevadas concentraciones de taurina detectadas, en la hemolinfa, en los estadios avanzados de la infección (Austin y Painter, 1995).

Con respecto a la defensa celular, la respuesta inicial a la infección suele ser una reacción inflamatoria de intensidad variable, basada en la acumulación de hemocitos en el área parasitada, que conduce, en ocasiones, a la encapsulación del parásito. Así, *P. marinus* induce una respuesta de tipo inflamatorio en *C. virginica*, aunque no ha sido descrita su encapsulación (Perkins, 1988). Por otra

parte, los tejidos infectados de esta ostra muestran un incremento significativo del número de células pardas o serosas (Mackin, 1951; Stein y Mackin, 1955). Estas células también han sido identificadas en los tejidos de *H. ruber* infectados por *P. olseni* (Lester y Davis, 1981; Goggin y Lester, 1995) y en los tejidos de *M. balthica* parasitados por *P. atlanticus* (Cheng, 1981). Aunque se desconoce cuál es la función de estas células, se ha sugerido que podrían estar implicadas en la excreción de diversos productos de degradación resultantes del parasitismo (Cheng, 1981, 1984).

Finalmente, se han descrito procesos de encapsulación, en los que han sido identificados varios tipos celulares y fibras del tejido conjuntivo, contra *P. olseni* en las orejas de mar *H. ruber* (Lester y Davis, 1981) y *Haliotis laevigata* (O'Donoghue y cols., 1991) y contra *P. atlanticus* en las almejas *M. balthica* (Perkins, 1988), *T. decussatus* (Chagot y cols., 1987; Comps y Chagot, 1987) y *T. semidecussatus* (Sagristà y cols., 1995). En estas almejas venéridas, *T. decussatus* y *T. semidecussatus*, se ha descrito que la infección de *P. atlanticus* induce una reacción defensiva de características singulares (Chagot y cols., 1987; Comps y Chagot, 1987; Sagristà y cols., 1995). En 1987, Comps y Chagot describieron que la infección de *P. atlanticus* en la almeja portuguesa *T. decussatus* inducía una respuesta inflamatoria, siendo los trofozoitos encapsulados por una sustancia PAS-positiva.

Objetivos

De los antecedentes existentes en la literatura se deducía que las almejas del género *Tapes* desarrollan frente a la infección de *P. atlanticus* una reacción defensiva singular. El objetivo general del presente trabajo ha sido la **caracterización de esta respuesta defensiva**, especialmente en lo que se refiere a su organización y al control de la misma. Así, nos planteamos como primer objetivo la **identificación y caracterización de los tipos celulares implicados en la encapsulación de los trofozoitos de *P. atlanticus* en *T. semidecussatus***. Además, determinamos la organización de la respuesta defensiva y precisamos los restos glucídicos mayoritarios de estos efectores celulares, de la cápsula y de los diferentes compartimentos de los trofozoitos (*Capítulo I: "Cellular defence mechanism of the clam Tapes semidecussatus against infection by the protozoan Perkinsus sp."*).

Una vez establecido que el hemocito granular es el único modelo celular implicado en esta respuesta defensiva y que los trofozoitos de *P. atlanticus* son encapsulados por el producto de secreción de estas células, nuestro segundo objetivo fue **caracterizar el producto de secreción y determinar si está unívocamente relacionado con la parasitosis**. En este sentido, aislamos el componente mayoritario de este producto de secreción, el polipéptido p225, obteniendo, además, anticuerpos policlonales específicos contra éste (*Capítulo II: "Characterization and localization of an Mr 225 kDa polypeptide specifically involved in the defence mechanisms of the clam Tapes semidecussatus"*).

Una vez demostrada la correlación existente entre p225 y la parasitosis, nuestro tercer objetivo fue **comprobar si p225 es específico de especie**, mediante su caracterización en *T. decussatus*. Asimismo, también precisamos las similitudes que presentan las reacciones defensivas de estas dos especies del género *Tapes* frente a la parasitosis de *P. atlanticus* (*Capítulo III: "When the venerid clam Tapes decussatus is parasitized by the protozoan Perkinsus sp. it synthesizes a defensive polypeptide that is homologous to p225"*).

Dado que p225 no es específico de especie, era necesario averiguar si *P. atlanticus* es el único agente inductor de esta reacción defensiva. De este modo, nuestro objetivo final fue **determinar si el parasitismo de *P. atlanticus* elicit una respuesta defensiva específica en *T. semidecussatus***, comparando esta reacción celular con las respuestas inflamatorias desarrolladas tras la inoculación de material biológico de diferente tamaño. Por último, y como objetivo secundario, tratamos de **precisar si los hemocitos reclutados proliferan en la reacción celular o en las áreas inoculadas**, determinando la proliferación celular mediante la administración de BrdU (*Capítulo IV: "The protozoan parasite Perkinsus atlanticus elicits a unique defensive response in the clam Tapes semidecussatus"*).



Resultados

Capítulo I

Cellular defence mechanism of the clam *Tapes semidecussatus* against infection by the protozoan *Perkinsus* sp.

Juan F. Montes, Mercé Durfort, José García Valero

Publicado en *Cell and Tissue Research* (1995) 279:529-538

ABSTRACT

The cellular defence mechanism of the clam *Tapes semidecussatus* (Mollusca, Bivalvia) against infection by the parasite protozoan *Perkinsus* sp. (Apicomplexa, Perkinsea) was studied in the gill filaments. The parasites, localized in the connective tissue, induced a cellular reaction involving infiltrated granulocytes. These showed a secretory aspect, with the cytoplasm being filled by membrane-bound granules with internal membranes. The holocrine secretion, which was proteic and slightly glycosylated, by the granulocytes gave rise to the encapsulation of the parasites. After incubation with lectins from *Canavalia ensiformis*, *Triticum vulgare*, *Helix pomatia*, *Glycine max*, *Arachis hypogaea*, *Ricinus communis* (agglutinin), *Ulex europeus* I and *Limax flavus*, a lack of specific and/or main sugars was observed in the plasma membrane of parasite and granulocyte, and in the wall of the former. Furthermore, GalNac α 1,3GalNac and β -D-gal residues were only detected in association with the internal membranes and dense regions of both granules and capsule, respectively. Blood granulocytes were observed at the periphery of the cellular reaction, close to blood vessels, and these appeared to re-differentiate to give the granulocytes of the cellular reaction. The data reported here suggest that this parasite induces the infiltration and re-differentiation of specialized cells in the host mollusc. In addition, a polarized secretion of a specific defence product is described for the first time.

Key words: Defence mechanisms - Encapsulation - Granulocytes - Lectin cytochemistry - Parasitism - *Perkinsus* sp. - *Tapes semidecussatus*

RESUMEN

Se ha estudiado la respuesta defensiva desarrollada por la almeja *Tapes semidecussatus* (Molusco, Bivalvo) frente a la infección del protozoo *Perkinsus* sp. (Apicomplejo, Perkinsea). Los parásitos, localizados en el tejido conjuntivo de los filamentos branquiales, inducen una reacción celular constituida por granulocitos infiltrados. Estas células, de aspecto secretor, muestran numerosos gránulos con membranas internas. La secreción holocrina, de carácter proteico, encapsula los parásitos. Tras la incubación con las lectinas procedentes de *Canavalia ensiformis*, *Triticum vulgare*, *Helix pomatia*, *Glycine max*, *Arachis hypogaea*, *Ricinus communis* (aglutinina), *Ulex europeus* I y *Limax flavus* no se detectaron restos glucídicos mayoritarios ni en la membrana plasmática del parásito ni de los granulocitos, ni tampoco en la pared celular del primero. Además, tan sólo fueron identificados restos GalNac α 1,3GalNac y β -D-gal asociados, respectivamente, a las membranas internas y regiones densas de los gránulos y cápsula. En la periferia de la reacción celular, cerca de los senos venosos, se observaron hemocitos granulares semejantes a los circulantes. Nuestras observaciones sugieren que este parásito induce la rediferenciación de los hemocitos granulares infiltrados en un nuevo tipo celular de carácter secretor, el granulocito de la reacción celular. Además, describimos, por primera vez, un proceso de encapsulación en invertebrados que conlleva la secreción holocrina de un producto especializado.

Palabras clave: Citoquímica de lectinas - Encapsulación - Granulocitos - Mecanismos defensivos - Parasitismo - *Perkinsus* sp. - *Tapes semidecussatus*

INTRODUCTION

Protozoa of the phylum Apicomplexa (Levine 1970) have been described as parasites of marine molluscs (Lauckner 1983). Trophozoites of the genus *Perkinsus* (formerly *Dermocystidium* or *Labyrinthomyxa*) (Apicomplexa, Perkinsea) (Levine 1978) are severe pathogens with a highly destructive potential in bivalves and gastropods. Extensive mortality attributed to this disease agent has been described in United States (Mackin et al. 1950; Andrews and Hewatt 1957; Kern et al. 1973), Australia (Lester and Davis 1981; Goggin and Lester 1987), Canada (McGladdery et al. 1991), Italy (Da Ros and Canzonier 1985), Portugal (Comps and Chagot 1987; Azevedo 1989) and Spain (Sagrìstà et al. 1991; Figueras et al. 1992; Navas et al. 1992).

Molluscs, like other metazoa, recognize and respond to pathogens by cellular and humoral defence mechanisms. However, the absence of lymphoid tissue, receptors for the antigens of the major histocompatibility complex and immunoglobulin molecules (Šíma and Větvička 1992) implies that these mechanisms are probably based on a chemotactic attraction to foreign materials (Cheng 1978) or that they occur in response to tissue damage (Ford et al. 1993).

The cellular defence of bivalve molluscs is mediated by haemocytes, the circulating cells of the haemolymph. The different haemocyte types (granulocytes, hyalinocytes and serous cells) are involved in several functions, such as wound repair, shell repair, nutrient digestion and transport, excretion and internal defence (Cheng 1981). The cellular reaction is thus the main internal defence mechanism in bivalves against foreign materials and consists mainly of phagocytosis or encapsulation (Cheng 1981; Ratcliffe et al. 1985). The latter, in addition, has been proposed as an abortive attempt at phagocytosis (Cheng and Rifkin 1970; Ratcliffe et al. 1985).

Several types of encapsulation have been described in which the cells and fibres of connective tissue, hyalinocytes and, most frequently, granulocytes have been implicated (Ratcliffe et al. 1985). Garcìa et al. (1992) and Sagrìstà et al. (1992) have described a cellular reaction in the connective tissue of the gills of the clam *Tapes semidecussatus* (= *Tapes philippinarum*) from the delta of the River Ebro, Mediterranean Sea, Tarragona (NE Spain) against *Perkinsus* sp.; this cellular reaction results in the encapsulation of the trophozoites. Although granulocytes are also involved in this encapsulation, the characteristics of the capsule are unusual in comparison with those described in invertebrates.

We now present a study of the ultrastructural characteristics of the encapsulation observed in *T. semidecussatus* parasitized by *Perkinsus* sp. and of the granulocytes that form the cellular reaction. Although several lectin-binding sites have been shown on the cell surface of circulating haemocytes (Renwrantz and Cheng 1977; Cheng et al. 1980; Schoenberg and Cheng 1980, 1981; Pipe 1990b), this is the first time that the main oligosaccharide residues of the infiltrated granulocytes, the different trophozoite compartments and capsule have been characterized.

MATERIALS AND METHODS

Animals and tissue processing

Parasitized clams *Tapes semidecussatus*, were collected from the delta of the River Ebro, Mediterranean Sea, Tarragona (NE Spain). For histopathological examination, the clams were fixed in 4% formaldehyde in sea water and embedded in paraffin. Sections were cut at 6 μm and stained by Harris' haematoxylin-eosin.

Abscesses of the gill were isolated under a stereoscopic microscope, fixed in 2% (w/v) paraformaldehyde, 2.5% (v/v) glutaraldehyde in 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS) for 2 h at room temperature, and then postfixed with 1.0% osmium tetroxide in 0.1 M PBS for 1 h. After routine dehydration, the samples were embedded in Spurr resin. Semithin sections were stained with methylene blue and ultrathin sections were stained with uranyl acetate and lead citrate. Samples for lectin histochemistry were fixed in 4% (w/v) paraformaldehyde, 0.1% (v/v) glutaraldehyde in 0.1 M PBS (pH 7.4) for 2 h at 4°C. Samples were then dehydrated in a graded series of ethanol solutions at descending temperatures and then infiltrated with Lowicryl K4M resin (Chemische Werke Lowi, Waldkraiburg, Germany), as previously described by Carlemalm et al. (1982). After infiltration, the samples were embedded in fresh Lowicryl K4M resin in gelatine capsules and polymerized at -35°C by exposure to UV light for 2 days.

Sugar detection

Vic-glycol groups, which are characteristic of the main sugars of oligosaccharide chains, were detected following the Thiéry method (Thiéry and Rambourg 1974), by incubation of sections in thiosemicarbazide for 48 h. For lectin histochemistry, sections were rinsed in 0.1 M glycine in PBS twice for 10 min and with 2% ovalbumin in PBS for a further 30 min. Sections were then incubated with lectins (all abbreviations given in Table 1) (Goldstein and Poretz 1988), purchased from Sigma (St. Louis, Mo), for 2 h at room temperature. For labelling with lectin-biotin complexes, sections were rinsed with 0.1 M glycine in PBS and then incubated with streptavidin conjugated to 10-nm colloidal gold (Sigma). LFA was reacted with fetuin conjugated to 10-nm colloidal gold (Sigma). Finally, the grids were washed thoroughly in PBS and double-distilled water, and stained with uranyl acetate and lead citrate. Labelled lectins, streptavidin and fetuin were diluted with 1% ovalbumin in PBS, to an optical density ($O.D_{520\text{ nm}}$) of 0.17. On the basis of the results obtained, the controls for the saccharide-binding specificities of the lectins were carried out by the pre-incubation of the sections either with 0.2 M NaOH at 37°C for 24 h for HPA or with β -galactosidase (EC 3.2.1.23; Boehringer Mannheim, Germany) at 37°C for 2 h for RCA I.

