

Análisis histopatológico del abulón negro *Haliotis cracherodii* afectado por el síndrome de deterioro

Valles-Ríos, Héctor

Centro Regional de Investigación Pesquera de Ensenada. INP. A.P. 1306. Ensenada. CP. 22775, BC. E-mail: hualles@telnor.net.

VALLES-RÍOS, H. 2000. Análisis histopatológico del abulón negro *Haliotis cracherodii* afectado por el síndrome de deterioro. INP. SAGARPA. México. Ciencia Pesquera No. 14.

Se analizaron histopatológicamente 27 abulones negros *Haliotis cracherodii* afectados por el síndrome de deterioro, que se obtuvieron de las capturas de la Sociedad Cooperativa de Producción Pesquera "Bahía Tortugas", en la localidad de Los Morros, BCS. Estos individuos presentaron el síndrome de deterioro, que consiste en incapacidad de sostenerse adecuadamente de las rocas del sustrato, pérdida de la pigmentación oral y de tentáculos cefálicos, falta de respuesta a los estímulos del ambiente y atrofia del músculo y de la masa visceral. En todos los abulones se encontró infección por parásitos tipo rickettsiales en esófago, estómago e intestino, la cual se extendió un 70% a los conductos del hepatopáncreas. Se observó atrofia en las células de conductos y túbulos del hepatopáncreas en 55% de los abulones y el 30% presentó parásitos tipo gregarinas en los senos hemales de branquias, riñón y hepatopáncreas sin causar daño aparente al hospedero.

Histopathologic analysis was performed in 27 organisms of black abalone Haliotis cracherodii. All of them were obtained from commercial catches made by the Bahía Tortugas Cooperative in the zone known as Los Morros, BCS. All the organisms were found affected by the Whitening Syndrome. Organisms with this affection showed a great difficulty to remain added to the rock. They present also lost of pigmentation in the oral and cephalic tentacles and lack of response to environmental stimules, and muscle and visceral mass atrophy was observed. All the organisms analyzed presented parasitic infections by rickettsiales-like organisms in esophagus, stomach and intestine, extended to at least 70% of the hepatopancreatic ducts. 55% of the organisms showed severe hepatopancreatic atrophy, and 30% of gregarines-like parasites were found in hemal sinus in branchia, kidney and digestive gland without causing any damage to the host.

Palabras clave: síndrome de deterioro, *Haliotis cracherodii*, parásitos tipo rickettsiales, atrofia muscular, atrofia visceral

Introducción

El abulón ha sido objeto de numerosos estudios, la mayoría de los cuales se refieren a la biología de reproducción (Sevilla, 1971; Martin *et al.*, 1983; Young y DeMartini, 1970; Webber y Giese, 1969) y análisis de pesquerías (Turrubiates y Castro, 1989). A pesar de que estas investigaciones contribuyen a mantener y aprovechar óptimamente este recurso, el tamaño de la población de abulón negro *Haliotis cracherodii* ha tenido una tendencia importante a disminuir (Richard y Davis, 1993). Este fenómeno no sólo es producto del esfuerzo pesquero sino que influyen de manera especial las enfermedades infecciosas y no infecciosas. En invertebrados marinos el desarrollo de enfermedades no infecciosas se propicia fácilmente con situaciones ambientales como el fenómeno de El Niño (Tissot, 1990; Lafferty y Kurys, 1993) y otras alteraciones físicoquímicas del hábitat del abulón que se reflejan como alteraciones de índole

tóxica (Valles y colaboradores¹; Haaker *et al.*, 1992), nutricionales (Winstead, 1995), de carácter neoplásico (Cheng, 1993; Pauley, 1969) o bien de naturaleza desconocida (Cheng, *ibidem*).

Las enfermedades infecciosas son otro factor de gran importancia en el descenso de la población, pues tienen mayor impacto que las no infecciosas; sin embargo, en la mayoría de los casos se desconoce la etiología y por consiguiente las medidas de prevención y control. Dada la frecuencia creciente de este tipo de enfermedades en abulón, se han intensificado los estudios patológicos al respecto. Las investigaciones más relevantes indican que los moluscos son infectados por una gran cantidad de procariotas, principalmente bacterias gram-negativas y positivas, rickettsias, clamidias, micoplasmas (Perkins, 1993), así como una amplia variedad de protozoarios (Lauckner, 1980; Perkins, 1993) y metazoarios (Lauckner, 1980). Sin duda, se requiere de una larga trayectoria en la investigación para conocer adecuadamente la presencia y magnitud de las enfermedades infecciosas y su efecto en el crecimiento, reproducción y, en general, los procesos vitales de los hospederos.

En este sentido, algunas enfermedades de origen desconocido han causado algunos casos de mortalidad que van desde pequeños porcentajes de una población hasta mortalidad en masa (Haaker *et al.*, 1992; Davis, 1993; Lafferty y Kuris, 1993). La población de abulón negro *Haliotis cracherodii* sufrió serios daños a causa del denominado síndrome de deterioro o de deshidratación, el cual causó uno de

¹ Valles, R. H.; O. Tapia V. y C. E. Coterio A. Efecto del diesel en las branquias del abulón azul *Haliotis fulgens* y abulón amarillo *H. corrugata*. SEMARNAP. Instituto Nacional de la Pesca. Centro Regional de Investigación Pesquera de Ensenada, B.C. Informe interno. 1990.

los mayores daños a la pesquería del sur de California durante el año de 1988, alcanzando una mortalidad superior al 90% (Haaker *et al.*, 1992; Davis, 1993; Lafferty y Kuris, 1993).

No se han reportado daños de tal magnitud en Baja California. Según Caballero y García², el efecto de esta enfermedad durante 1992 sobre el abulón chino *Haliotis sorenseni* fue del 0.3%; sin embargo, esta cifra se ha incrementado año con año y ha afectado a especies de abulón rojo, negro, amarillo y azul (Caballero, Com. Pers.).

El síndrome de deterioro aparece como incapacidad de los abulones para sostenerse adecuadamente de las rocas del sustrato, pérdida de la pigmentación oral y de los tentáculos cefálicos, debilidad general, pérdida de la respuesta a los estímulos del ambiente y una marcada atrofia del músculo del pie y en general de la masa visceral. Como consecuencia de esto los abulones afectados finalmente mueren, ya sea por la enfermedad o por una mayor susceptibilidad a la depredación (Fig. 1).

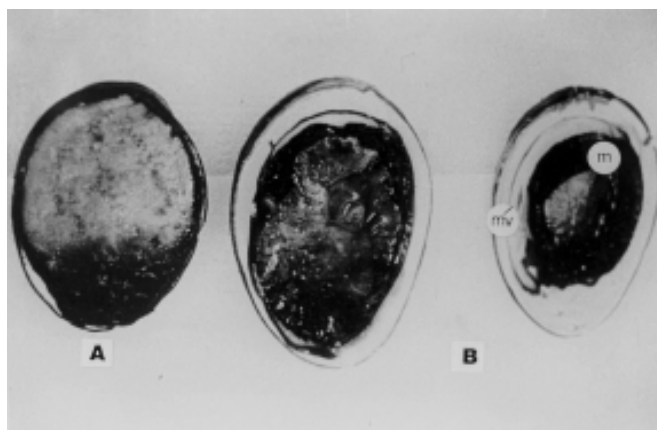


Fig. 1. A. Abulón negro sano. B. Abulón afectado por el síndrome de deterioro. Nótese la atrofia extrema del músculo (m) y de la masa visceral (mv). (Cortesía de Daniel Romero, S.C.P.P. Pescadores Nacionales de Abulón)

Debido a la presencia creciente de este síndrome en Baja California, ha surgido un gran interés de los pescadores que capturan estos moluscos, así como de autoridades y de investigadores por conocer tanto la etiología como la patogénesis y el desarrollo de esta enfermedad.

De esta forma y a petición de algunas cooperativas de pescadores, el Centro Regional de Investigación Pesquera (CRIP) de Ensenada ha dado inicio a una serie de trabajos en esta área, de la cual esta investigación constituye una primera parte que cuyo propósito ha sido determinar la condición histológica del abulón negro *Haliotis cracherodii* afectado por el síndrome de deterioro en la localidad de Los Morros en Baja California Sur, que después se complementará

con fases posteriores para determinar la patogénesis y el curso clínico de esta enfermedad en las diferentes especies de abulón.

Antecedentes

Generalmente, el estudio de las enfermedades de invertebrados marinos se lleva a cabo casi exclusivamente cuando éstas afectan a especies de importancia comercial. El síndrome de deterioro produjo una de las mayores mortandades de abulón negro en California, EUA, de tal forma que produjo prácticamente al colapso de esta pesquería. A partir de este fenómeno, diversas instituciones iniciaron estudios para tratar de identificar al agente causal y proponer soluciones a este problema.

De este modo, Steinbeck *et al.* (1992) realizaron importantes estudios en poblaciones de abulón negro *Haliotis cracherodii* de la ensenada del Diablo, en San Luís Obispo, California. En esta región la mortalidad del abulón aumenta a medida que asciende la temperatura por influencia de una planta termoeléctrica que vierte sus aguas en la bahía. Estos investigadores observaron infecciones renales causadas por la presencia de protozoarios parásitos tipo coccidios; sin embargo, no se estableció el papel que éstos pudieran tener en la patogénesis.

Haaker *et al.* (1992) en sus estudios de las Islas Channel en California determinaron que los plaguicidas, la presencia de metales pesados o el alimento no son los responsables directos del síndrome de deterioro.

Lafferty y Kuris (1993) afirman que el síndrome de deterioro se produce por un agente infeccioso que se expande lentamente desde el sur de la isla Santa Cruz, pero no identificaron al agente infeccioso.

Vanblaricom *et al.* (1993) observaron protozoarios suctorios en branquias y protozoarios tipo gregarinas en branquias, músculo, riñón y tracto digestivo en abulones sanos y enfermos. En dos abulones afectados por el síndrome detectaron parásitos tipo rickettsiales en el epitelio del tracto digestivo, el cual presentó una hipertrofia en las células afectadas.