Thin sections were observed and photographed with a Reichert-Jung Polyvar 2 optical microscope. Ultrathin sections were viewed with a Hitachi H-600 AB transmission electron microscope.

RESULTS

By light microscopy, gill sections showed the presence of trophozoites of *Perkinsus* sp. in the connective tissue that surrounded the blood vessels of the gill filaments. The parasitosis induced an inflammatory response based on a cellular reaction that produced the encapsulation of the parasites. This cellular reaction was delimited by the endothelium and the gill epithelium (Fig. 1A). Partial or total obliteration of the blood vessels was observed in an acute inflammatory response (Fig. 1A inset) and, occasionally, these damaged areas were identified macroscopically as external white abscesses.

Cysts were constituted by a variable number of trophozoites, at times more than a hundred, surrounded by a capsule of homogeneous appearance. By light microscopy, trophozoites were uninucleated and showed a circular section, their diameter ranging from 5 to 18 μm (Fig. 1A). The parasite showed a central vacuole that occupied up to 75% of the cell volume, whereas the remaining cytoplasm and nucleus were located at the cell periphery.

The cellular reaction consisted of a unique cell type with the cytoplasm filled with granules (Figs. 1B, 2A). These closely packed granulocytes had a variable profile and diameter. The nucleus of these cells was placed eccentrically and cell division was not observed. The granules showed eosinophilia and green metachromasia when stained with eosine and methylene blue, respectively. The capsule that enclosed the trophozoites showed the same stain pattern (Fig. 1A, B).

Individual or grouped cysts and the associated cellular reaction were organized in areas bounded by fibrillar connective septa. In these septa, a spindle-shaped cell (Fig. 1B inset) was observed with the cytoplasm filled by granules that showed a high affinity for methylene blue, but no metachromasia (Fig. 1A). In addition, these cells were observed in the connective tissue binding the endothelium and the epithelium of the gills from non-parasitized specimens.

By electron microscopy, the trophozoites were circular or crescent-shaped and were surrounded by a thin amorphous wall. The vacuolar compartment was well developed and constituted by a large element placed eccentrically and several smaller elements contained in the peripheral cytoplasm (Fig. 1B). Numerous mitochondria were seen with tubular cristae; cisternae of endoplasmic reticulum, polysomes, a large euchromatic nucleus, lipid droplets and a endomembrane network that appeared to be continuous with the plasma membrane were also present (Figs. 1B, 2B, C).

Granulocytes of the cellular reaction showed a secretory aspect, with the cytoplasm being filled by membrane-bound granules containing a homogeneous substance. The nucleus showed peripheral heterochromatin, whereas the remaining chromatin was loosely distributed. The Golgi complex and centriolar apparatus lay close to the nucleus. The granulocyte cytoplasm was also enriched in extended saccules distributed in two populations. Some saccules were endoplasmic-like and showed a clear content, whereas others were filled by a matrix with a similar appearance to the product of the granules. Mitochondria were circular in profile and showed few cristae. In addition, processes of regression were often observed in the mitochondrial compartment (Fig. 2A).

Although all granulocytes showed a secretory aspect, the ultrastructural characteristics of the granules were variable according to the position of the cells in the cellular reaction. Granulocytes in the inner regions of the cellular reaction showed granules of variable size, with a homogeneous dense content. The granules contained numerous internal membranes that were organized in a parallel array or that bound pre-fused granules (Figs. 2A, D, E, 3). Although these structural data suggested intense granule fusion, this phenomenon was rarely observed. Occasionally, giant granules were observed filling the cytoplasm of some granulocytes, which were characterized by a general regression of endomembranes. These granulocytes, which were commonly seen near the cysts, showed crinophagy, nuclear shrinkage and, finally, cell death (Figs. 2B, 3). On the other hand, the granulocytes observed at the periphery of the cellular reaction, near the endothelium that lined the blood sinuses, also showed granules limited by a membrane, but with a floccular content and devoid of internal membranes (Figs. 2A inset, 3).

The holocrine secretion by the granulocytes gave rise to the encapsulation of the parasites. The secretion occurred exclusively around the trophozoites or their associated capsule. Granules and remnants of the plasma membrane were thus observed close to the cyst (Figs. 1B, 2B, C, 3). The capsule was amorphous and homogeneous with paracrystalline inclusions. Unfused granules and remaining membranes were frequently observed in the outermost regions of the capsule. These granules and membranes showed an increasing disorganization towards the innermost regions of the capsule, indicating release of the granule content (Figs. 2F, 3).

The spindle-shaped cell of the connective tissue was located exclusively in the septa that surrounded the cysts and the cellular reaction, and did not take part in capsule formation. The cytoplasm was filled with small round granules that showed a clear core and a dense periphery. The extracellular matrix that surrounded these cells was constituted mainly by fibres with no definite orientation (Fig. 1A, B inset).

Sugar detection

The Thiéry technique allowed the recognition of some specific membranes (Fig. 2D-F), as a consequence of the detection of glycoconjugates that contained hexoses with vicinal hydroxyls. The

plasma membrane of trophozoites was strongly stained by the Thiéry method, whereas lipid droplets showed a particulate precipitate and the remaining cell structures were unstained (Fig. 2F). Furthermore, the plasma membrane, the limiting and the internal membranes of the granules from granulocytes reacted intensely when the Thiéry method was applied, whereas the amorphous product of granules and the capsule reacted only slightly (Fig. 2D-F).

Neither the plasma membrane, the wall of the trophozoites nor the plasma membrane of the granulocytes showed moderate or high affinity for any of the lectins assayed. Likewise, binding for these lectins was not observed in any of the other components of the trophozoites.

No specific labelling for Con A, WGA, GMA, PNA, UEA I or LFA was observed either in the granules of the granulocytes or in the capsule. However, RCA I bound the dense regions of granules and capsule (Fig. 4A, B). The lack of labelling after incubation with β -galactosidase demonstrates the lectin specificity for β -D-galactosyl residues (Fig. 4C).

HPA, which binds to GalNac oligomers, stained the internal membranes of granulocyte granules, and also the remaining membranes of the capsule, and reacted slightly with the granule content (Fig. 4D, E). The labelling for HPA was absent after β -elimination of O-linked residues (Fig. 4F).

DISCUSSION

The structural and ultrastructural features (central vacuole, eccentric nucleus containing a voluminous nucleolus, thin wall, etc.) showed by the parasites are similar to those described by Sagristà et al. (1991). These authors, after isolation of biflagellated zoospores with an apical complex from the trophozoites parasitizing *T. semidecussatus*, identified the parasites as belonging to genus *Perkinsus*. This genus includes four parasite species of marine molluscs: *P. marinus* (Mackin et al. 1950), *P. olseni* (Lester and Davis 1981), *P. atlanticus* (Azevedo 1989) and *P. karlssoni* (McGladdery et al. 1991). Both the host identity and the structural characteristics showed by the trophozoites indicate that the parasite is homologous to *P. atlanticus*.

In agreement with previous results (Sagristà et al. 1992; Navas et al. 1992), the distribution of the trophozoites of *Perkinsus* sp. in the clam *T. semidecussatus* is generalized in gill filaments, gut, digestive gland, kidney, gonad, muscular foot and mantle. This broad distribution of the trophozoites is attributable to their association with connective tissue and to their association with blood vessels, which have been suggested as their preferred distribution pathway (Lauckner 1983; Andrews 1988).

In molluscs, the migration of circulating haemocytes into parasitized tissues has been well documented (Cheng 1981; Ratcliffe et al. 1985; Ford et al. 1993). Intense haemocytotic responses

constituted by the infiltration of granulocytes against *Perkinsus* spp. have been reported in the clam *Ruditapes decussatus* (Mollusca, Bivalvia) (Chagot et al. 1987; Comps and Chagot 1987; Azevedo et al. 1990b; Figueras et al. 1992; Navas et al. 1992). Furthermore, in oysters, the initial host response to *P. marinus* infection is the migration of haemocytes to the location of the trophozoites (Lauckner 1983). Thus, the infiltration of circulating granulocytes could explain the large number of cells observed in the cellular reaction of the clam *T. semidecussatus* against *Perkinsus* sp. and the absence of mitotic figures in all parasitized organs studied in all developmental stage of infection.

Our results suggest that the circulating granulocytes migrate from the haemolymph to the connective tissue of parasitized organs and then re-differentiate to synthesize and secrete a specialized product for parasite encapsulation. This putative change in the synthesis pattern of this cell could explain the differences observed in the granules of the peripheral reactive granulocytes and those that are secreted around the trophozoites to form the capsule.

Some lectin-binding sites have been shown on the cell surface of circulating haemocytes from several molluscs (Renwantz and Cheng 1977; Cheng et al. 1980; Schoenberg and Cheng 1980, 1981; Pipe 1990b). However, to date, we have no information on the evolution of these binding-sites in haemocytes infiltrated into tissue. Our results show the lack of specific and/or main sugar residues in terminal positions for the lectins assayed in the plasma membrane of the infiltrated granulocytes and trophozoites, and in the wall of the latter. These observations suggest that the migration, recognition and adhesion between granulocytes and trophozoite-granulocyte are not based on lectin-like molecules. Instead, these could be limited to granulocyte-endothelium interactions.

Nevertheless, there is agreement between the results obtained by lectin histochemistry and the Thiéry method, both of which result in dense specific labelling of certain elements (internal membranes and dense regions of both granules and capsule), whereas all other compartments and secretion product show low or no labelling. These results indicate the low degree of glycosylation of the granule content, the presence of a main or unique secretory product and the maintenance of this homogeneity between the granulocyte population of the cellular reaction. However, in circulating haemocytes, the granule content can be specifically glycosylated, since Pipe (1990b) has observed, in the mussel *Mytilus edulis*, two kinds of circulating haemocytes that are differentiated by the lectin reactivity of their granules to WGA and HPA, and by the diameter of their granules.

The results obtained by the ultrastructural and lectin analyses, in addition to the characterization of the main secretion product (Montes et al. 1995b) indicate that the capsule arises from the secretory activity of the granulocytes, as it is proteic in nature and slightly glycosylated. Moreover, the capsule must be organized as a hydrated matrix, which facilitates the transport of molecules between the trophozoites and surrounding tissue, since the trophozoites maintain their viability after encapsulation. Likewise, when parasitized gills are cultivated in fluid thioglycollate

medium, encapsulated trophozoites increase their size several times (Azevedo 1989; Sagristà et al. 1991; Montes et al. 1995b).

Although granulocytes are commonly involved in parasite encapsulation (Ratcliffe et al. 1985), the association of an inner non-cellular and non-fibrillar layer and an outer granulocyte layer is unusual in molluscs (Chagot et al. 1987; Comps and Chagot 1987). The present work thus constitutes the first description of a cellular reaction with characteristics of that of a holocrine gland; the parasites are encapsulated by the secretion product of the granulocytes. Similar encapsulation has also been observed in the clam *R. decussatus* against the *Perkinsus*-like protozoan (Chagot et al. 1987; Comps and Chagot 1987) and *P. atlanticus* (Azevedo et al. 1990b). However, this unusual host response is not only related to the trophozoites of *Perkinsus* spp., since homologous encapsulation has been observed in *T. semidecussatus* against *Nematopsis*-like spores (Bower et al. 1992).

Moreover, other kinds of encapsulation have been described in *T. semidecussatus*. Thus, Cheng and Rifkin (1968) have shown that parasitosis by *Tylocephalum* metacestodes produces a capsule formed by fibres and leucocytes, including the presence of an innermost layer comprised of fibroblast-like cells and devoid of a non-cellular component. The different encapsulation of *T. semidecussatus* in response to infections by *Tylocephalum* metacestodes (Cheng and Rifkin 1968) or both *Nematopsis*-like spores (Bower et al. 1992) and *Perkinsus* sp. seems to indicate specific parasite recognition or modulation.

However, analogous encapsulations have been observed in arthropods against biological agents after natural infection, such as by insect parasitoids (Salt 1963) and nematodes (Poinar et al. 1968), and against non-biological agents introduced into the haemocoel (Grimstone et al. 1967). These authors describe the accumulation of blood cells around the parasites or foreign objects, followed by the deposition of a dark pigment, identified as melanin.

Furthermore, it remains unresolved whether the host reaction is attributable to a recognition of non-self or to tissue damage (Ford et al. 1993). The association of granulocytes with tissue damage has been established as a general rule (Cheng 1981) and, particularly in *T. semidecussatus*, as a response to experimental wounds (Cheney 1969). Our observations demonstrate the specific association of secretory granulocytes with the trophozoites, since all non-parasitized connective tissues are devoid of these cells, and that polarized secretion and granulocyte death occur exclusively in the proximity of the trophozoites. These findings strongly suggest that the parasite interacts specifically with the host defence system, provoking the infiltration, re-differentiation, migration, secretion and death of the granulocytes.

Finally, the mechanisms related to the high mortality of the molluscs parasitized by *Perkinsus* spp. are not clear. Previous studies indicate that this mortality is not the immediate result of parasite toxin (Perkins 1976b) or tissue damage. However, our results indicate that, in the late stages of

parasitosis, the cyst and the cellular reaction produce the collapse of blood sinuses; this could in turn induce a fall in the respiratory capacity of the molluscs, but not the parasites, since they are viable after incubation in anaerobic conditions.

Acknowledgements We thank Mrs. Mercè Santmartí (Direcció General de Pesca Marítima, Generalitat of Catalonia, Spain) for providing specimens for this study, Mrs. Almudena García and the staff of Serveis Científico-Tècnics (Universitat de Barcelona) for technical assistance, Mr. Jordi Magrané for the drawing and Mr. Robin Rycroft for linguistic advice. This work was partially supported by a grant from the Generalitat of Catalonia, Spain (CIRIT AR91-121).

**Figures
and table**

Figure 1

- A** Semithin section from a gill lamella parasitized by trophozoites of *Perkinsus* sp. (*arrows*). The cellular reaction (*cr*) that surrounds the parasites is delimited by the endothelium (*en*). x370. *Bar: 50 μm. A inset* Localization of the trophozoites (*arrow*) and cellular reaction (*arrowheads*) in a gill filament, the blood sinus (*bs*) of which is partially obliterated. x160.
- B** Rounded and crescent-shaped trophozoites (*tr*), surrounded by the capsule (*c*) and granulocytes (*gr*) of the cellular reaction. x3000. *Bar: 5 μm. B inset* Spindle-shaped cell of the connective tissue. x2800

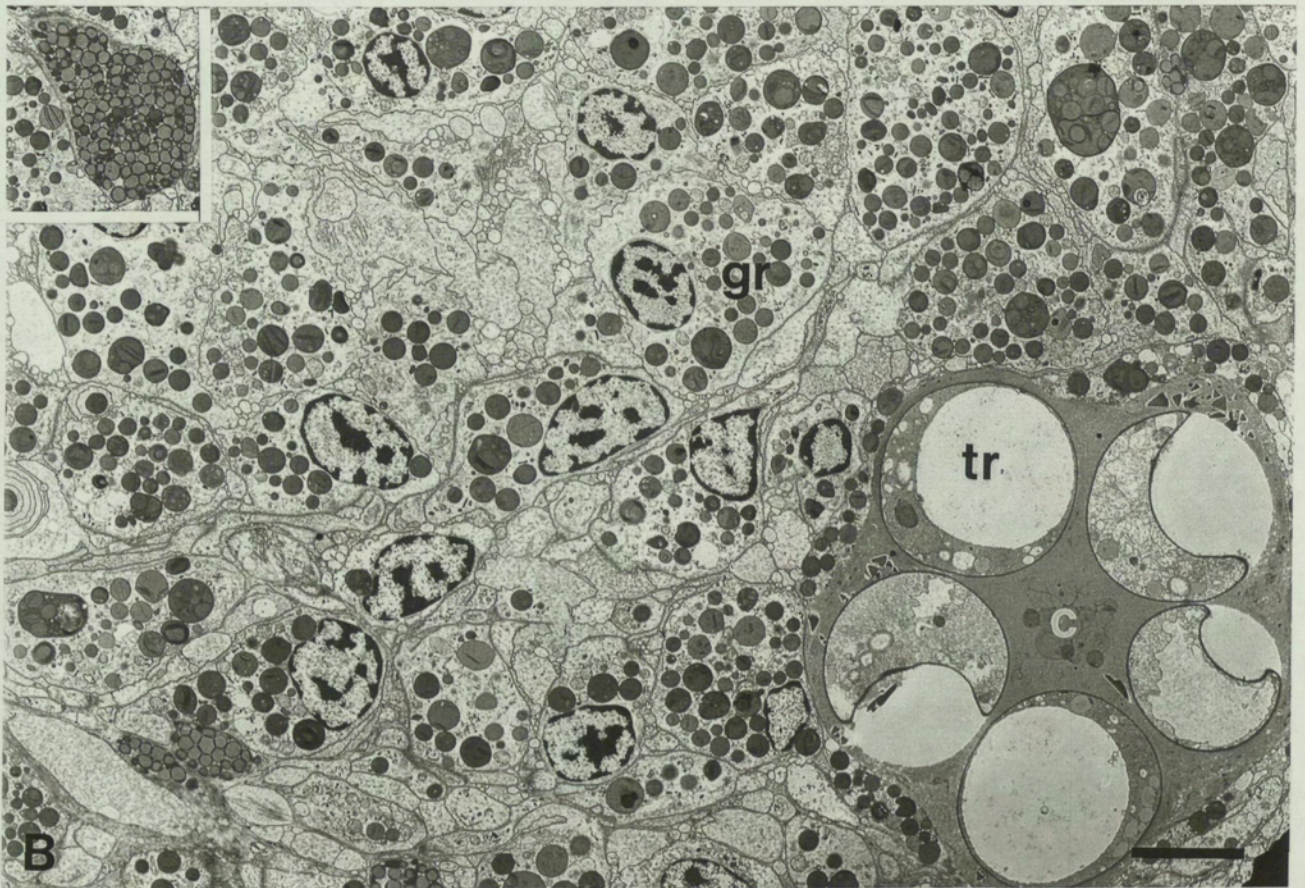
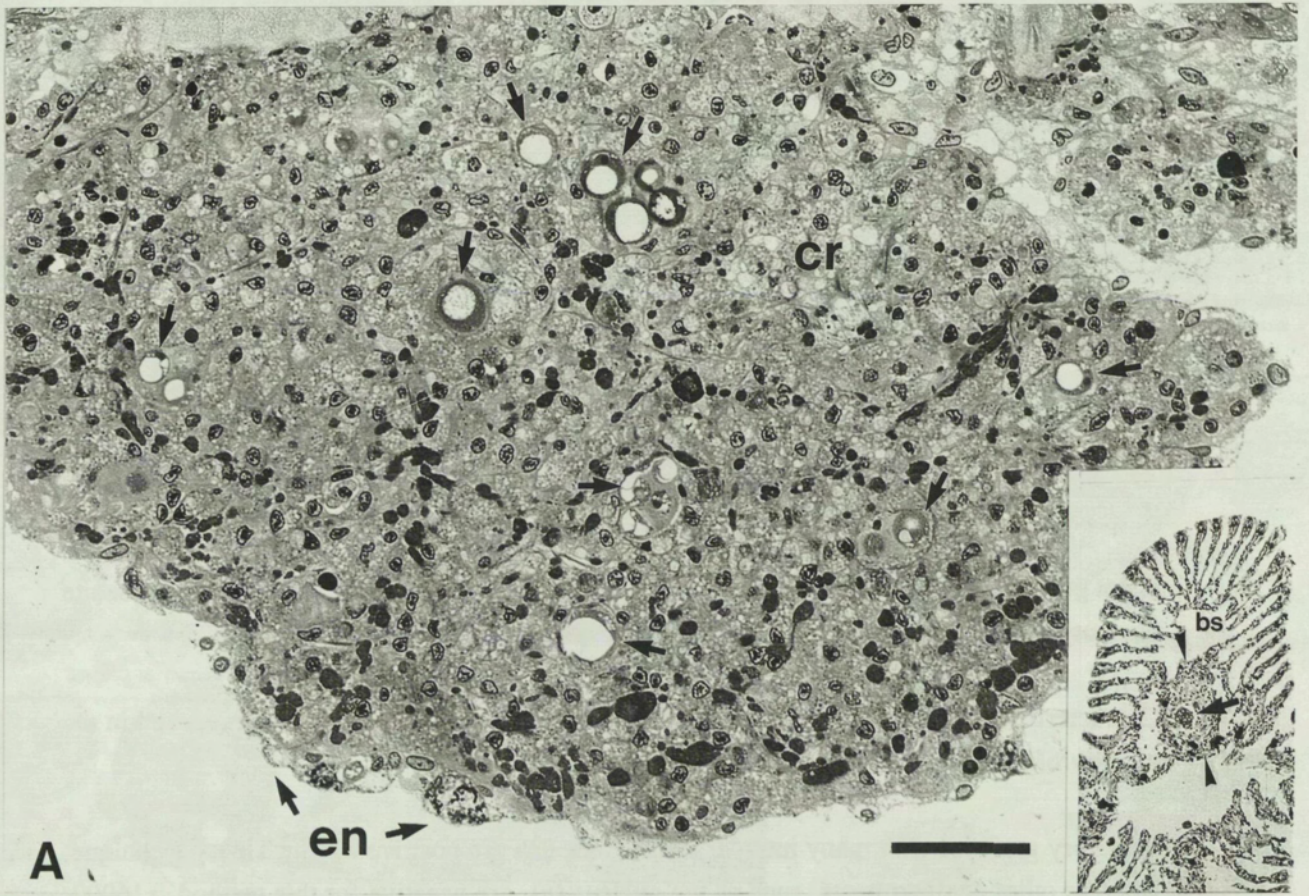


Figure 2

- A** Granulocyte cytoplasm filled by membrane-bound secretion granules. Internal membranes can be seen in some of these granules. x22000. *Bar*: 0.5 μm . **A inset** Secretion granules (*sg*) from the peripheral granulocytes. x27000. *Bar*: 0.5 μm
- B** Giant granule from an abortive granulocyte in the vicinity of a trophozoite (*tr*). *n* Trophozoite nucleus. x11000. *Bar*: 2 μm
- C** Characteristic association of granules and remnants of the plasma membrane observed in the vicinity of a trophozoite (*tr*). x8000. *Bar*: 1 μm
- D** Secretory granules with many internal membranes that are positive for the Thiéry technique, whereas other compartments, such as the nucleus (*n*), are negative for this method. x16000. *Bar*: 0.5 μm
- E** Several small granules grouped in large individual granules. Endoplasmic-like saccules (*arrow*) with an empty appearance and vesicles (*arrowhead*) filled by a matrix whose content is Thiéry positive. x20000. *Bar*: 0.5 μm
- F** Capsule. Amorphous product in the innermost regions of the capsule (*ic*) near a trophozoite (*tr*), and unfused granules and remaining membranes in the outermost regions of the capsule (*oc*). The trophozoite plasma membrane is also Thiéry positive (*arrows*). x11000. *Bar*: 1 μm