Valles³ realizó estudios de abulón chino *Haliotis sorenseni* en Baja California, observó coccidios en riñones y protozoarios tipo gregarinas en las branquias, y concluyó que estos parásitos no son los responsables del síndrome de deterioro; sin embargo, sugiere como posibles agentes a algún tipo de bacteria o virus.

Las investigaciones más recientes indican que procariotas tipo rickettsiales se encuentran fuertemente relacionadas con esta enfermedad, infectan de manera importante al epitelio del tracto digestivo y a las células secretoras de enzimas del hepatopáncreas, produciendo pérdida de los gránulos enzimáticos y una metaplasia a las células enzimáticas. Gardner *et al.* (1995) consideran que esta falta de enzimas podría causar la atrofia muscular y en general los signos del síndrome de deterioro.

Métodos y materiales

Las muestras se obtuvieron de las capturas de la Sociedad Cooperativa de Producción Pesquera "Bahía Tortugas", S.C.L. en la localidad de Los Morros, situada a 27°30'20" LN y 114° 52'35" LO, como se muestra en la figura 2.

Se capturaron 15 abulones afectados por el síndrome de deterioro en marzo de 1992 y otros 12 en abril del mismo año. En todos los muestreos se anotaron datos sobre peso total, peso de la concha, peso eviscerado, peso del callo y longitud de la concha. Así mismo, se

² Caballero, A. F. y A. R. García, J. Informe preliminar de la comisión conferida a la bahía del Rosario, B.C. para determinar las posibles causas del comportamiento irregular de abulones en localidades adyacentes a la punta de San Antonio. INP. SEMARNAP. Centro Regional de Investigación Pesquera de Ensenada, B.C. Informe Técnico Interno 1992.

³ Valles, R. H. Síndrome de deterioro en poblaciones de abulón chino *Haliotis sorenseni*, colectados en puntos situados entre Punta Baja y Punta San Antonio, B.C., México. INP. SEMARNAP. Centro Regional de Investigación Pesquera de Ensenada, B.C., México. Informe Interno. 1993.



Fig. 2. Mapa que muestra el área de estudio

determinó macroscópicamente el sexo y la madurez sexual de los abulones. Los especímenes se colocaron en formalina buffer al 10% para su preservación y se enviaron al CRIP de Ensenada para su análisis histopatológico.

Los abulones se lavaron en agua corriente para eliminar el exceso de fijador y se realizó una disección para obtener muestras de branquia, glándula hipobranquial, intestino y músculo pedal. Posteriormente se colocó la masa visceral en un congelador para obtener una consistencia más sólida que permitió tomar muestras seriadas, sin dañar la arquitectura normal de los tejidos. De esta forma se realizaron cortes seriados para analizar en sus diferentes regiones, las glándulas salivales, esófago, estómago, parte del intestino, aparato excretor, hepatopáncreas y gónada.

Para el desarrollo de la técnica histológica, las muestras se deshidrataron con alcohol etílico, se incluyeron en ameraffin y se obtuvieron cortes de 5 a 7 micras. Durante la tinción se aplicó la técnica topográfica Hematoxilina-Eosina y la técnica especial para fibras colágenas Tricrómica de Masson (Humason, 1967). Por otro lado, se tomó una pequeña pieza de hepatopáncreas y bulbo esofágico que fue utilizada para preparar una serie de frotis que se tiñeron con el método de Giménez (Bartholomew, 1973) para corroborar la presencia de parásitos tipo rickettsiales.

Se determinaron tres grados de lesión, de acuerdo con el número de colonias de parásitos tipo rickettsiales que se observaron en un campo microscópico de esófago, estómago, intestino y hepatopáncreas. Según este criterio, se clasificó como lesión leve el estado en el cual se hubiesen presentado menos de diez colonias de parásitos por campo, lesión moderada cuando el número de colonias fluctuó entre diez y cien, y lesión avanzada cuando éstas excedían de cien.

Resultados

El análisis histopatológico del abulón negro *Haliotis cracherodii* afectado por el síndrome de deterioro mostró, básicamente, todos los abulones se encontraron infectados por parásitos intracitoplásmicos

tipo rickettsiales, distribuidos en el epitelio del aparato digestivo, sobre todo en esófago, estómago, intestino y epitelio cilíndrico de los conductos del hepatopáncreas. Por otro lado, protozoarios parásitos clasificados tentativamente como del tipo gregarinas se evidenciaron de manera importante en senos venosos de branquias y en los vasos de riñón, hepatopáncreas o en los vasos periféricos del tubo digestivo, lo que indica su diseminación por la hemolinfa.

La tabla 1 sintetiza la presencia de estos parásitos e incluye en general todas las alteraciones encontradas, algunas con frecuencia sumamente baja que sólo afectaron a uno de 27 abulones.

Atrofia

Sin duda, la característica más evidente del síndrome de deterioro es la atrofia de la masa muscular y visceral. La atrofia se define como una disminución del tamaño celular por pérdida de biomasa (Cotran *et al.*, 1990) que provoca una disminución general del órgano en cuestión. Este fenómeno patológico-adaptativo minimiza el metabolismo celular de tal forma que la energía disponible se utilice para la supervivencia del individuo. Cuando esta medida excede los límites se daña de manera importante a las células y se las puede conducir a la muerte. La atrofia puede ser causada por factores tales como una disminución del funcionamiento del órgano, disminución del flujo de la hemolinfa, pérdida de la innervación y nutrición deficiente o inadecuada del individuo (Cotran *et al.*, 1990).

Análisis histológico del pie

El pie es una estructura muscular que constituye el órgano locomotor y de sostén del abulón. Se considera que el músculo del pie es de tipo liso y, más estrictamente, según Chantler (1983), se clasifica como músculo liso con paramiosina, molécula característica de varios grupos de invertebrados que se manifiesta como el componente muscular principal con una relación paramiosina:miosina de 10:1.

Las fibras musculares de abulones sanos se disponen en paquetes compactos que se orientan en sentido longitudinal, transversal y sagital, todas ellas delimitadas por fibras de tejido conectivo (Fig. 3). A lo largo del pie se distribuyen senos venosos, células y fibras de tejido conectivo y nervios. Periféricamente está delimitado por

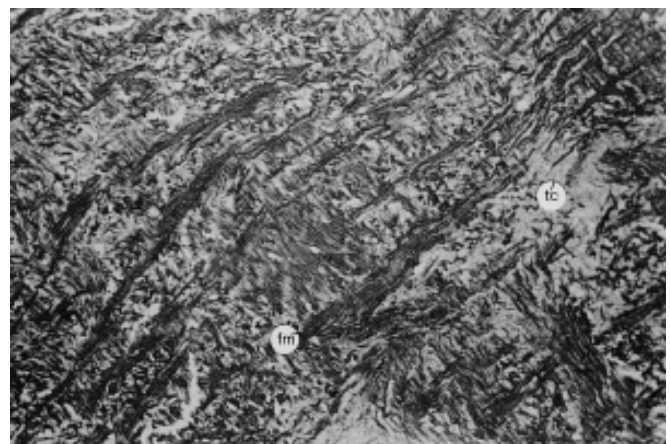


Fig. 3. Sección de músculo de un individuo normal. Las fibras musculares (fm) se disponen longitudinal, sagital y transversalmente. El tejido conectivo (tc) se encuentra distribuido entre el músculo (Téc. H-E. X 28)

un epitelio cilíndrico con numerosas células con gránulos de secreción mucosa.

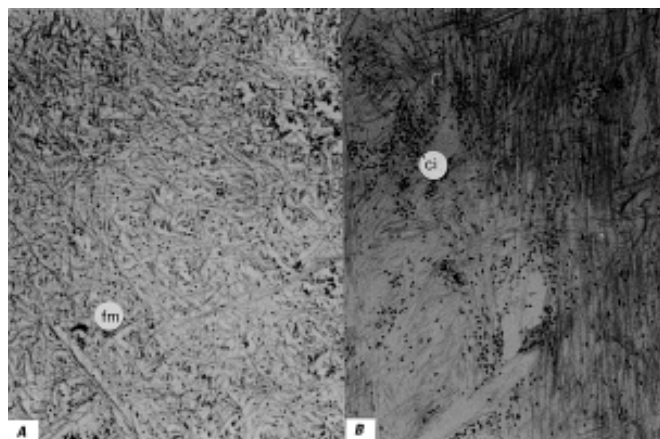


Fig. 4. Músculo de abulón afectado por el síndrome de deterioro. A) Las fibras musculares (fm) han experimentado atrofia considerable, con una notable pérdida de la organización (Téc. H-E. X 28). B) Cúmulos de células inflamatorias (ci) entre los paquetes musculares (Téc.H-E. X28).

Los abulones afectados por el síndrome de deterioro muestran microscópicamente una atrofia evidente de las fibras musculares, es decir, disminuyen considerablemente su tamaño en todos los planos (Fig. 4A) y muestran una desorganización importante de los paquetes musculares, con proliferación hemocitaria notable en algunos abulones (Fig. 4B). Estas células tipo leucocitos predominan a lo largo de la masa muscular o se distribuyen en grupos densos. El epitelio del pie no mostró daño aparente.

Aparato digestivo

La *tabla 1* muestra que todos los abulones presentaron infección intracelular de procariotas tipo rickettsiales en esófago, estómago e intestino, extendiéndose en un 70.7% a los conductos del epitelio cilíndrico del hepatopáncreas. Esta parasitosis no es viable en el epitelio de las bolsas esofágicas ni glándulas salivales y es muy limitada en las regiones del estómago, donde existe una cutícula en el epitelio. De la misma forma, no son frecuentes en la porción posterior del intestino, donde predominan diversos tipos de células mucosas. Su ausencia en estos tejidos se debe a que este tipo de epitelio podría desarrollar actividades metabólicas no benéficas para las necesidades nutricionales de los rickettsiales.

Histológicamente, las células infectadas se destacaron por poseer inclusiones basófilas delimitadas por una vacuola, en colonias de microorganismos que utilizan la maquinaria metabólica de la célula huésped para desarrollarse y dividirse. Esta dependencia metabólica las incapacita definitivamente para sobrevivir en un ambiente extracelular.