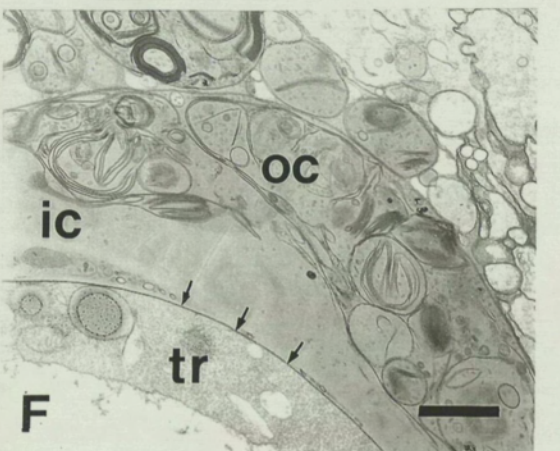
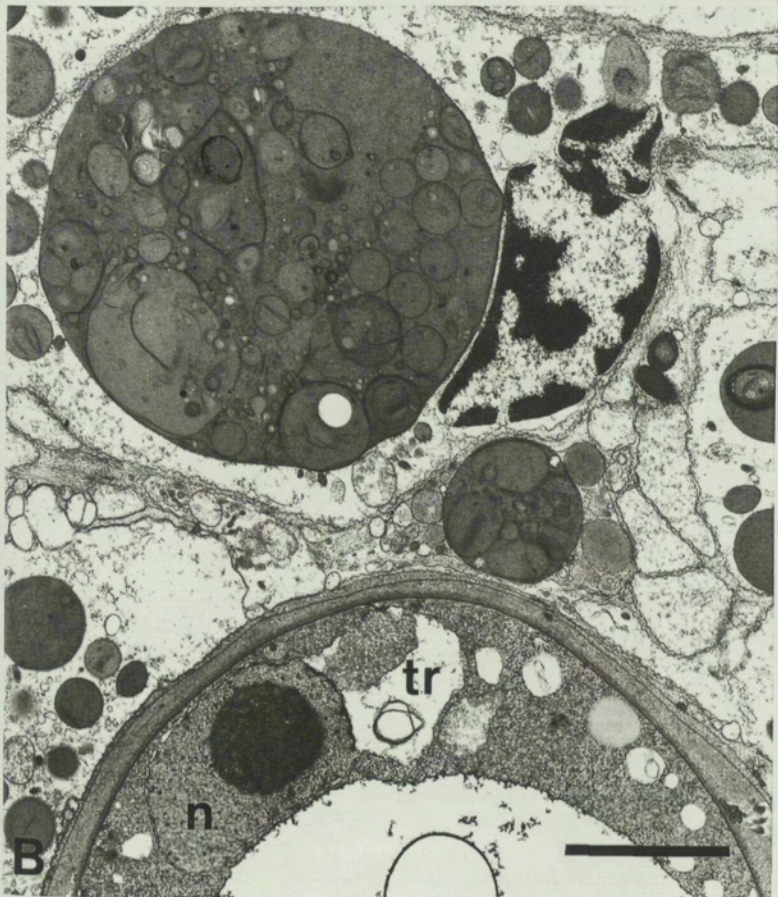
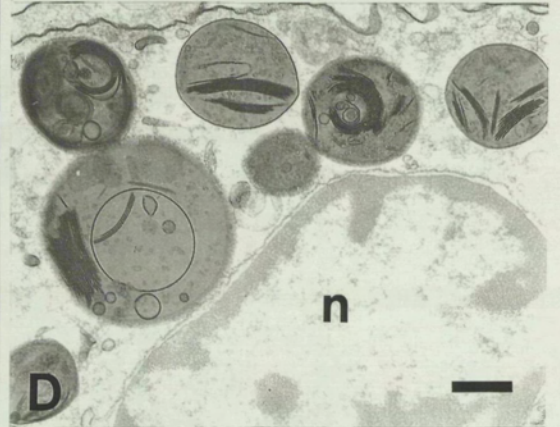
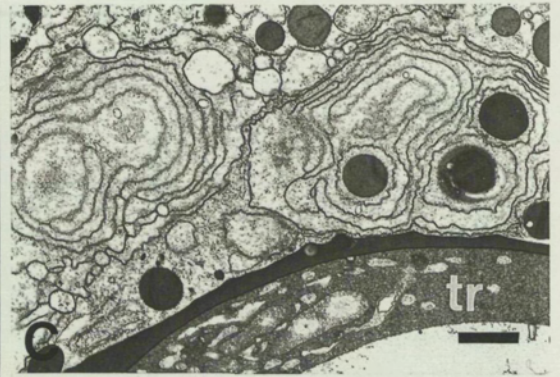
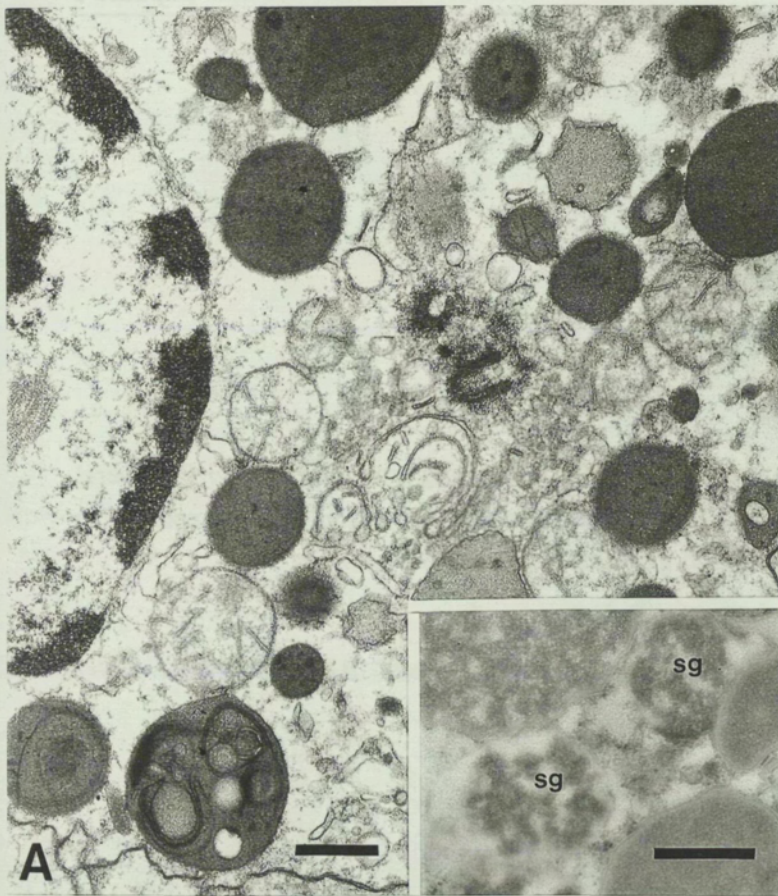


Figure 3

Schematic drawing showing the secretion pathway (1) of the infiltrating granulocytes. *pgr* Peripheral granulocyte. 2 Abortive pathway of infiltrated granulocytes. *agr* Abortive granulocyte; *ct* connective tissue; *tr* trophozoite; *c* capsule; *asterisk* unfused granules and granulocyte debris

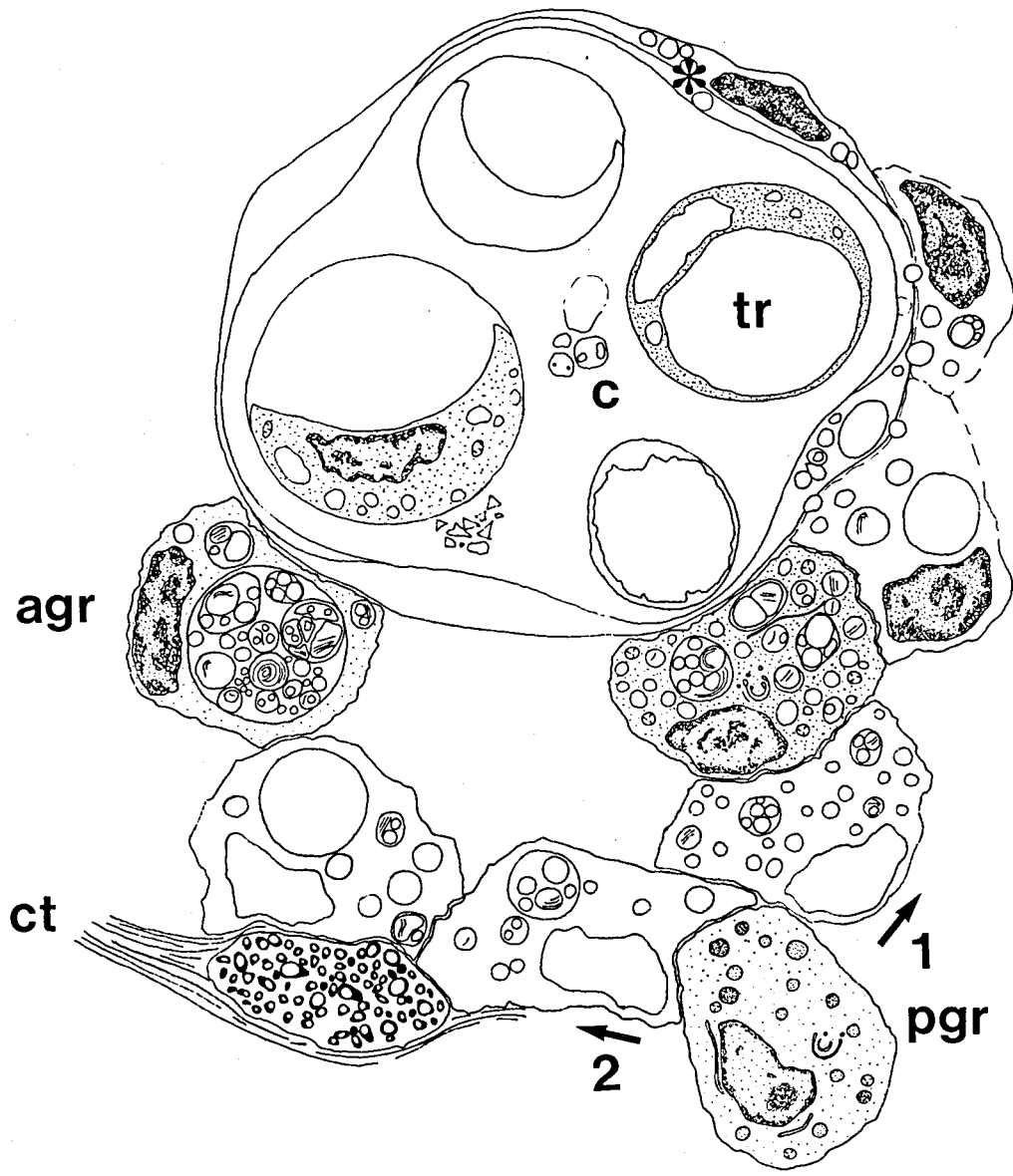


Figure 4

Lectin histochemistry

- A** Localization of RCA I in dense territories in the capsule close to the trophozoite wall (*w*). x33000. *Bar*: 0.5 μm
- B** Localization of RCA I in homologous dense territories of a granulocyte granule. x27000. *Bar*: 0.5 μm
- C** Negative control for RCA I after β -galactosidase digestion, showing the granules devoid of labelling. x27000. *Bar*: 0.5 μm
- D** Localization of HPA in internal membranes (*arrows*) of the capsule near a trophozoite and paracrystalline structures (*arrowhead*). x27000. *Bar*: 0.5 μm
- E** Localization of HPA in the internal membranes (*arrows*) of granulocyte granules. x27000. *Bar*: 0.5 μm
- F** HPA revealed O-linked oligosaccharides, since after their β -elimination the internal membranes (*arrows*) are devoid of labelling. x27000. *Bar*: 0.5 μm

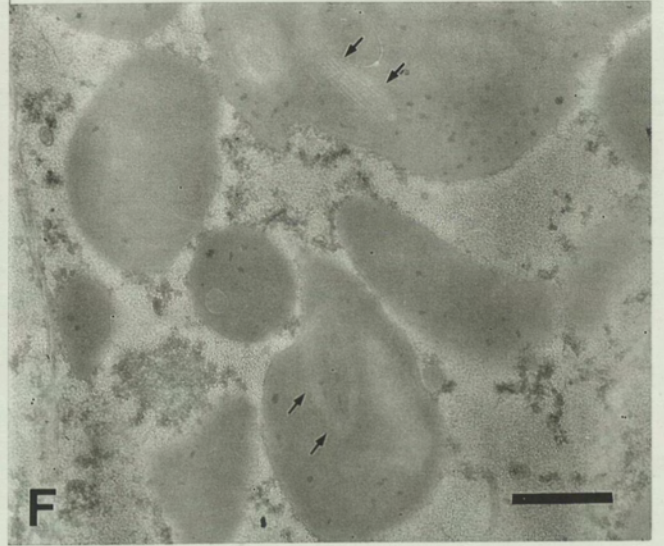
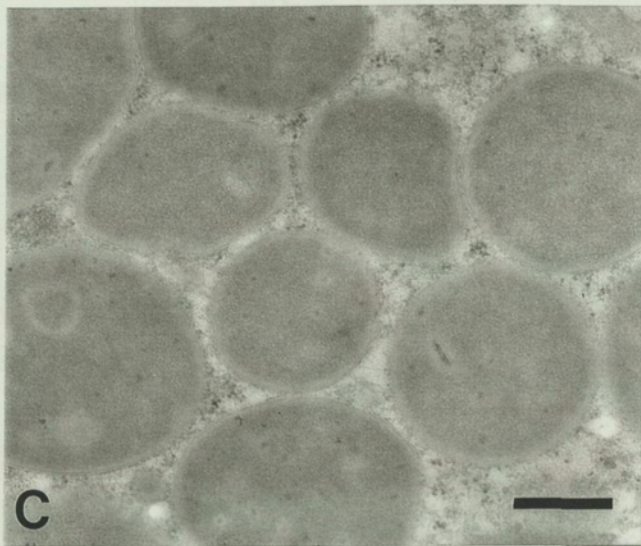
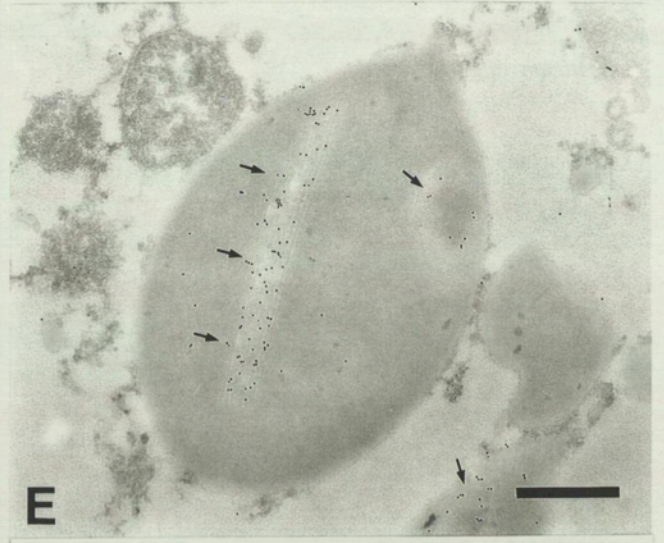
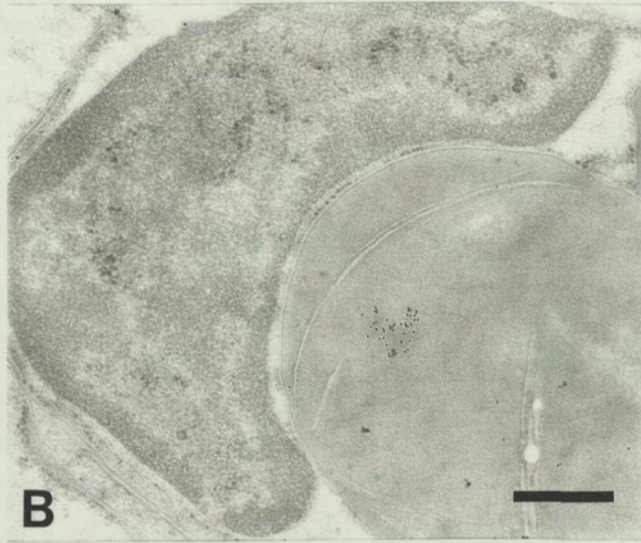
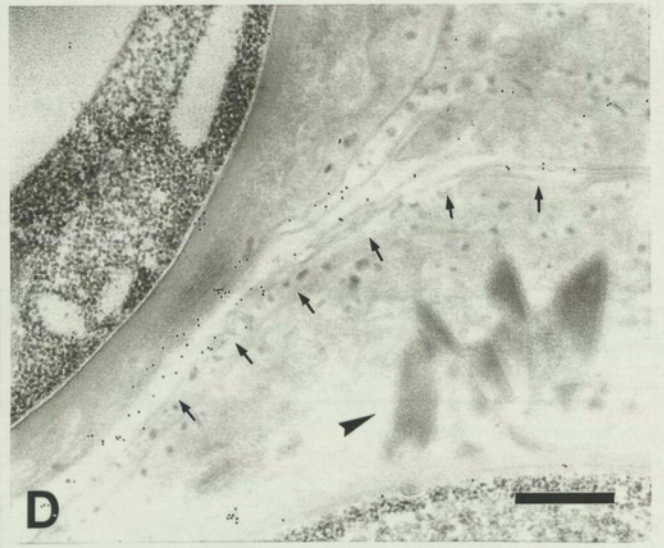
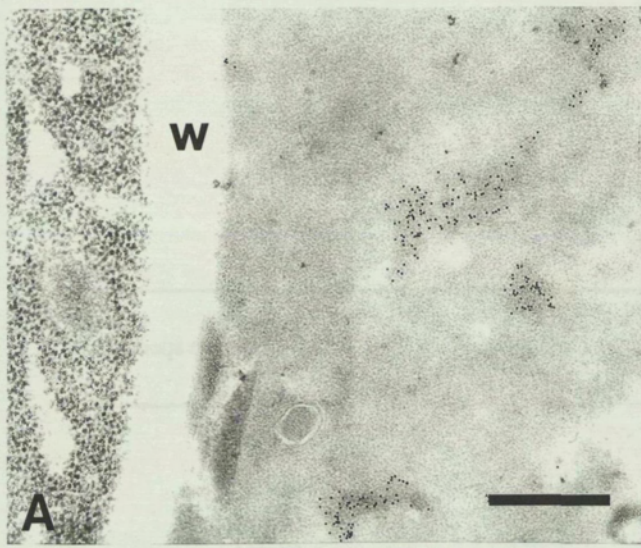


Table 1

Lectins and conjugates used and their binding specificities

Lectin source	Abbreviation	Conjugate	Saccharide specificities
<i>Canavalia ensiformis</i>	Con A	Au ₁₀	αMan αGlc GlcNAc
<i>Triticum vulgare</i>	WGA	Biotin	GlcNAc(β1,4GlcNAc) _{1,2} βGlcNAc Neu5Ac
<i>Helix pomatia</i>	HPA	Au ₁₀	GalNAcα1,3GalNAc αGalNAc
<i>Glycine max</i>	GMA	Au ₁₀	α and βGalNAc α and βGal
<i>Arachis hypogaea</i>	PNA	Au ₁₀	Galβ1,3GalNAc α and βGal
<i>Ricinus communis</i> (agglutinin)	RCA I	Biotin	βGal αGal GalNAc
<i>Ulex europeus</i> I	UEA I	Biotin	αL-Fuc
<i>Limax flavus</i>	LFA	-	αNeu5Ac αNeu5Gc



Characterization and localization of an Mr 225 kDa polypeptide specifically involved in the defence mechanisms of the clam *Tapes semidecussatus*

Juan F. Montes, Mercé Durfort, José García Valero

Publicado en *Cell and Tissue Research* (1995) 280:27-37

ABSTRACT

Parasitosis of the clam *Tapes semidecussatus* (Mollusca, Bivalvia) by the trophozoite protozoan *Perkinsus* sp. (Apicomplexa, Perkinsea) induces in the connective tissue of the clam a cellular reaction involving infiltrated granulocytes. This cellular reaction, like a holocrine gland, releases a secretory product after cell death and it constitutes a capsule around the trophozoites. An enriched fraction of prezoosporangia and their associated capsule was obtained after culture of the parasitized gills in fluid thioglycollate medium. Specific polypeptides from this fraction were separated by SDS polyacrylamide gel electrophoresis and were isolated for the immunization of rabbits. The serum obtained against a polypeptide of Mr 225-kDa revealed its exclusive localization in the capsule and in the granules of the infiltrated granulocytes; this indicates that the polypeptide is synthesized by these cells and that it is secreted in a polarized way around the trophozoites, resulting in their encapsulation. Selective deglycosylation of the polypeptide by Endo H and alkaline β -elimination had no effect on its molecular weight or antibody recognition. Furthermore, the absence of the 225-kDa band in Western blots of non-parasitized gills indicated the specific association of this polypeptide with parasitosis. This is the first tissue-specific factor described in molluscs in relation to their defence mechanisms.

Key words: Defence mechanisms - Encapsulation - Granulocytes - Immunocytochemistry - Parasitism - *Perkinsus* sp. (Protozoa) - *Tapes semidecussatus* (Mollusca)

RESUMEN

La parasitosis de *Perkinsus* sp. (Apicomplejo, Perkinsea) localizada en el tejido conjuntivo de los filamentos branquiales de la almeja *Tapes semidecussatus* (Molusco, Bivalvo) induce una reacción celular constituida por la infiltración de granulocitos circulantes. Esta reacción celular muestra características de glándula holocrina, siendo encapsulados los parásitos por el producto de secreción de los granulocitos. Tras el cultivo de branquias parasitadas en el medio de tioglicolato se obtuvo una fracción enriquecida de los prezoosporangios y de la cápsula asociada. Mediante SDS-PAGE fueron separados y aislados aquellos polipéptidos específicos de esta fracción. Tras la inmunización de conejos, el suero obtenido contra el polipéptido de 225 kDa, reveló que este polipéptido se localiza exclusivamente en la cápsula y en los gránulos de los granulocitos infiltrados. Estos resultados indican que el polipéptido es el principal componente de la cápsula, siendo sintetizado por los granulocitos y secretado alrededor de los trofozoitos. La deglucosilación selectiva del polipéptido, mediante Endo H y β -eliminación alcalina, no modificó ni el peso molecular ni el reconocimiento de la banda por el suero. Además, la ausencia de la banda de 225 kDa en los Western-blot de las branquias no parasitadas indica la asociación de este polipéptido con la parasitosis. Este es el primer factor tisular específico descrito en moluscos relacionado con los mecanismos defensivos.

Palabras clave: Encapsulación - Granulocitos - Inmunocitoquímica - Mecanismos defensivos - Parasitismo - *Perkinsus* sp. (Protozoo) - *Tapes semidecussatus* (Molusco)

INTRODUCTION

The protozoa of the genus *Perkinsus* (Apicomplexa, Perkinsea) (Levine 1978), *P. marinus* (formerly named *Dermocystidium marinum* or *Labyrinthomyxa marina*) (Mackin et al. 1950), *P. olseni* (Lester and Davis 1981), *P. atlanticus* (Azevedo 1989) and *P. karlssoni* (McGladdery et al. 1991) are parasites that cause high mortality in bivalves and gastropods. Many steps in the life cycle of these protistan parasites and their infective stages remain to be elucidated. However, the trophozoites of *Perkinsus* spp. enlarge substantially when the parasitized host tissues are cultivated in Ray's fluid thioglycollate medium (FTM). These enlarged cells, known as prezoosporangia (also named hypnosporos), release biflagellated zoospores when they are placed into sea water (Perkins 1988).

Perkinsus spp. trophozoites (but not *P. marinus*) induce a cellular reaction that leads to parasite encapsulation by the host (Perkins 1988). This cellular reaction plays an important role in the defence of the invertebrate hosts against parasites and is classified into phagocytotic and encapsulation-type responses (Cheng 1981; Ratcliffe et al. 1985). In molluscs, haemocytes are the main cells involved in these responses. Three major categories of bivalve haemocytes have been demonstrated: granulocytes, hyalinocytes and serous cells (Cheng 1981). Although hyalinocytes, in addition to some cells from connective tissue and their derivatives, have been described in capsule formation, granulocytes are the cells most frequently involved (Ratcliffe et al. 1985).

In particular, granulocytes have been reported in the encapsulation of *Perkinsus* spp. by the clams *Ruditapes decussatus* (Mollusca, Bivalvia) (Chagot et al. 1987; Comps and Chagot 1987; Azevedo et al. 1990b; Figueras et al. 1992; Navas et al. 1992) and *Tapes semidecussatus* (= *Tapes philippinarum*) (Mollusca, Bivalvia) (Montes et al. 1995a). Moreover, we have recently reported that the trophozoites of *Perkinsus* sp. in *T. semidecussatus* are embedded in the secretion product of the infiltrated granulocytes. These granulocytes constitute a cellular reaction and its secretory pattern resembles that of the holocrine glands (Montes et al. 1995a).

Although several molecules, such as agglutinins, lectins, haemolysins and lysosomal enzymes, have been described as defensive factors in various bivalve species, their role in molluscan defence against parasites appears to be non-specific and is not fully understood (Fries 1984; Ratcliffe et al. 1985; Chu 1988; Olafsen 1988). In the present study, we have isolated and partially characterized the main component secreted around the trophozoites of *Perkinsus* sp. for capsule formation in the clam *T. semidecussatus*. Furthermore, polyclonal antibodies have been raised against this polypeptide, which represents the first tissue-specific factor described in the defence mechanisms of molluscs.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Perkinsus sp.-parasitized clams with a total weight of 90 kg (approx. 3500 clams) and 202 non-parasitized clams of the species *Tapes semidecussatus* (Mollusca, Bivalvia) were collected in the delta of the River Ebro, Mediterranean Sea, Tarragona (NE Spain).

Culture of trophozoites, isolation and purification of prezoosporangia and gill tissue processing

Isolated parasitized gills were cultured following a modification (Chu and Greene 1989; Azevedo 1989) of the thioglycollate method described by Ray (1952). Briefly, about 1 kg parasitized gills were cultured in FTM (Difco Laboratories, Detroit, Michigan), rehydrated with 0.22 μm filtered sea water (25‰ salinity) and supplemented with penicillin (Sigma, St Louis, Mo) and streptomycin (Sigma). Culture was carried out for 72 h in the dark and under anaerobiosis at 28°C. After culture, tissues were chopped and then incubated in 0.25% trypsin (Sigma) in sea water for 20 min at 37°C. The tissue suspension was sequentially filtered through meshes of 300 and 100 μm . Finally, the prezoosporangia fraction was enriched by gradual centrifugation from 540 g to 60 g (Chu and Greene 1989). The purity of the fraction was determined by phase contrast microscopy and Lugol's iodine stain (Ray 1952).

Fresh parasitized and non-parasitized gills were also chopped, trypsinized and filtered, as described above. Enriched fractions of prezoosporangia, and parasitized and non-parasitized gills were resuspended in 10 mM ethylenediamine-tetraacetic acid (EDTA; Sigma) in double-distilled water and then treated by ultrasonication (Labsonic U Ultrasonic-Homogenizer; Braun, Melsungen, Germany). Protein concentrations were estimated by a modification of the Lowry method as described by Larson et al. (1986) using ovalbumin (Sigma) as the standard.

SDS polyacrylamide gel electrophoresis

SDS polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) was performed as previously described (Laemmli 1970) in 4%-9% acrylamide gels under reducing conditions. Polypeptides were resolved using Coomassie Blue R and/or silver nitrate according to the method of Merril et al. (1981). Apparent molecular masses of polypeptides were determined from their relative mobilities compared with a standard of high molecular mass protein (thyroglobulin, 330 kDa; α_2 -macroglobulin, 180 kDa; bovine serum albumin, 67 kDa; catalase, 60 kDa; lactate dehydrogenase, 36 kDa). Chemical reagents for SDS-PAGE were purchased from Sigma.

Selection and isolation of antigenic polypeptides

Bands that were present in the protein profile of parasitized gills but that were not found in that corresponding to non-parasitized gills were selected from the encapsulated prezoosporangia lane for rabbit immunization. After electrophoresis, the selected bands were removed from the gels and kept at -80°C until injection. The purity of the isolation was checked by a second electrophoresis of these slices and then resolved with silver nitrate.

Immunization and production of antisera

Specific polyclonal antisera raised by direct immunization from SDS-PAGE slices were obtained according to the method described by Boulard and Lecroisey (1982). In brief, young white male New Zealand rabbits, weighing 2-3 kg, were immunized by intramuscular injections with emulsions of gel homogenates, each containing about 150 μg isolated polypeptides. Another group of rabbits was immunized with emulsions of isolated prezoosporangia, each equivalent to 2.5 mg total protein. All immunizations were performed by dissolving the immunogen in phosphate-buffered saline (PBS) and Freund's adjuvant (Sigma), complete for the first injection and incomplete thereafter. Boosts were performed every two weeks and blood samples were taken 10 days after each boost.

Each serum was tested by immunoblotting, and its specific localization and quantitative evaluation was determined by means of immunocytochemical techniques by electron microscopy. According to the results obtained by these techniques, the serum against a polypeptide of Mr 225-kDa (p225) and that against isolated prezoosporangia were selected for analysis.

Immunoblotting

Serum specificity was tested by the Western blot technique (Towbin et al. 1979). After SDS-PAGE separation, as described, polypeptides were transferred to a nitro-cellulose membrane. Transfer was achieved at 20 V overnight at 4°C . Membranes were blocked with 3% ovalbumin in 10 mM PBS for 30 min and then incubated with the serum against p225 (diluted 1:800 in PBS with 1% ovalbumin) or with the serum against isolated prezoosporangia (1:7500 dilution) for 3 h at room temperature. After three washes in 10 mM PBS, 0.2% Tween 20 (Sigma), the membrane was incubated with peroxidase-conjugated swine anti-rabbit IgG (Dako, Glostrup, Denmark) diluted 1:2000 for 2 h at room temperature. After being washed, the membrane was developed in 50 mM tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris; Sigma) (pH 7.6), 0.1% 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB; Sigma), 0.02% hydrogen peroxide and, finally, recorded on Technical Pan film (Kodak, Hemel Hempstead, UK). For the controls, the specific antisera were replaced by the respective pre-immune serum. In additional controls, incubation with the primary antibodies was omitted.