Los parásitos se identificaron a través de las características morfológicas y de pigmentación de las colonias observadas en cortes histológicos convencionales. Estos análisis se corroboraron con el método de Giménez aplicado a rickettsias (Bartholomew, 1973). Para tal efecto, se realizaron frotis de hepatopáncreas y bulbo esofágico y se encontraron colonias de rickettsiales que se tiñen selectivamente de rojo sobre un fondo azul-verdoso. Sin embargo, se requieren mé-

todos más fidedignos para evaluar adecuadamente si estos microorganismos tienen algún vínculo taxonómico con las rickettsias que afectan al hombre y se necesita, por tanto, desarrollar la metodología para aislarlas en el laboratorio y esclarecer su ciclo de vida.

Morfología de las colonias de rickettsiales

Al inicio de la infección se observan pequeñas inclusiones citoplásmicas de tipo basófilo en las células epiteliales del tracto digestivo (Fig. 5) que aumentan de tamaño a medida que los microorganismos se dividen dentro del citoplasma celular.

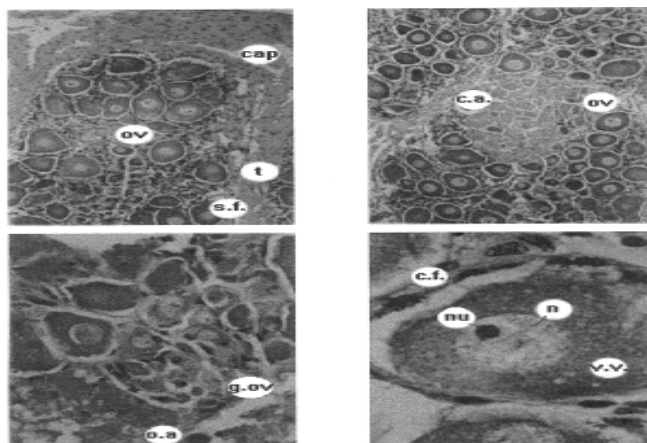


Fig 5. Sección del tracto digestivo que muestra pequeñas inclusiones citoplásmicas que representan una colonia de parásitos tipo rickettsiales (cr) en el inicio de la infección (Téc. H-E. X 280).

En el desarrollo posterior las colonias adquieren una forma cilíndrica con apariencia basófila pero de menor intensidad que las colonias más evolucionadas. En este estado se observan al microscopio como cúmulos laxos granulares que gradualmente se compactan y adquieren una basofilia más intensa (Fig. 6). Las observaciones, en general, indican que el grado de atrofia de las vísceras es menos intenso, especialmente en la gónada, que muestra abundantes ovocitos

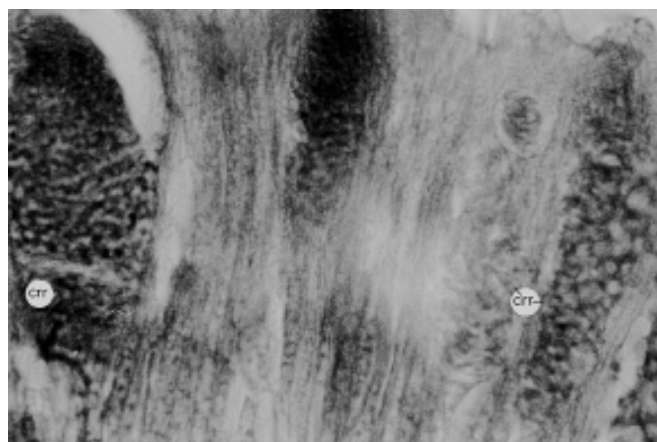


Fig. 6. Sección transversal del tracto digestivo que muestra colonias de aspecto reticular (crr). A medida que los microorganismos se multiplican la colonia adquiere mayor densidad y basofilia en la región apical (Téc. H-E. X 280).

en diferentes estados de maduración, lo cual indica que los abulones aún mantienen sus funciones básicas de reproducción.

A medida que los microorganismos se dividen las colonias adquieren una forma más alargada y basófila y se adaptan inicialmente al tamaño y forma de la célula huésped. Frecuentemente las colonias se localizan entonces en la región apical del epitelio y provocan un desplazamiento de los organelos celulares hacia la región basal. La respuesta defensiva del abulón ante la presencia de los parásitos tipo rickettsiales no es muy evidente; sin embargo, las células afectadas se hipertrofian, se hinchan de notablemente por la presencia y reproducción de los parásitos y provocan cierta presión a las células adyacentes (Fig. 7).

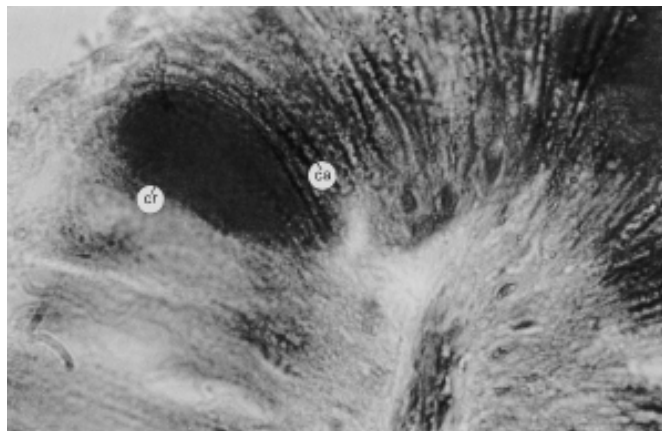


Fig. 7. Sección del tracto digestivo que muestra cómo las células se hipertrofian a medida que crece la colonia de rickettsiales (cr), la cual ocupa la mayor parte del citoplasma y oprime a las células adyacentes (ca) (Téc. H-E. X 280).

Las colonias se caracterizan por su forma más ancha en la región apical de la célula huésped. En algunos casos muestran septos bien definidos que las dividen en 2, 3 o 4 regiones (Fig. 8). Típicamente, hay mayor concentración de microorganismos en la región apical de las colonias, razón por la cual en estas zonas aumenta la densidad y la



Fig. 8. Fotomicrografía que muestra una colonia de parásitos tipo rickettsiales (cr) dividida por septos (s). Obsérvese la mayor basofilia en la región apical de las colonias y el citoplasma desplazado a la base de las células (Téc. H-E. X 280).



Fig. 9. Representación de una infección severa por parásitos tipo rickettsiales. Una colonia muestra un septo (s) y en todas se aprecian áreas claras (ac) con ausencia de microorganismos en esa región (Téc. H-E. X 280).

basofilia. Otras colonias adquieren en la región media o basal un área redonda de aspecto claro y bien delimitado que indica ausencia de microorganismos en esta región (Fig. 9). Generalmente se observa un área de este tipo en cada colonia, pero en algunos casos se han presentado dos o más y pueden ser pequeñas o constituir 1/3 o 1/2 del tamaño de las colonias.

Respuesta inflamatoria

Se observaron cúmulos inusuales de células inflamatorias en la lámina propia del esófago (14.8%), estómago (7.4%) e intestino (3.7%) (Fig. 10). Los procesos de inflamación son una respuesta inespecífica del tejido conectivo vascular a una lesión y, por tanto, son resultado de una gran variedad de causas que, desde luego, incluyen respuesta a los parásitos. Sin embargo, los resultados de este trabajo indican que la respuesta inflamatoria no se relaciona en todos los casos con los rickettsiales. Algunas lesiones severas no mostraron una reacción inflamatoria evidente, mientras que ciertos casos con poca o ninguna infección mostraron una evidente hemocitosis.

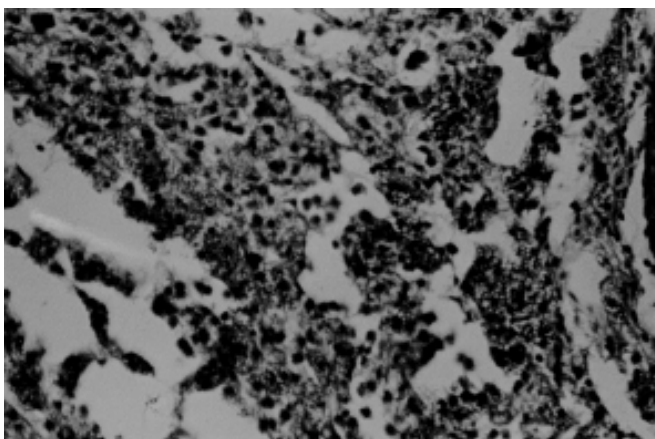


Fig. 10. Cúmulos de células inflamatorias en la lámina propia del tubo digestivo. A la derecha se observa parte del epitelio del esófago (Téc. H-E. X 136).

Grados de lesión por rickettsiales

Tomando como criterio la intensidad de las colonias observadas en cortes transversales del tracto digestivo en esófago, estómago, intestino y los conductos del hepatopáncreas, se han establecido tres niveles generales de infección: leve, moderada y avanzada.

Lesión leve

Consiste de focos mínimos de infección donde ocasionalmente se observan colonias de parásitos tipo rickettsiales (menos de diez por campo) en esófago, estómago o intestino. En este caso las colonias son pequeñas, muestran una ligera basofilia y adquieren una apariencia granular y muy laxa. La atrofia de la gónada es mínima (Fig. 11A).

Lesión moderada

En ésta se presenta un mayor número de colonias (10-100) que se distribuyen a lo largo del tubo digestivo y afectan ligeramente a los conductos del hepatopáncreas. Las células del tracto digestivo adquieren una coloración más basófila y la gónada presenta un grado de atrofia mayor.

Lesión avanzada

En este caso las colonias de rickettsiales han invadido a la mayoría de las células observadas en un campo histológico (más de 100 colonias), tanto del tubo digestivo como de los conductos del hepatopáncreas. El epitelio es más basófilo y se encuentra alterada su morfología natural debido a la expansión de las células afectadas (Fig. 11B). Frecuentemente se observan células epiteliales rotas en el ápice, permitiendo la liberación de las colonias a la luz del tracto digestivo. Estas células, que a simple vista se parecen a las células caliciformes (Fig. 12), han sido llamadas células fantasma por Buchanan (1978). La luz del órgano muestra gran cantidad de colo-

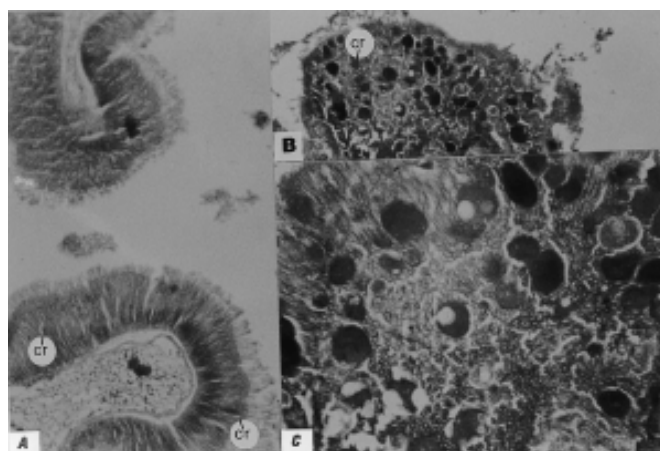


Fig. 11. Grados de lesión. A) Sección transversal del tracto digestivo que muestra una infección leve. Se observan pocas y pequeñas colonias de rickettsiales (cr) con una leve basofilia (Téc. H-E. X 28). B) Sección sagital del epitelio del esófago con una infección severa. Obsérvese la abundancia de colonias de rickettsiales que adquieren una basofilia muy intensa (Téc. H-E. X 28). C) Ampliación de B (Téc. H-E X 280).

nias libres que se mezclan con parte del contenido alimenticio y que teóricamente podrían ser expulsadas del individuo permitiendo la infección de otros parásitos (Fig. 13).

Generalmente, en este tipo de lesión las gónadas muestran una atrofia muy importante que en la mayoría de los casos carece de ovocitos o espermatozoides (Fig 15).

Rickettsiales y atrofia del hepatopáncreas

El hepatopáncreas está formado por una serie de túbulos de terminación ciega que se conectan con el estómago a través de conductos ramificados, para verter los proconductos enzimáticos. Los túbulos están conformados por dos tipos celulares: células beta, de la cripta, piramidales, con características de pigmentación consistentes y células *alfa*, secretoras de enzimas, formadas por epitelio cilíndrico con una serie de gránulos citoplásmicos de carácter digestivo (Fig. 14). Por su parte, los conductos que comunican con el estómago están formados por un epitelio cilíndrico ciliado.

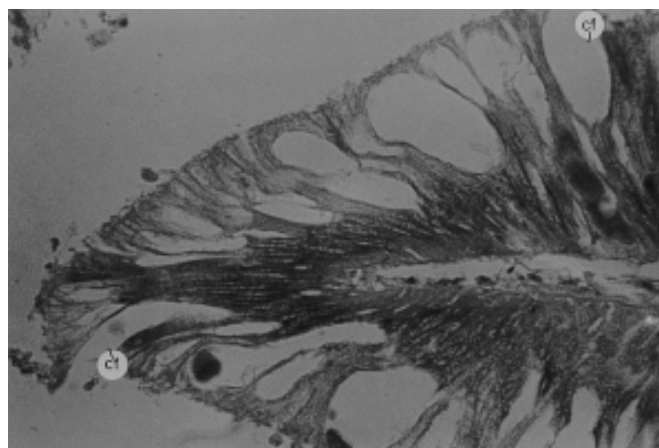


Fig.12. Fotomicrografía que muestra células fantasma (cf), formadas por espacios libres, producto de la liberación de las colonias de rickettsiales (Téc. H-E. X 280).

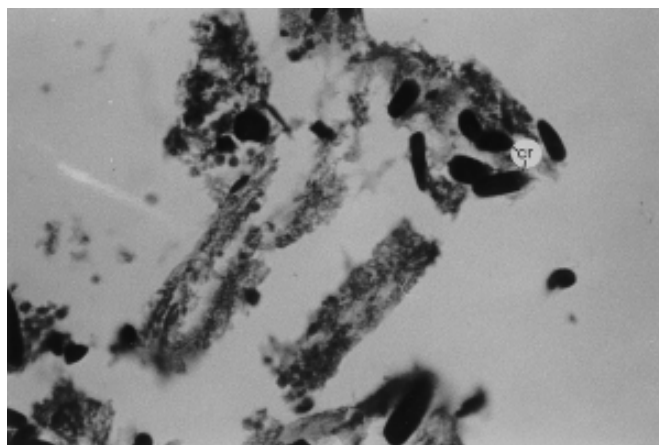


Fig.13. Grupo de colonias de parásitos tipo rickettsiales (cr) libres en el lumen del tracto digestivo (Téc. H-E. X 126).

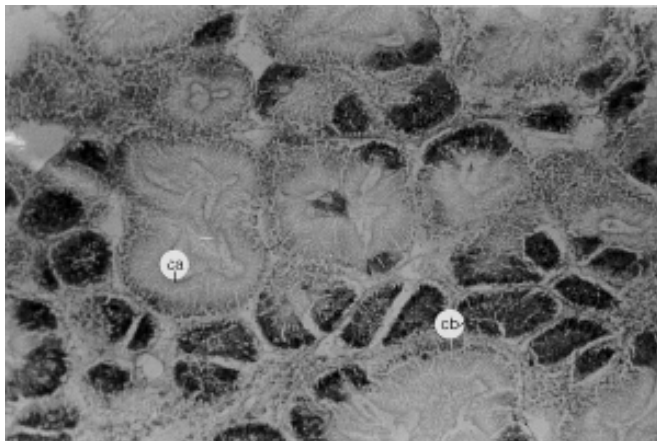


Fig.14. Sección transversal del hepatopáncreas de un abulón normal. Los túbulos están constituidos por células beta (cb) de apariencia basófila y células alfa (ca) (Téc. H-E. X 126).

Como se ha mencionado, el hepatopáncreas es blanco de las colonias de rickettsiales, que prefieren de manera especial los conductos de este órgano. Los túbulos compuestos por las células alfa y beta en ningún caso fueron afectados por la rickettsiosis. Sin embargo, según la *tabla 1*, el 55.5% de los abulones mostraron atrofia de túbulos (Figs.15 y 16) y conductos de este órgano (Figs. 17 y 18), probablemente como respuesta a periodos prolongados de inanición, causada quizá por la fuerte infección rickettsial del tubo digestivo.

La atrofia se manifiesta como una reducción importante del tamaño de las células alfa y beta (Fig. 16). Las primeras contienen ocasionalmente gránulos citoplásmicos semejante a los que presentan los macrófagos y se ha considerado que corresponden a partículas de difícil digestión.

Como es de esperarse, la luz del túbulo se incrementa en función del grado de atrofia de las células. El interior de las estructuras generalmente se encuentra lleno de material amorfo, restos de células y otras partículas sometidas a digestión enzimática. La atrofia puede

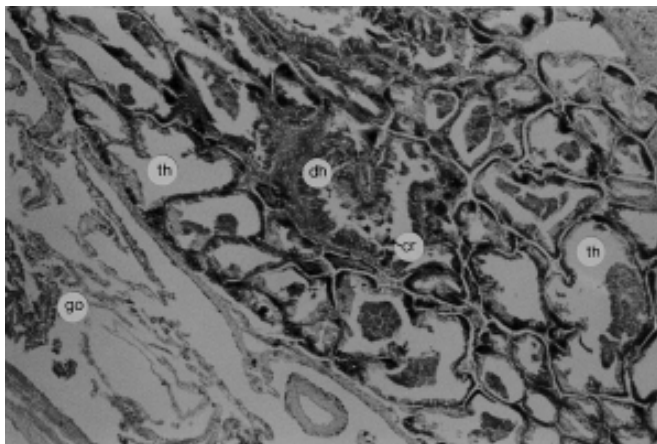


Fig.15. Vista panorámica del hepatopáncreas afectado por el síndrome de deterioro. A la izquierda se observa la gónada (go) con ausencia evidente de células gaméticas. Al centro un conducto (dh) infectado por colonias de rickettsiales (cr), algunas de las cuales se han liberado y se encuentran en el lumen. En los túbulos (th) se advierte un notable aumento de la luz y disminución del tamaño celular indicando un fenómeno de atrofia (Téc. H-E. X 28).

progresar a grados extremos en los que las células alfa y beta prácticamente son irreconocibles y se observan como un epitelio escamoso que descansa sobre fibras de tejido conectivo. Diversos grados de atrofia se pueden observar en un solo individuo, en los cuales también es posible identificar túbulos totalmente normales.

La atrofia del hepatopáncreas se extiende de manera importante a los conductos que conectan con el estómago. En este caso el epitelio cilíndrico se atrofia en tal magnitud que da la apariencia de un epitelio cúbico o plano (Fig. 18) y, en término generales, es muy semejante a la atrofia de los túbulos; sin embargo, en este caso la luz es considerablemente mayor.

Alteraciones del esófago

Los resultados de este trabajo indican que sólo la región posterior del esófago es susceptible de infección por parásitos tipo rickettsiales y que la células afectadas presentan un aumento ligero en la basofilia,

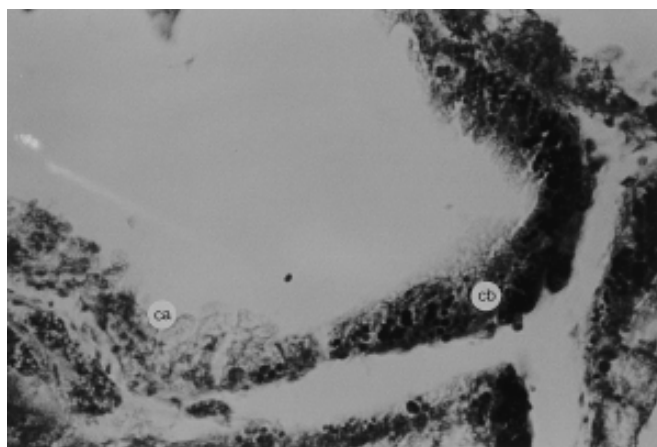


Fig.16. Ampliación de los túbulos del hepatopáncreas con atrofia. Obsérvese las células beta (cb) y células alfa (ca) con disminución evidente del tamaño celular y presencia de gránulos oscuros en las primeras (Téc. H-E. X 280).