Deglycosylation of the Mr 225-kDa polypeptide

Selective deglycosylation was achieved by two procedures. To remove N-linked oligosaccharides, the isolated polypeptide was treated with endo- β -N-acetylglucosaminidase H (Endo H; Boehringer, Mannheim, Germany) (Kobata 1979; Trimble and Maley 1984). Gel homogenate containing the isolated polypeptide was incubated with 20 mU Endo H in 10 mM citrate acid phosphate buffer (pH 5.2), 1 μ M leupeptin (Sigma), 200 μ M phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF; Sigma), 0.02% NaN₃ (Sigma) for 24 h at 37°C. For control experiments, the samples were incubated with heat-inactivated (100°C for 1 min) Endo H. O-linked oligosaccharides were removed by alkaline β -elimination as described by Florman and Wassarman (1985). In short, the polypeptide was incubated in 5 mM NaOH, 1 μ M leupeptin, 200 μ M PMSF, 0.02% NaN₃ for 16 h at 37°C in a toluene atmosphere. In control samples, NaOH was replaced by distilled water. After the incubations, treated and control samples, and molecular mass standards were electrophoresed and transferred to nitro-cellulose membranes, as described before.

Tissue processing for light and electron microscopy

Histopathological examination was performed in parasitized clams fixed in 4% formaldehyde in sea water, dehydrated and embedded in paraffin. Sections (6 μ m thick) were stained with Harri's haematoxylin-eosin. For light and transmission electron microscopy (TEM), abscesses from parasitized gills, isolated under the stereoscopic microscope, and isolated prezoosporangia were fixed in 2% (w/v) paraformaldehyde, 2.5% (v/v) glutaraldehyde in 0.1 M PBS for 2 h at room temperature. Primary fixation was followed by postfixation with 1.0% osmium tetroxide in PBS for 1 h. The samples were dehydrated in acetone and embedded in Spurr resin. For scanning electron microscopy (SEM), isolated prezoosporangia were dehydrated in ethanol, critical-point dried through amyl acetate, mounted on stubs and sputter-coated. Samples were observed with a Hitachi S-2300 scanning electron microscope.

Immunocytochemistry

Samples for immunocytochemical techniques were fixed in 4% (w/v) paraformaldehyde, 0.1% (v/v) glutaraldehyde in 0.1 M PBS (pH 7.4) for 2 h at 4°C. Isolated prezoosporangia were then embedded in 30% ovalbumin in PBS and polymerized in the same fixative. Finally, all samples were rinsed with 0.15 M NH₄Cl in PBS for 15 min and then rinsed with PBS. For immunogold cytochemistry, gill abscesses and isolated prezoosporangia were prepared for embedding in Lowicryl K4M resin (Chemische Werke Lowi, Waldkraiburg, Germany) as previously described by Carlemalm et al. (1982).

Before labelling, sections were rinsed twice with 0.1 M glycine (Sigma) in PBS (gly PBS) for 10 min and incubated with 2% ovalbumin in PBS for 30 min. For single immunolabelling, the grids

were incubated with serum against p225 (1:3000 dilution) or with serum against isolated prezoosporangia (1:6000), for 2 h at room temperature, and rinsed three times with gly PBS for 15 min. Bound polyclonal antibodies were visualized following incubation with 10-nm protein A gold (pAg; Sigma) for 1 h. For double immunolabelling, the sections previously incubated with the serum against isolated prezoosporangia were labelled with 10-nm pAg, as described above. The sections were then incubated with serum against p225 and reacted with 15-nm pAg (Sigma). Finally, sections were stained with uranyl acetate and lead citrate. For light microscopy, 1- μ m-thick sections were mounted on gelatinated glass slides and then treated for silver staining. Sections were rinsed, blocked, incubated with serum against p225 and reacted with 10-nm pAg (Sigma), as described above. After extensive washes with double-distilled water, the immunogold label was enhanced with a silver kit (Bio Cell Research, Cardiff, UK).

For immunofluorescence, the parasitized clams were fixed and rinsed as described for Lowicryl embedding. Samples were then cryoprotected by infusion with 30% sucrose in PBS, embedded in optimum-cutting temperature compound (OCT; Miles Laboratories, Naperville, IL), quickly frozen in dry-ice and stored at -35°C . Sections (8-10 μm thick) were cut using a Cryostat 2800 Frigocut-E (Reichert-Jung, Vienna, Austria) and spread on gelatinated glass slides. The sections were rinsed and blocked, as described, and incubated with serum against p225 (1:800 dilution), overnight at room temperature. After several rinses with gly PBS, sections were incubated with fluorescein-isothiocyanate (FITC)-conjugated goat anti-rabbit IgG (Dako) for 1 h at room temperature. "In toto" immunofluorescence was performed essentially following the schedule described above, but the isolated prezoosporangia were fixed in 4% paraformaldehyde in PBS.

Controls were performed by replacing the specific antisera with pre-immune serum. Additional controls were carried out by omitting the specific antisera from the immunolabelling procedure. Thin sections were observed with a Reichert-Jung Polyvar 2 optical microscope and the ultrathin sections with a Hitachi H-600 AB transmission electron microscope.

Quantitative evaluation

Label density (LD) was estimated as the number of gold particles per sectioned area of granules, capsule or trophozoite and prezoosporangium wall profiles. The area parameter was estimated by stereological methods (Weibel 1979) and the significance of the mean differences was tested by Student's *t*-test.

RESULTS

Culture of trophozoites, isolation and purification of prezoosporangia

Gill filaments from clams heavily parasitized by *Perkinsus* sp. showed the ultrastructural characteristics of the cellular reaction described before. Isolated prezoosporangia were spherical and their diameter ranged from 28 to 79 μm . Despite this increase in volume, the prezoosporangia showed the same structural characteristics as the trophozoites. By SEM, the prezoosporangia showed an irregular surface with randomly distributed remnants of the capsule.

Western blotting and deglycosylation of the Mr 225-kDa polypeptide

The specificity of recognition of the sera was determined by Western blotting. The best specificity was obtained with the serum against p225. By means of the incubation with this serum, a 225-kDa band was detected in the samples of the encapsulated prezoosporangia. The same band was also detected in the parasitized gills, although it was poorly stained; it was not detected in non-parasitized gills. However, by means of this serum, a smear was also detected between 60 and 70 kDa; this could constitute degradation products of p225, since this smear was observed even after a second electrophoresis run of the isolated band and was never seen in non-parasitized gills (Fig. 1A). Neither the incubation with Endo H, nor the alkaline β -elimination had a detectable effect on the molecular weight of p225 or on the band recognition by the serum against p225 (Fig. 1B).

Immunolocalization

When the parasitized gills were incubated with the serum against p225, areas showing the cellular reaction were the only labelled regions of the gill tissues. Thus, the label was located in the granules of the granulocytes, in the capsule and in the trophozoite wall. Furthermore, the label was located in the capsule remnants of the isolated prezoosporangia.

In the granulocytes, labelling for this polypeptide was exclusively confined to the granule content (Fig. 2A, B), whereas the limiting and the internal membranes of the granules were devoid of label (Fig. 2C, D). Although strong labelling was associated with the granule content, these granules showed a variability according to the maturation stage. Whereas the mature granules with a homogeneous content were strongly labelled (Fig. 2B), the LD was low but significant for the non-mature granules, which had a floccular content (Fig. 2A). These non-mature granules were mainly located in the granulocytes that lay at the periphery of the cellular reaction. On the other hand, the giant granules, resulting from fusion and partial degradation of the initial granules, showed a similar label distribution to that of unfused granules, although the LD for the former was lower than the LD for the latter (Fig. 2D). Finally, the label was scattered in the giant granules undergoing degradation, which resulted in a significant fall in their LD (Fig. 2E).

The distribution of label observed in the capsule was similar to that observed in the granules. However, the LD for the capsule was lower than the LD for the granules (Fig. 3A, B).

The trophozoites of *Perkinsus* sp. were homogeneously labelled in the wall. Labelling was absent or scarce during the initial phases of parasitosis but it increased slightly in latter stages (Fig. 3B). Invaginations of the plasma membrane of the trophozoite were occasionally detected that contained a material with a similar appearance to that of the capsule. This material protruded into the trophozoite and detached its plasma membrane from the wall (Fig. 3C). Label distribution on this material was similar to that observed in the capsule but the LD was higher than the LD for the capsule or the trophozoite wall, indicating a selective and active capture process. Label was not detectable in other compartments of the trophozoite. No labelling was seen in epithelial cells, spindle-shaped cells of the connective tissue, endothelial cells, extracellular matrix or haemolymph of the host.

When immunolocalization of p225 was carried out in isolated prezoosporangia, labelling was confined to the capsule remnants observed in close contact with the prezoosporangia wall (Fig. 3D). Labelling was always absent from all prezoosporangia compartments.

Labelling by the serum obtained against isolated prezoosporangia was restricted to the content, the limiting and internal membranes of the granules and to the plasma membrane of the granulocytes. Although double immunostaining with both sera, viz. the serum against p225 and that obtained against isolated prezoosporangia, revealed their co-localization in the granule content (Fig. 4A), the latter showed a labelling pattern that distinguished two granule populations. On the one hand, some granules showed a pattern of labelling homologous with that obtained using the serum against p225. On the other hand, other granules showed a scattered distribution in addition to a fall in the LD (Fig. 4B).

Furthermore, the serum against isolated prezoosporangia bound the limiting membrane of the granules (Fig. 4B), the capsule and their internal membranes, whereas the only trophozoite structure labelled was the trophozoite wall (Fig. 4C). In the prezoosporangia, the labelling was mainly associated with the plasma membrane and the cytoplasm, whereas the wall was devoid of label (Fig. 4D). This labelling was broadly distributed in the tissues because a fraction of this serum yielded a strong staining reaction for some epitopes located in the granulocyte plasma membrane, and for those of vesicles from endocytotic and exocytotic pathways (Fig. 4E, F).

The reactivity of the serum against p225 in gills, mantle, digestive gland, gut, muscular foot, gonads and haemolymph of the parasitized clams was studied by indirect immunofluorescence microscopy. The connective tissue associated with the gut was the best organ system in which to study the relationship between trophozoites and the cellular reaction. The immunostaining observed by light microscopy confirmed that obtained by electron microscopy, as the label was observed exclusively

in the capsule that surrounded the trophozoites, whereas the granulocytes exhibited a punctate pattern associated with secretion granules (Fig. 5A, B).

Semi-thin sections of gill abscess were treated for silver enhancing to observe the label distribution of the serum against p225 in the capsule. Intense staining was observed in the capsule, lining the periphery of the trophozoites (Fig. 5C). The results obtained after silver enhancement of immunostaining with serum against p225, performed on semithin sections, demonstrated the integrity of the capsule and, thus, the capacity of this structure to block the parasite dissemination; this method also established that the capsule is the only structure labelled by this serum.

Finally, "in toto" immunofluorescence performed in isolated prezoosporangia revealed strong heterogeneous punctate staining on the surface of the prezoosporangia. The staining was always associated with the remnants of the capsule (Fig. 5D, E).

DISCUSSION

Perkinsus sp. trophozoites have recently been described in the connective tissue of the gills of the clam *T. semidecussatus*; they have been shown to induce a cellular reaction, constituted by infiltrating granulocytes (Montes et al. 1995a). The secretion of this cellular reaction, which is typical of that of a holocrine gland, causes the encapsulation of the trophozoites.

Our results have allowed us to identify, for the first time, a polypeptide involved in tissue responses to parasitic infection in molluscs. This polypeptide, with a molecular weight of about 225-kDa, has been immunolocalized, by means of a specific serum, not only in all compartments related to the secretory pathway, but also at the putative sites of physiological activity, such as the capsule that surrounds the trophozoites, the trophozoite wall, the material engulfed by the invaginations of the trophozoite plasma membrane and the remnants of the capsule on the isolated prezoosporangia. Moreover, the absence of the p225 band in non-parasitized gills indicates the association of this polypeptide with parasitosis.

Results from p225 deglycosylation indicate either that this polypeptide is non-glycosylated, or that the number or extent of oligosaccharide moieties is low, since it deglycosylation shows no detectable effect on its molecular weight. Moreover, these results are essentially in agreement with those obtained from the application of lectins to the cellular reaction against *Perkinsus* sp. trophozoites in this clam (Montes et al. 1995a). Thus, neither the granule content, nor the capsule shows selective affinity for lectins from *Canavalia ensiformis* (Con A), *Triticum vulgare* (WGA), *Glycine max* (GMA), *Arachis hypogaea* (PNA), *Ulex europeus* I (UEA I) or *Limax flavus* (LFA). However, although β -D-galactosyl and GalNac α 1,3GalNac residues have been identified in the secretory product

of the granulocytes, respectively, by *Ricinus communis* (agglutinin) (RCA I) and *Helix pomatia* (HPA), the labelling is only associated with restricted regions of both granule content and capsule. Furthermore, whereas the internal membranes of these compartments are strongly stained by HPA, labelling for serum against p225 has not been observed in these structures.