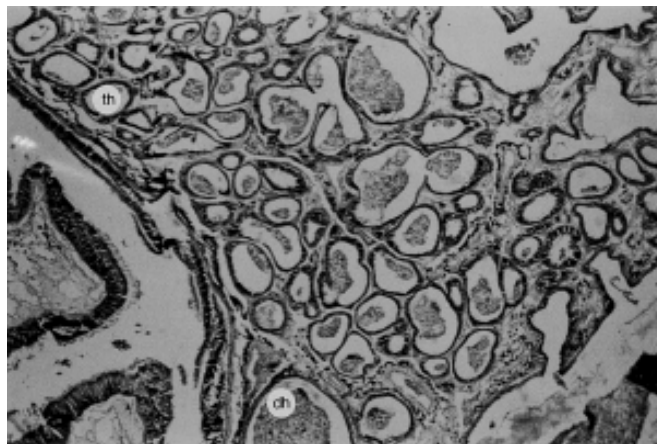


Fig. 17. Corte transversal del hepatopáncreas con una atrofia severa de túbulos (th) y conductos (dh). En los primeros el epitelio adquiere una forma cúbica y los conductos se caracterizan por su mayor tamaño y por su epitelio cúbico o escamoso. Hay aumento notable de tejido conjuntivo entre los túbulos (Téc. H-E. X. 28).

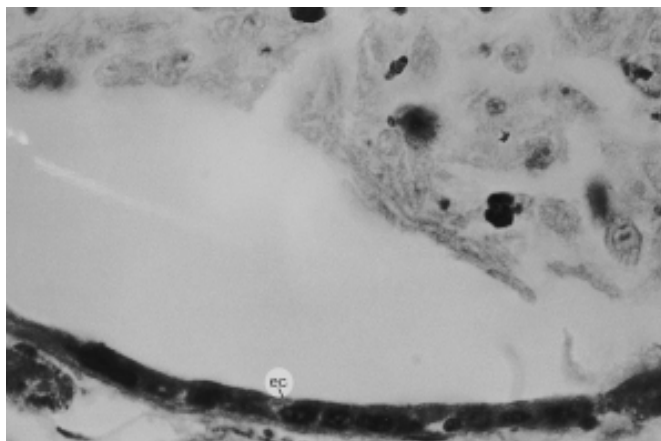


Fig.18. Amplificación de un conducto del hepatopáncreas con atrofia severa. Obsérvese cómo el epitelio cilíndrico ha disminuido su tamaño hasta adquirir la forma de un epitelio cúbico (ec) (Téc. H-E. X 500).

con poca o ninguna reacción hacia el parásito por parte del hospedero. La región más anterior está formada por numerosas y pequeñas proyecciones digitiformes que conforman las llamadas bolsas esofágicas. Éstas, probablemente por su alto contenido de células mucosas, no fueron infectadas por rickettsiales. Sin embargo, tres abulones de 27 (11.1%) estuvieron fuertemente afectados por pequeñas inclusiones citoplásmicas que se tiñeron de negro con la técnica H-E (Fig. 19). Se desconoce la naturaleza de estas partículas y se especula que probablemente tengan relación con algún tipo de contaminante que llegó al ambiente del abulón. Se observó una ligera infiltración hemocitaria como respuesta a la presencia de estas partículas y, en general, se ha considerado que por su baja incidencia no se relaciona con el síndrome de deterioro.

Proliferación de células mucosas

Una de las primeras defensas del abulón, y de los moluscos en general, es la producción de moco que le permite atrapar partículas extrañas e impide que éstas lesionen tejidos importantes en la economía

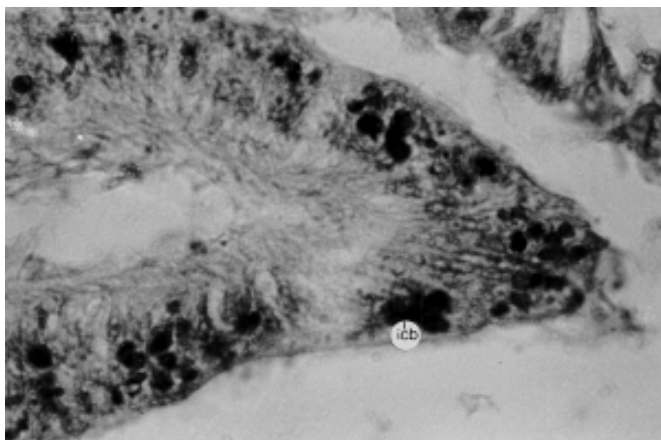


Fig.19. Epitelio de las bolsas esofágicas con numerosas inclusiones celulares (icb) extremadamente basófilas, de naturaleza desconocida (Téc. H-E. X 280).

del individuo. En ocasiones, cuando el individuo se expone a algún contaminante o estresor, sobreviene como mecanismo de defensa la proliferación importante de este tipo celular, que intensifica su producción de moco y se protege del agresor.

Las branquias de un individuo afectado por el síndrome de deterioro presentaron una proliferación de células mucosas en el ápice de las lamelas. Estas células sustituyeron al epitelio cúbico y cilíndrico normal de esta región por abundantes células productoras de moco, lo cual altera las funciones normales del epitelio respiratorio (Fig. 20).

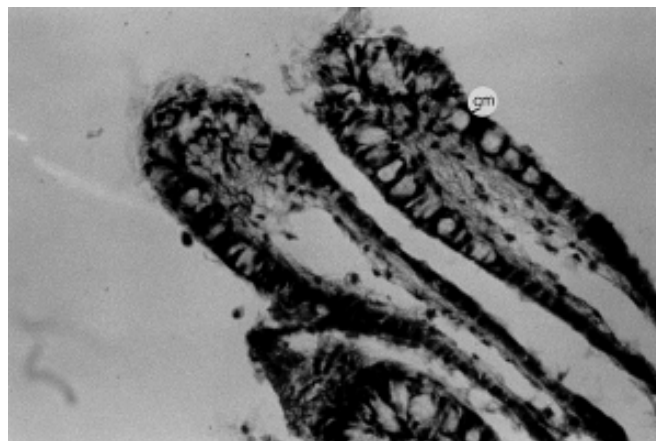


Fig. 20. Fotomicrografía de las lamelas de un individuo afectado por el síndrome de deterioro. En el ápice se observa una proliferación de células productoras de moco (cm) (Téc. H-E. X 126).

Un fenómeno semejante se presentó en el órgano excretor. En este caso el epitelio cúbico que delimita al riñón presentó una metaplasia de células mucosas e hipertrofia (Fig. 21) que se extendió a muchas regiones del riñón, mostrando en algunos casos una sustitución extrema de este tipo celular. Este individuo en particular presentó una rickettsiosis muy leve en el tubo digestivo y en los conductos del hepatopáncreas.

Protozoarios tipo gregarinas

Durante este trabajo solamente se analizaron las branquias de ocho abulones, siete de los cuales estuvieron infectados por parásitos que, de acuerdo con sus características morfológicas se colocaron

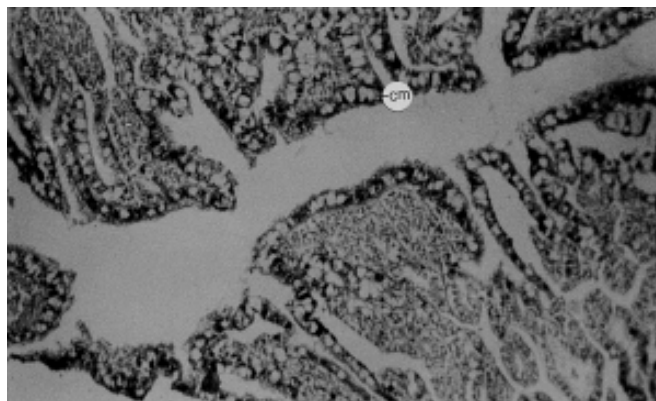


Fig. 21. Vista panorámica del riñón, en el que se aprecia una metaplasia de células mucosas (cm) con hipertrofia concomitante (Téc. H-E. X 28).

tentativamente como protozoarios del tipo de las gregarinas. Sin embargo, la presencia de estos parásitos no se limitó a las branquias sino que afectaron el riñón de dos abulones y la lámina propia del intestino de otro. En suma, 10 de 27 abulones (30%) fueron afectados por este tipo de parásitos.

Los protozoarios se localizaron en todos los casos en los senos venosos de los órganos mencionados, lo cual sugiere que la vía de diseminación es por hemolinfa, razón por la cual afecta a muchos órganos.

Estos parásitos se caracterizan por su forma alargada y cilíndrica, con una ligera curvatura en su región central, y el análisis detallado indica que se encuentran protegidos dentro de una cápsula transparente. El cuerpo está dividido en dos compartimentos por un septo ectoplásmico. El más pequeño constituye el protomerito y el mayor el deutomerito. En este último es posible observar una estructura semejante al núcleo (Fig. 22). En algunas ocasiones se observan grupos de dos o más parásitos, en los cuales unos muestran preferencia por los colorantes ácidos y otros por colorantes básicos. El tejido branquial y renal no mostró daño aparente por la presencia de estos protozoos; sin embargo, en la lámina propia del tubo digestivo se observó una acumulación de hemocitos (Fig. 23). Sin duda, se requiere un mayor análisis para clasificar estos parásitos y su posible influencia en la salud de los hospederos.

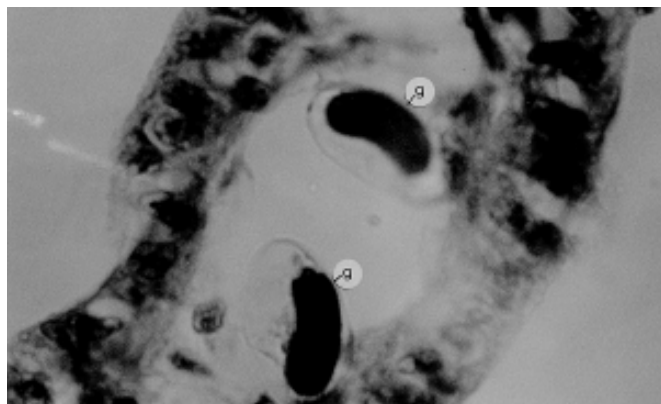


Fig. 22. Lamela branquial en la que se muestran dos parásitos tipo gregarinas (g) en los senos hemales. Los protozoarios tienen forma alargada y están protegidos por una cápsula hialina (Téc. H-E. X 500).

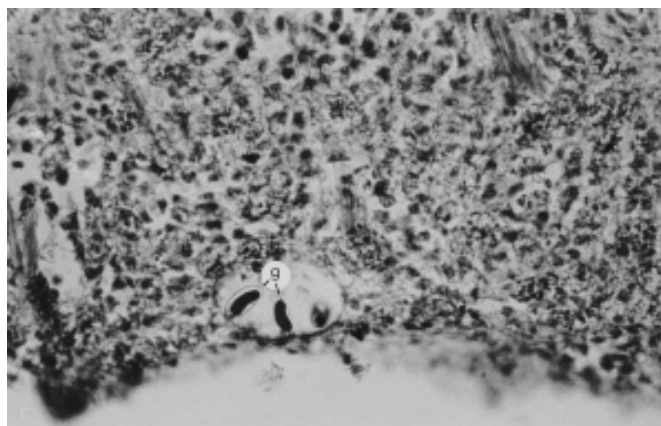


Fig. 23. Sección de la lámina propia del estómago en el que se aprecian tres parásitos tipo gregarinas (g) en un seno hemal. En la región superior hay acúmulo de células inflamatorias (Téc. H-E. X 125).

Discusión

Los resultados de esta investigación indican que existe una relación importante entre el síndrome de deterioro y parásitos tipo rickettsiales como posibles factores etiológicos. Como se muestra en la *tabla 1*, todos los abulones enfermos adquirieron una infección por estos microorganismos en el tubo digestivo, que se extendió en 70.4% a los conductos del hepatopáncreas. Esta alteración epitelial incapacita a los abulones para realizar adecuadamente sus procesos digestivos y, por consiguiente, la adquisición de energía se ve seriamente afectada. Este fenómeno no sólo es producto del daño epitelial del tubo digestivo, sino que también es producto de fallas en la elaboración y conducción de enzimas que provienen del hepatopáncreas, el cual manifestó atrofia de los túbulos y conductos e infección rickettsial en los conductos.

La presencia de parásitos tipo rickettsiales se ha reportado en una gran cantidad de invertebrados marinos, como el caracol *Bithynia siamensis goniomphalus* (Adam *et al.*, 1994); la almeja *Tellina tenuis* (Buchanan, 1978), *Siliqua patula* (Elston y Peacock, 1984), *Tapes japonica* y *Patinopecten yessoensis* (Elston, 1986), *Hippopus hippopus* (Norton *et al.*, 1993), *Mya arenaria* (Fries *et al.*, 1991), *Meretrix lusoria* (Wen *et al.*, 1994), y *Placopecten magellanicus* (Gulka y Chang, 1983); camarón *Penaeus marginatus* (Brock *et al.*, 1986); el ostión *Crassostrea gigas* (Renault y Cochenne, 1994); cangrejo *Carcinus mediterraneus* (Bonami y Pappalardo, 1980), *Paralithodes platypus* (Johnson, 1984); y mejillón *Mytilus edulis* (Gulka y Chang, 1984). En la mayoría de los casos las infecciones se limitan a las regiones branquiales o al hepatopáncreas.

En este estudio, la identificación de los microorganismos se llevó a cabo únicamente por las características morfológicas de las colonias y por su afinidad a los colorantes utilizados para las rickettsias que infectan al hombre. En este caso, el método de Giménez (Bartolomew, 1973) resultó útil en el diagnóstico y de este modo se comprobaron las observaciones del análisis histológico.

Diversos autores han realizado análisis de microscopía electrónica de este tipo de colonias y han informado que están formadas por cúmulos de microorganismos alargados, ligeramente curvados o esféricos, con diámetro aproximado de 1,800 nm de longitud por 265 nm de diámetro (Gardner *et al.*, 1995). Éstos contienen una gran cantidad de ribosomas y se encuentran delimitados por una membrana plásmica y una pared celular, ambas con el característico arreglo trilaminar (Renault y Cochenne, 1994; Wen *et al.*, 1994; Gulka y Chan, 1984; Elston y Peacock, 1984; Buchanan, 1978; Perkins, 1993).

Estas características morfológicas son consistentes con las rickettsias que infectan al hombre (Davis *et al.*, 1979; Jawets *et al.*, 1966) y por su dependencia intracitoplasmática se les ha relacionado con el orden rickettsiales. Sin embargo, no existe una evidencia sólida de tipo bioquímico, serológico o infeccioso que muestre el enlace entre las rickettsias que producen enfermedad en el hombre y las que afectan a invertebrados marinos (Elston y Peacock, 1984).

En general, los intentos de aislar parásitos tipo rickettsiales y cultivarlos en el saco vitelino de embriones de pollo han tenido poco éxito. Buchanan (1978) cultivó exitosamente los parásitos encontrados en el bivalvo *Tellina tenuis*; sin embargo, los rickettsiales de *P. magellanicus* no se desarrollaron en cultivo de saco vitelino o en cultivos artificiales (Gulka y Chan, 1983). Estos estudios demuestran que es necesario intensificar la investigación para desarrollar los protocolos que permitan aislar estos microorganismos y establecer adecuadamente su posición taxonómica.

Las rickettsias son parásitos intracelulares obligados; por tanto, no son capaces de crecer en ausencia de una célula hospedera, la cual requieren para realizar las reacciones metabólicas esenciales (Burrows, 1974). Para que estos microorganismos puedan sobrevivir en la naturaleza, es necesaria la transmisión de un hospedero a otro en condiciones que disminuyen al máximo su exposición al ambiente extracelular (Davis *et al.*, 1979). La transmisión de estos microorganismos en invertebrados marinos como el abulón no se conoce y se ha especulado que podría provenir de aves marinas infectadas por piojos; sin embargo, esta hipótesis requiere ser confirmada una vez que se realicen estudios más detallados para conocer el ciclo de vida, resistencia y patogenicidad de estos procariotas. Generalmente, estos parásitos se presentan en artrópodos y no son patógenos para los vectores que los transmiten. También están bien adaptados a algunos roedores y en muchas ocasiones éstos constituyen un depósito de infección en la naturaleza (Burrows, 1974).

Las rickettsias que infectan al hombre son parásitos intracelulares obligados que prefieren para su desarrollo células de metabolismo lento. Algunas se desarrollan en el citoplasma y otras prefieren el núcleo de la célula huésped (Bryan *et al.*, 1974). En el abulón los parásitos tipo rickettsiales tienen una preferencia importante hacia las células del tracto digestivo y los conductos del hepatopáncreas. Se ha observado que no son capaces de desarrollarse en regiones del esófago e intestino que contienen gran cantidad de células mucosas, ni en el epitelio estomacal, que tiene cutícula muy desarrollada.

Las infecciones rickettsiosas en el hombre se inician en el sistema vascular tras la picadura de un artrópodo infectado y se diseminan a través de la corriente sanguínea. Las rickettsias muestran predilección por el endotelio de pequeños vasos sanguíneos en los cuales producen tumefacción y los estimula para su división. Generalmente producen una hiperplasia de células endoteliales y formación de trombos que provocan la obstrucción de la corriente sanguínea, con salida de eritrocitos al tejido circundante. Característicamente, se observa una gran cantidad de células inflamatorias que se depositan alrededor de los vasos afectados. La muerte del abulón afectado se atribuye a las lesiones del endotelio que conducen a la pérdida del plasma, disminución de volumen sanguíneo y shock (Davis *et al.*, 1979).

Este es, en general, el mecanismo por el cual las rickettsias actúan en el hospedero en mamíferos superiores. Sin embargo, en invertebrados como el abulón el modo de acción podría ser muy diferente. La forma en que el abulón adquiere la infección se desconoce totalmente. Como se ha mencionado, probablemente esté relacionada con el excremento contaminado de aves parasitadas por piojos. En este sentido, Harshbarger *et al.* (1977) sugieren que los bivalvos marinos pueden actuar como hospederos alternativos de microorganismos zoonóticos y opinan que los hospederos primarios pudieran ser pájaros estuarinos.

En tal caso, los patógenos deberán de ser capaces de sobrevivir en el medio extracelular por un tiempo no definido, que pudiera ser muy prolongado. De ser correcta esta hipótesis, y de tener un enlace taxonómico con las rickettsias que parasitan al hombre, es probable que tengan una mayor afinidad con el género *Coxiella* de la tribu Rickettsiae por su capacidad de resistencia fuera de la célula y porque presumiblemente la infección no involucra la picadura de un artrópodo vector. Se debe tomar en cuenta que los parásitos tipo *Coxiella* son capaces de permanecer vivos y virulentos durante periodos prolongados en excretas y agua. Además, son resistentes al calor y al formaldehído e infectan garrapatas, piojos, mamíferos y aves (Davis *et al.*, 1979).