Nevertheless, results obtained from the application of the PAS technique in the clams *Ruditapes decussatus* parasitized by *Perkinsus* sp. (Chagot et al. 1987; Comps and Chagot 1987) indicate that the main product of the capsule is highly glycosylated. This divergence may have arisen because PAS detects sugars that occupy internal positions of the oligosaccharide chain, whereas lectins react mainly with sugars located in terminal or subterminal positions (Spicer and Schulte 1992). However, Montes et al. (1995a) have also observed, that a low reaction is associated with the granule content following the application of the Thiéry technique, an ultrastructural counterpart of the PAS method. These results are in agreement with the stability of this polypeptide after deglycosylation, and thus the reactivity to PAS technique could be attributable to molecules other than p225.

The source of p225 from isolated prezoosporangia appears to be the capsule, since remnants of this have been observed, by transmission and scanning electron microscope, to lie in close contact with the prezoosporangia wall. The remnants of the capsule are thus labelled by serum against p225, whereas labelling is always absent from all prezoosporangia compartments when these cells are assayed by immunocytochemistry techniques for light and electron microscopy.

The localization of labelling for serum against p225 in the capsule and in the granules of the granulocytes indicates that this polypeptide is synthesized by these cells, that it is stored in granules and that it is secreted, in a polarized way, around the trophozoites for their encapsulation. Furthermore, the results obtained by means of the serum against the isolated prezoosporangia support those reported above, since the same structures associated with synthesis, secretion and deposit of p225 are labelled.

The labelling of the wall and of the content of the invaginations of the trophozoites by serum against p225 indicates that this polypeptide diffuses across the trophozoite wall and, furthermore, that it is specifically stored by the trophozoites. The polypeptide and the cellular reaction could therefore constitute the basis of a sequential defence system. On the one hand, the holocrine secretion of a non-cellular capsule blocks the free access of trophozoites to the haemolymph, thus avoiding distribution to other organs by blood vessels, which have been suggested as the distribution pathway of trophozoites (Lauckner 1983; Andrews 1988). On the other hand, although dead trophozoites have not been seen, the diffusion of this polypeptide, and probably of other molecules from the capsule, across the trophozoite wall, and its accumulation in the invaginations of the plasma membrane could have a negative effect on the viability of the trophozoites.

When isolated prezoosporangia are incubated with serum directed against themselves, labelling is located in the plasma membrane and cytoplasm. However, when this serum is assayed in the parasitized gills, homologous structures of the trophozoites are unlabelled. This non-cross-reactivity between the trophozoites and prezoosporangia indicates a different expression of the antigens recognized by the serum during prezoosporangia formation. A substantial change in the antigenic properties of the trophozoite wall during prezoosporangia formation has also been noted by Choi et al. (1991); they have observed that serum against the prezoosporangia wall of *P. marinus* fails to cross-react with the trophozoites that parasitize *Crassostrea virginica*. However, Dungan and Roberson (1993) report that at least some sera raised against *P. marinus* prezoosporangia from infected *C. virginica* haemolymph also recognize epitopes on trophozoites in infected oyster tissues. These findings are not necessarily controversial, since the differentiation of trophozoites to prezoosporangia implies the expression of some new antigens, but not necessarily of all of them.

Although other molecular types, such as lysosomal enzymes of haemocytes, have been implicated in the defence against foreign agents, their specific role remains unclear. Nevertheless, agglutinins and lectins have been detected in the haemolymph, haemocytes or tissue extracts of molluscs and these molecules may also be involved in the internal defence of these organisms (reviewed by Fries 1984; Ratcliffe et al. 1985; Chu 1988; Olafsen 1988). However, although molluscan agglutinins may act as opsonins to facilitate haemocyte attachment and phagocytosis (Anderson and Good 1976; Vasta et al. 1982; Olafsen 1988), the specific role of these molecules in relation to defence mechanisms is not clear in molluscs and, furthermore, it can vary between species. Thus, Tripp (1992b) suggests that lectins of molluscs are not needed for phagocytosis in the clam *Mercenaria mercenaria*.

Although p225 shows a high capacity for agglutination, there are several differences in comparison with agglutinins. The latter react with at least two binding sites, forming a monolayer around non-self particles, whereas the localization of p225 demonstrates its uniform distribution in the capsule, rather than a restricted close contact with the trophozoites. Furthermore, agglutinins appear to be non-specific humoral factors (Chu 1988), since the functional characteristics of these molecules are exclusively related to their capacity to agglutinate red blood cells of several vertebrate species, especially mammalian species. Moreover, a similar capacity for the agglutination of parasites or other foreign molecules cannot be deduced from this activity. However, our results indicate that p225 is secreted in a specific polarized manner by the granulocytes around the parasites; thus p225 represents the first tissue-specific factor described in molluscs in relation to their defence mechanisms.

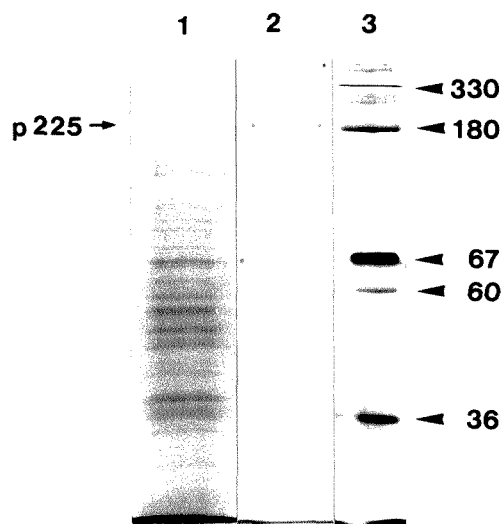
Finally, our results suggest that p225 is the main component of a specific extracellular defensive matrix that has encapsulating and agglutinating characteristics. The holocrine secretion of this polypeptide by the granulocytes is thus a possible mechanism for parasite inactivation. Furthermore, serum against p225 could be used for the development of a suitable method for the early detection of parasitosis.

Acknowledgements We thank Dr. Elena Sagristà (Unitat de Biologia Cel.lular, Facultat de Biologia) for her technical assistance in the isolation of prezoosporangia, Mrs. Mercè Santmartí (Direcció General de Pesca Marítima, Generalitat of Catalonia, Spain) for providing specimens for this study, Mrs. Almudena García and the staff of Serveis Científico-Tècnics (Universitat de Barcelona) for technical assistance and Mr. Robin Rycroft for linguistic advice. This work was supported in part by a grant from the Generalitat of Catalonia, Spain (CIRIT AR91-121).

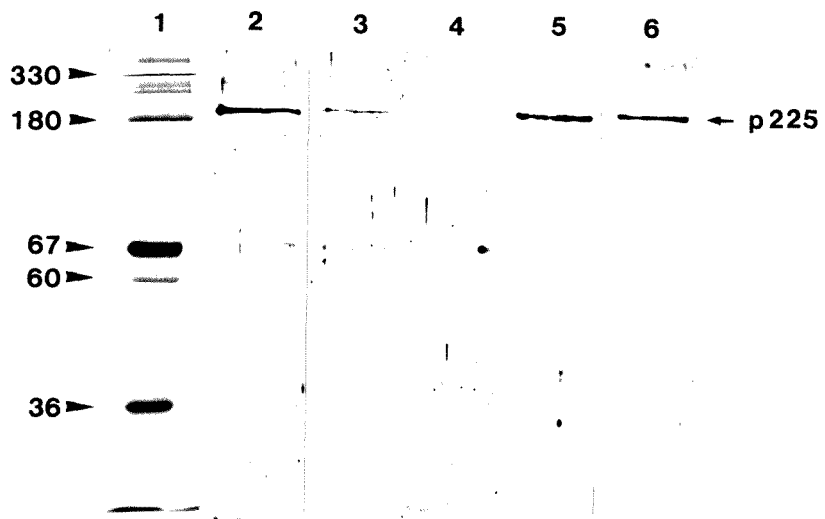
Figures

Figure 1

- A** SDS-PAGE. *Lane 1* Polypeptide profile of an enriched fraction of the prezoosporangia and their associated capsule, isolated after culture of the parasitized gills in FTM, stained with Coomassie Blue; *lane 2* isolated Mr 225 kDa polypeptide (*p225*) stained with silver nitrate; *lane 3* molecular mass standards in kDa (*right*)
- B** Western-blotting with serum against *p225*. *Lane 1* Molecular mass standards (*left* kDa) stained with silver nitrate; *lane 2* enriched fraction of the prezoosporangia and their associated capsule, *lane 3* parasitized gills, *lane 4* non-parasitized gills, *lane 5* isolated *p225* incubated with Endo H; *lane 6* isolated *p225* after β -elimination of O-linked oligosaccharides. The position of band *p225* is indicated *right*



A



B

Figure 2

Localization of p225 in the granules of the infiltrated granulocytes.

- A Labelled non-mature granules (*cg*) of the granulocytes that are observed in the periphery of the cellular reaction, near the endothelium that lines the blood sinus. x32000. *Bar*: 0.5 μ m
- B Labelled mature granules of the granulocytes from the cellular reaction. x43200. *Bar*: 0.5 μ m
- C, D The internal membranes of the granules are devoid of label. C x27000. *Bar*: 0.5 μ m; D x23000. *Bar*: 0.5 μ m
- E Degraded giant granule with scattered label. x27000. *Bar*: 0.5 μ m

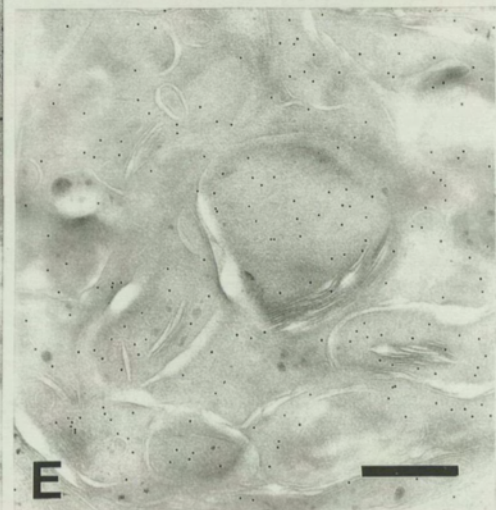
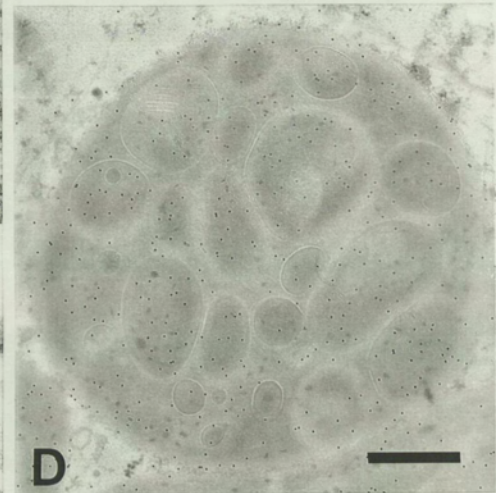
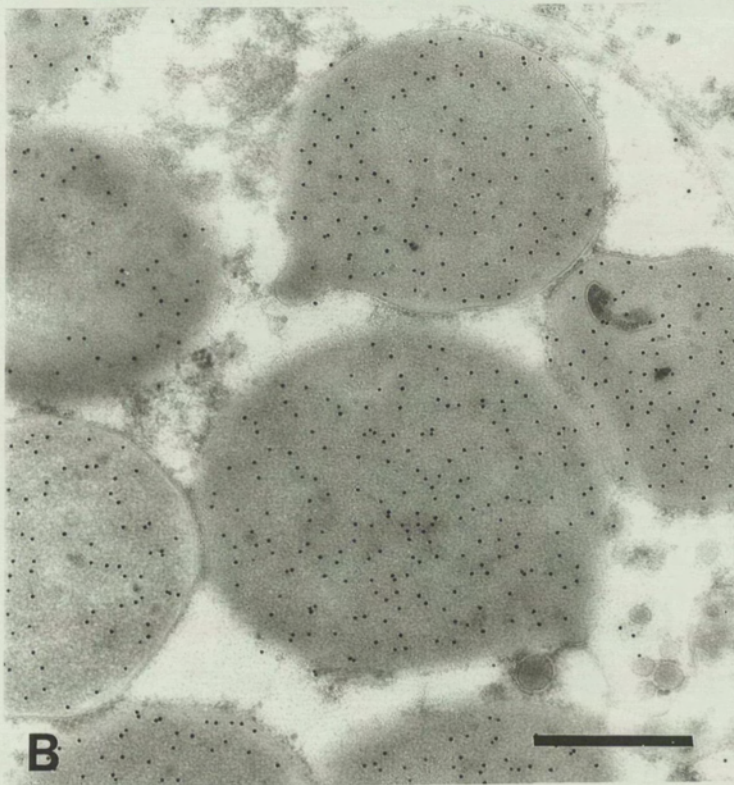
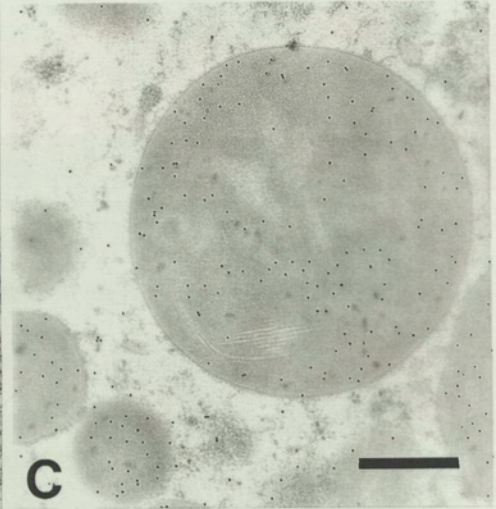
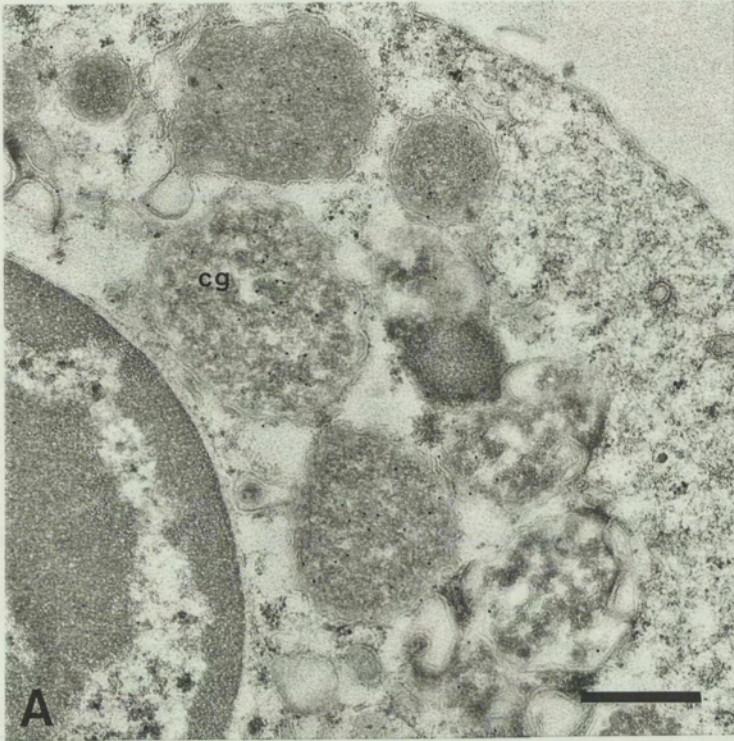