La posible relación de estos microorganismos con el género *Coxiella* ha sido establecida por otros autores. Los estudios de la glándula digestiva de la almeja *Siliqua patula* afectada por parásitos tipo rickettsiales hace referencia a algunas similitudes morfológicas y de localización de estos parásitos con el género *Coxiella*, debido fundamentalmente a que ambos microorganismos crecen en vacuolas de la célula hospedera (Elston y Peacock, 1984). Otras investigaciones, realizadas en el bivalvo *Tellina tenuis*, establecen con base en evidencias morfológicas propiedades de pigmentación y características de cultivo en el saco vitelino, entre otras pruebas, que los microorganismos parásitos de la glándula digestiva presentan atributos más acordes con el género *Coxiella* de la tribu Rickettsiae de la familia Rickettsiaceae (Buchanan, 1978).

Patogenicidad de los rickettsiales

A pesar del escaso número de investigaciones relacionadas con este tema, existen ciertas controversias en cuanto a su patogenicidad. Algunas autores han informado que estos microorganismos no son capaces de producir daños de consideración al individuo hospedero (Wen *et al.*, 1994; Elston, 1986; Renault y Cheneck, 1994); sin embargo, cada día se incrementan las investigaciones que indican la posible relación de estos procariotas con casos de mortalidad que llegan a alcanzar el grado de mortalidad en masa (Gardner *et al.*, 1995). En este estudio se ha encontrado que hay una relación entre la enfermedad y la infección por rickettsiales; sin embargo, se ha especulado que una infección leve no es capaz de ocasionar la muerte de los abulones. El análisis de las muestras obtenidas para este estudio se realizó paralelamente con el examen de tres abulones colectados para estudios de ciclo reproductivo en el verano de 1973. Sorprendentemente, se observó que dos abulones estaban infectados con un limitado número de colonias de rickettsiales en los conductos del hepatopáncreas (Fig. 24). Estos abulones se consideraron saludables y no mostraron ningún signo del síndrome de deterioro o de otra enfermedad. Este análisis sugiere que las colonias de rickettsiales podrían constituir parte de la flora bacteriana normal de los abulones y que podrían actuar como oportunistas. Estas, ante ciertas condiciones ambientales adversas o ciertos grados de estrés se podrían reproducir en concentraciones altas y producir los signos del síndrome de

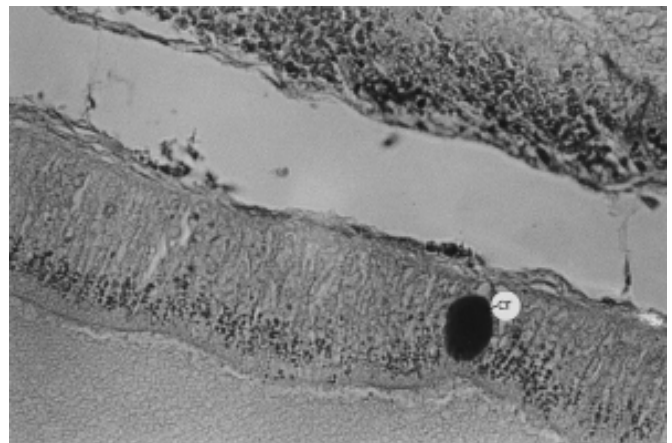


Fig. 24. Colonia de parásitos tipo rickettsiales (cr) en un conducto del hepatopáncreas de un abulón de apariencia normal, colectado en 1973

deterioro. Obviamente, para confirmar estas conjeturas se requiere continuar con los estudios histopatológicos, involucrando otras disciplinas del conocimiento, para comprender adecuadamente la biología y el ciclo de vida de estos microorganismos.

La infección por parásitos tipo rickettsiales en abulón es un fenómeno que aparentemente conduce a su muerte. Sin embargo, los resultados de este trabajo indican una respuesta defensiva muy leve por parte del hospedero. Las células infectadas muestran hipertrofia como resultado de la multiplicación intracelular de los microorganismos. Este aumento de volumen desplaza los organelos hacia la base de las células infectadas y oprime a las células vecinas.

En general, la respuesta de los hospederos a los parásitos de este tipo es de carácter inflamatorio. En este estudio se observó que siete abulones infectados mostraron cúmulos inusuales de células inflamatorias y cinco una proliferación excesiva de células café con numerosos gránulos citoplásmicos, aparentemente de material alimenticio de difícil digestión.

La respuesta inflamatoria fue severa en algunos casos, pero no mostró una relación directa con la rickettsiosis. Casos severos de infección fueron comunes sin una proliferación hemocitaria, mientras que casos de infección leve fueron objeto de una hemocitosis considerable. Por tanto, y debido a que la inflamación es un proceso no específico o estereotipado, es probable que este fenómeno tuviera una relación con éste o bien con algún otro agente no determinado. Debe destacarse que el resto de los abulones no manifestaron respuesta inflamatoria defensiva hacia los microorganismos parásitos, mostrando en todos los casos hipertrofia celular.

Estudios realizados en abulones negros de California afectados por rickettsiales indican que la falta de respuesta del hospedero se debe fundamentalmente a que los parásitos no se encuentran en íntimo contacto con la hemolinfa (Gardner *et al.*, 1995).

La carencia de una respuesta defensiva evidente del hospedero indica que la infección benigna y produce únicamente estrés al individuo afectado (Otto *et al.*, 1979). Ejemplo de ello son las investigaciones en la almeja *Meretrix lusoria* infectada en las branquias, la cual no mostró una respuesta significativa, debido a lo cual no se le caracterizó como una lesión mortal (Wen *et al.*, 1994). Un fenómeno similar se observa en los bivalvos *Tapes japonica*, *Patinopecten yessoensis* (Elston, 1986) y *Crassostrea gigas* (Reanult y Cochenne, 1994). Los resultados de este estudio coinciden con la falta de respuesta de estos individuos, pero difieren en la mortalidad asociada que se presenta en el abulón.

La mayoría de las investigaciones indican que los microorganismos poseen una virulencia muy limitada y provocan estrés y daños mecánicos (Gulka y Chang, 1983) los cuales, a su vez, pueden comprometer las funciones fisiológicas normales de los abulones (Elston, 1986).

Generalmente, los procariotas tipo rickettsiales se observan con una presencia muy baja en los moluscos, razón por la cual a menudo no se asocian a fenómenos inflamatorios. Sin embargo, se han reportado casos severos acompañados de extensa inflamación y destrucción evidente del órgano diana, que produce la muerte de manera indirecta (Norton *et al.*, 1993).

Algunos autores informan que la respuesta de bivalvos a las infecciones rickettsiales consisten en rodear, expulsar y producir lisis de las células del hospedero, sin embargo, no hay evidencia de que este fenómeno conduzca a la resolución de la infección y aparentemente no hay un mecanismo alterno de defensa por parte de los hospederos (Elston y Peacock, 1984).

Por otro lado, se tienen informes de fuertes infecciones por rickettsiales en otros invertebrados, entre ellos el cangrejo *Paralithodes platypus*, que muestra una infección del hepatopáncreas con una evidente necrosis tisular, encapsulamiento de hemocitos y muerte (Johnson, 1984). El camarón *Penaeus marginatus* desarrolla una hipertrofia semejante a la del abulón, con infiltración hemocitaria, picnosis y encapsulamiento (Brock *et al.*, 1986).

Otras investigaciones han revelado la respuesta de *Mytilus edulis* a la infección por rickettsiales en branquias. En este caso es evidente un encapsulamiento de los rickettsiales, que consiste de una capa acidófila de material denso granular con núcleos alargados que muestran externamente gran cantidad de amebocitos granulares. Según Gulka y Chang (1984) estos parásitos podrían ser diferentes de otros rickettsiales que se han reportado en otros invertebrados.

Por otra parte, se han atribuido a estos parásitos algunas alteraciones musculares que consisten en cambios miodegenerativos del músculo abductor del bivalvo *Placopecten magellanicus* infectado severamente por este tipo de microorganismos en las branquias (Gulka *et al.*, 1983). Aunque el abulón ha mostrado miodegeneración o atrofia del músculo del pie, se considera que los fenómenos en ambos hospederos pueden ser resultado de mecanismos diferentes que involucran daño en los procesos respiratorios en *Placopecten magellanicus*, lo cual conduce, en el caso del abulón, a una mala oxigenación con posible daño neurológico y alteraciones nutritivas. Se debe recordar que la atrofia del músculo no es un factor exclusivo del síndrome de deterioro y que ésta puede ser resultado de otros factores que estresan al individuo.

Como resultado de la muerte celular, Buchanan (1978) reporta cariorrexis y cariólisis. Cuando los protistas son liberados y se rompe la célula, ésta se vuelve semejante a las células caliciformes y en este estado las células se conocen como células fantasma (Buchanan, 1978) y se caracterizan por sus remanentes necróticos. En este trabajo, sólo un individuo presentó esta característica, aunque frecuentemente se observaron colonias de rickettsiales en la luz del tracto digestivo y en los conductos del hepatopáncreas, lo que indica ruptura celular. Probablemente la liberación de estas colonias ocurrió antes de que el análisis histológico detectara la presencia de células fantasma y entonces fueron reabsorbidas por los procesos enzimáticos de los abulones. De la misma forma, no fue posible detectar cariólisis, cariorrexis o picnosis, como lo establece Buchanan (1978), debido a que en este estudio la mayoría de las células no estaban en estado de muerte celular.

En la mayoría de los casos las infecciones por rickettsiales parecen ser benignas (Otto *et al.*, 1979). Sin embargo, se han reportado mortalidades de algunos invertebrados asociadas a parásitos tipo rickettsiales en el cangrejo *Carcinus mediterraneus* (Bonami y Pappalardo, 1980), en la almeja gigante *Hippopus hippopus* (Norton *et al.*, 1993), en el bivalvo *Placopecten magellanicus* (*et al.*, 1983) y en el abulón negro *Haliotis cracherodii* (Gardner *et al.*, 1995).

Los resultados de este análisis indican una relación muy importante de la mortalidad del abulón negro y la presencia de rickettsiales en el sistema digestivo. Aparentemente, la muerte se relaciona con la pérdida de la función de la actividad digestiva debido al daño celular producido por la infección de estos procariotas.