Figure 3

- A** Localization of p225 in the capsule (*c*) that surrounds three *Perkinsus* sp. trophozoites. x27000. *Bar*: 0.5 μm
- B** The internal membranes of the capsule (*c*) are devoid of label. The trophozoite wall (*w*) is homogeneously labelled. x27000. *Bar*: 0.5 μm
- C** Localization of p225 in the material (*asterisk*) observed in invaginations of the trophozoite plasma membrane, in close contact with the trophozoite wall (*w*). x17600. *Bar*: 1 μm
- D** Isolated prezoosporangium, embedded in ovalbumin. The remnants of the capsule (*asterisk*), in close contact with the prezoosporangium wall (*w*), are enriched in p225. x20000. *Bar*: 1 μm

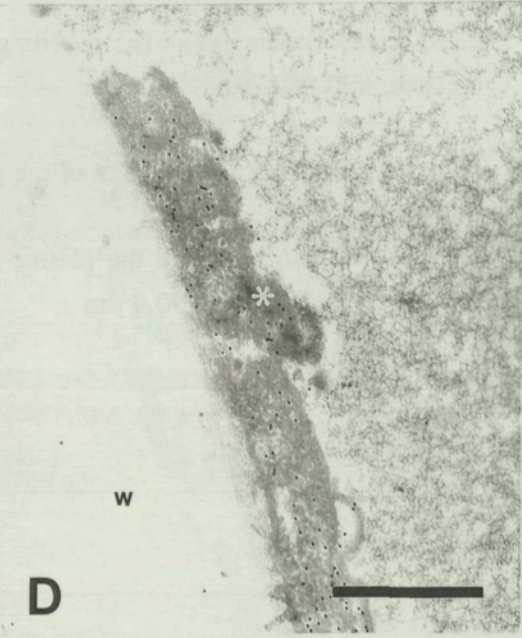
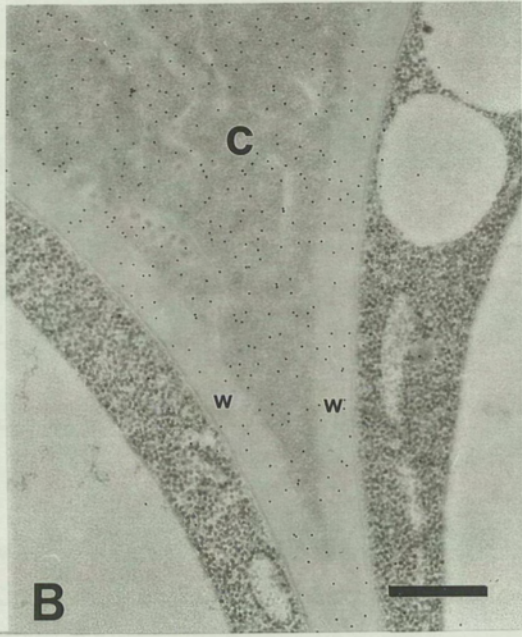


Figure 4

Labelling by the serum against isolated prezoosporangia.

- A Double immunostaining with the serum against isolated prezoosporangia (10 nm gold) and serum against p225 (15 nm gold) in the content and the limiting and internal membrane of the granulocyte granules. x33000. *Bar*: 0.5 μm
- B Localization by means of the serum against isolated prezoosporangia demonstrates the differential distribution of the labelling of the granules. x27000. *Bar*: 0.5 μm
- C Labelling in the capsule and trophozoite wall. The label is exclusively associated with the plasma membrane and trophozoite wall. x27000. *Bar*: 0.5 μm
- D Isolated prezoosporangium. The labelling is associated with the plasma membrane and cytoplasm. x20000. *Bar*: 1 μm
- E Labelling of the plasma membrane of the granulocytes. x33000. *Bar*: 0.5 μm
- F Gold particles distributed on the plasma membrane and transport vesicles (*arrows*) from agranulocyte. x46000. *Bar*: 0.4 μm

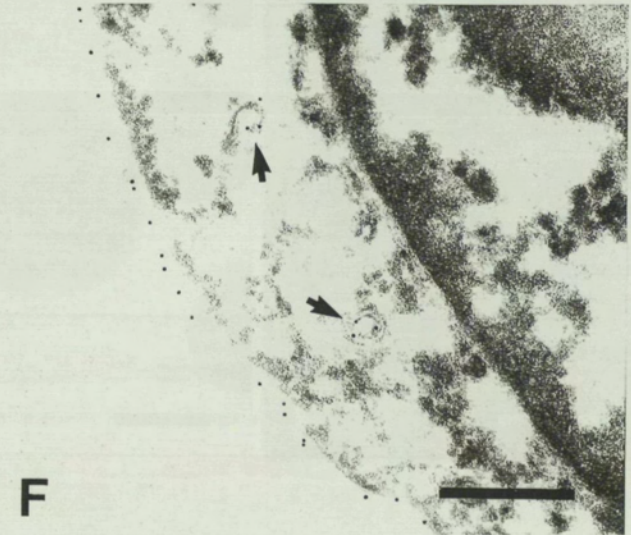
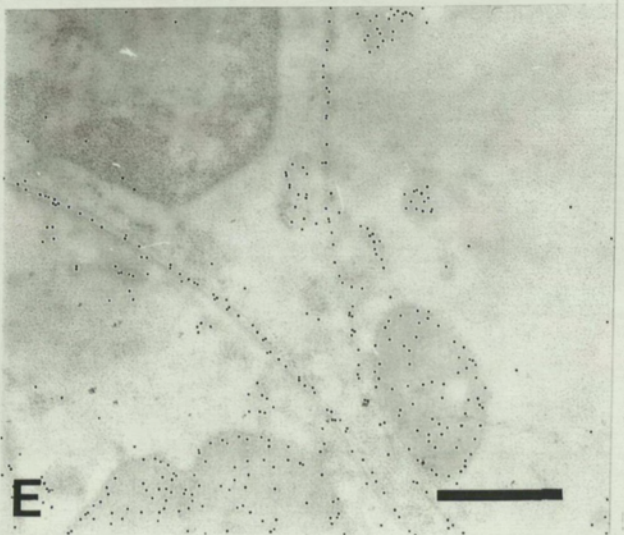
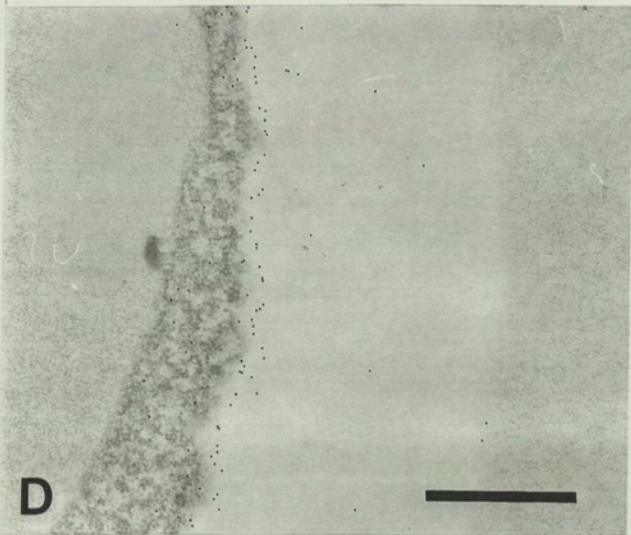
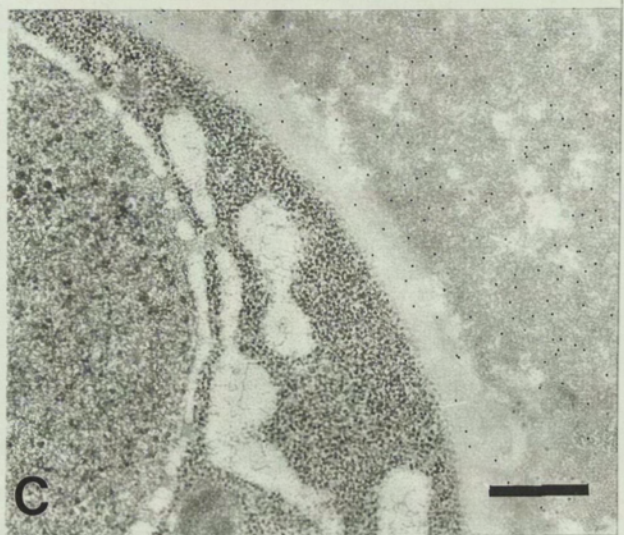
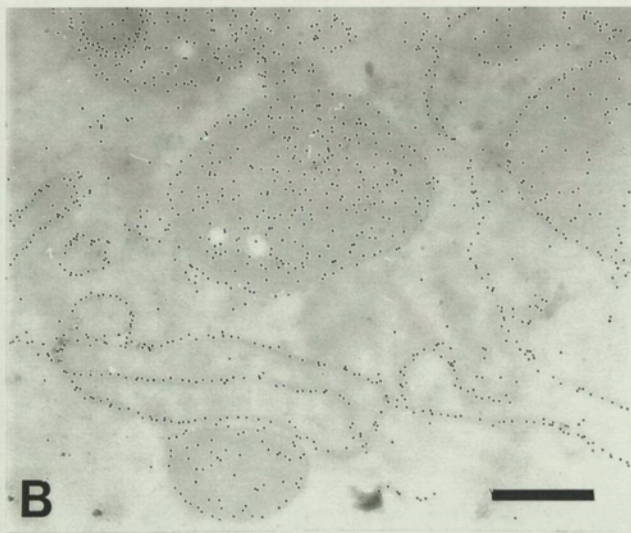
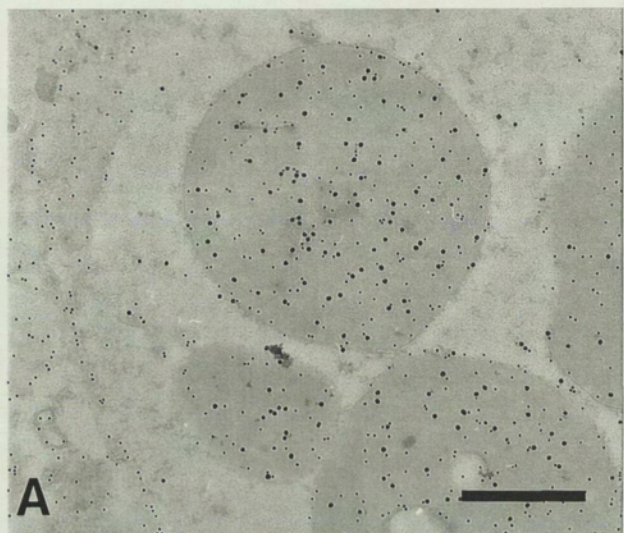


Figure 5

- A, B** Cryostat sections of parasitized connective tissue of the gut observed, respectively, by differential interference contrast and indirect immunofluorescence for the localization of p225. The staining surrounds and delimits the trophozoites and shows a punctate pattern in the granulocytes (*arrows*). x370. *Bar: 50 μm*
- C** Lowicryl semithin section of a cyst from a gill abscess, showing the distribution of p225 by silver enhancing of its immunolocalization. x925. *Bar: 15 μm*
- D** Differential interference contrast image of isolated prezoosporangia, stained with Lugol's iodine solution. x600. *Bar: 20 μm*
- E** "In toto" indirect immunofluorescence for serum against p225 from an isolated prezoosporangium. The staining is associated with the remnants of the capsule (*arrowheads*). x625. *Bar: 20 μm*