Atrofia del hepatopáncreas

Los resultados de Gardner *et al.* (1995) indican que la intensidad del síndrome de deterioro del abulón negro se relaciona directamente con

el grado de infección a través del tubo digestivo y una metaplasia de los túbulos del hepatopáncreas, que se diferencian en un epitelio cilíndrico semejante al que se presenta en el tubo digestivo. Esta metaplasia, según estos autores, se produce directamente por la infección de rickettsiales, provoca fallas en el sistema digestivo que conducen a una nutrición inadecuada y provoca la atrofia visceral y muscular.

Durante el desarrollo de este trabajo no se detectaron estos cambios metaplásicos en la glándula digestiva. Sin embargo, la arquitectura de los túbulos mostró en el 55% de los casos diferentes grados de atrofia que alteraba la estructura arquitectónica y reducía considerablemente la producción enzimática. De la misma forma los conductos de este órgano mostraron atrofia importante, quizá como consecuencia de la falta de producción enzimática.

Esta atrofia de la glándula digestiva, aunada a la propia infección del tubo digestivo y conductos del hepatopáncreas, podría producir un decremento importante en las funciones digestivas, que a su vez repercute en la atrofia muscular, debilidad y en general de los signos del síndrome de deterioro.

La atrofia del hepatopáncreas es un fenómeno que se produce por diferentes factores. Los resultados de este trabajo coinciden con otras investigaciones en virtud de la relación entre nutrición deficiente y atrofia tubular. Al respecto, se ha observado que la ostra *Crassostrea virginica* desarrolla una atrofia de los túbulos cuando es sometida a estrés nutricional asociado a una baja salinidad (Winstead, 1995), mientras que el estrés por temperatura asociado a inanición juega un papel básico en la degeneración de la estructura tubular de *Mytilus edulis* (Thomson *et al.*, 1974).

Sin embargo, no sólo la nutrición inadecuada provoca atrofia. Algunos moluscos infectados con larvas de tremátodos son afectados por degeneración o atrofia tubular, la cual se manifiesta microscópicamente como un epitelio cilíndrico que se ha reducido a un epitelio cúbico o escamoso, con un aumento de vacuolas citoplásmicas y pérdida de glucógeno (Malek, 1977). En este estudio la atrofia del hepatopáncreas frecuentemente mostró un epitelio escamoso en los túbulos, de manera semejante a como lo establece este autor. En tal caso la función del hepatopáncreas se ve seriamente comprometida en las áreas afectadas, aunque se ha observado que la atrofia no se presenta homogéneamente a lo largo de este órgano.

Algunos contaminantes producen alteraciones, atrofia en los túbulos del hepatopáncreas y, por tanto, hay un aumento considerable de la luz del túbulo (Lowe *et al.*, 1972). Este fenómeno se produce debido a que las células digestivas de los moluscos son un blanco importante para el efecto dañino de muchos contaminantes, los cuales se acumulan de manera especial en las vacuolas lisosomales de este órgano (Moore, 1988).

De esta manera, se ha encontrado que las concentraciones altas de hidrocarburos y cobre producen severos cambios degenerativos en el epitelio de la glándula digestiva de *Mytilus edulis* (Auffret, 1988); y un fenómeno semejante con necrosis se observa en abulones que habitan estuarios contaminados (Couch, 1985 citado por Auffret, 1988) y en ostiones expuestos a DDT (Lowe *et al.*, 1972).

Los estados de atrofia de la glándula digestiva generalmente se relacionan con un incremento importante en los lisosomas y los lípidos insaturados, lo cual indica un incremento en la autofagia y degeneración de lípidos (Moore, 1988); por esta razón la glándula digestiva se dilata y se degenera.

En suma, la atrofia del hepatopáncreas puede ser producto de varios factores, como son la contaminación y fenómenos relacionados con la nutrición. Cualquiera que fuese la causa de este fenómeno, es

indudable que produce fallas de las funciones digestivas y de almacenamiento de las glándula digestiva (Moore, 1988). Estas fallas pueden producir un aumento de la inanición que, junto con otros factores, puede conducir al síndrome de deterioro.

Protozoarios tipo gregarinas

En este trabajo se encontraron protozoarios del tipo de las gregarinas en un 30% de los abulones analizados. Estos parásitos se encuentran con una mayor frecuencia en los senos hemales de las branquias y en menor grado en riñón, hepatopáncreas y lámina propia del intestino. Sin embargo, sólo se analizaron las branquias de ocho abulones y en siete de ellos se encontró este tipo de protozoarios; por tanto, es probable que exista una presencia superior a la que se reporta en este trabajo. La localización en diversos órganos sugiere que estos parásitos se diseminan a través del sistema circulatorio. Todo indica que la presencia de estos parásitos no causa daño al hospedero, en virtud de la falta de respuesta tisular del individuo. Según Farmer (1980) los parásitos tipo gregarinas causan poco o ningún daño a las células que invaden; sin embargo, se desconoce el efecto patogénico real de estos protozoarios en el abulón.

La presencia de protozoarios tipo gregarinas en moluscos ya se ha reportado con anterioridad. *Nematopsis legeri* utiliza gasterópodos como hospederos intermedios y se localiza primordialmente en branquias y senos venosos, sin producir daño aparente (Lauckner, 1980).

Protozoarios tipo gregarinas muy semejantes a los que se reportan en este estudio se han observado en *Ostrea edulis*, *Mytilus edulis* y *Haliotis rufescens*. Este último no mostró signos del síndrome de deterioro ni otra alteración relacionada con la presencia de estos parásitos (Friedman *et al.*, 1989).

La falta de una respuesta defensiva del hospedero, la aparente ausencia de daño y la baja intensidad de la infección indican que estos parásitos no son causa del síndrome de deterioro. Valles (1992) sugiere que la presencia de protozoarios tipo gregarinas no mantiene una relación directa con el síndrome de deterioro del abulón chino *Haliotis sorenseni*, debido fundamentalmente a que se observan fuertes parasitosis en abulones sanos y ausencia de éstas en abulones seriamente afectados por esta enfermedad.

En otros estudios específicos del abulón negro se han detectado esporocistos de gregarinas en branquias, músculo, riñón y tejido digestivo de abulones sanos y afectados por el síndrome de deterioro (Vanblaricom *et al.*, 1993).

De acuerdo con lo anterior, se presume que las gregarinas no son patógenas para los abulones y que se presentan de manera natural en individuos sanos y enfermos, por lo que no se considera que sean el factor causante del síndrome de deterioro; sin embargo, se requieren más estudios para establecer con precisión la patogenicidad de estos parásitos en el abulón.

Conclusiones

1. El 100% de los abulones presentó parásitos tipo rickettsiales en el epitelio del esófago, estómago e intestino.
2. El 75% de los abulones muestra una diseminación de éstos en los conductos del hepatopáncreas.
3. Existe asociación entre el síndrome de deterioro y la presencia de parásitos tipo rickettsiales.

4. Se encontró una atrofia leve o severa en los túbulos del hepatopáncreas en 15 abulones. En el primer caso se observó un aumento de la luz tubular como consecuencia de la ligera disminución del tamaño de las células, mientras que la atrofia severa se caracterizó por una modificación del epitelio cilíndrico a una forma cúbica o escamosa.
5. Aparentemente, los protozoarios tipo gregarinas no producen daño al abulón y, dada su presencia en un 30.0%, no se encontró relación alguna con el síndrome de deterioro.
6. Otras alteraciones observadas en este estudio muestran una incidencia mínima, por lo que no se les ha relacionado con el síndrome de deterioro.

Agradecimientos

Se agradece de manera especial al Biól. José Turrubiates por haber proporcionado las muestras de abulón negro para este estudio, a la P. B. Alfa Tao Hernández Lucero por su valiosa colaboración en la técnica de Giménez para rickettsias y la transcripción del manuscrito, y a la Biól. Ma. del Milagro Cenicerós Ruiz por su participación en la técnica histológica.

Referencias bibliográficas

- ADAM, R.; V. Pipitgool; P. Sithithaworn; E. Hinz and V. Storch. 1994. rickettsiales-like organisms in the digestive gland of *Bithynia siamensis goniomphalus* (Prosobranchia: Bithyniidae) infected with *Opisthorchis viverrini* (Trematoda: Digenea). *J. Invertebr. Pathol.* 63:26-30.
- AUFFRET, M. 1988. Histopathological changes related to chemical contamination in *Mytilus edulis* from field and experimental conditions. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 46:101-107.
- BARTHOLOMEW, J. W. 1973. Stains for microorganisms in smears. pp.247-317. In: Clark, G. (ed.). Staining procedures used by the Biological Stain Commission. Third Edition. *The Williams and Wilkins Co. Baltimore, USA.*
- BONAMI, J. R. and R. Pappalardo. 1980. Rickettsial infection in marine crustacea. *Experientia* 36:180-181.
- BROCK, J. A.; L. K. Nakagama; T. Hayashi, S. Teruya and H. V. Campen. 1986. Hepatopancratic rickettsial infection of the penaeid shrimp, *Penaeus marginatus* (Randall), from Hawaii. *J. Fish Dis.* 9:73-77.
- BRYAN, A. H.; C. A. Bryan y C. G. Bryan. 1974. Bacteriología: Principios y prácticas. *Compañía Editorial Continental, S. A. México D. F. 6ta. Ed.*
- BUCHANAN, J. S. 1978. Cytological studies on a new species of rickettsia found in association with a phage in the digestive gland of the marine bivalve mollusc, *Tellina tenuis* (da Costa). *J. Fish Dis.* 1:27-43.
- BURROWS, W. 1974. Tratado de microbiología. *Nueva Editorial Interamericana, S.A. de C.V. México, D.F. 3ra. Ed.* 901 pp.
- COTRAN, R. S., V. Kumar, y S. L. Robbins. 1990. Patología estructural y funcional. Vol. 1. *Editorial interamericana, McGraw-Hill. Madrid, España. 4ta. Ed.* 739 pp.
- CHANTLER, P. D. 1983. Biochemical and structural aspects of molluscan muscle. pp.78-143. In: Saleuddin, A. S. M. and K. M. Wilbur (eds.). *The mollusca Vol. 4. Physiology, Part 1. Academic Press.*
- CHENG, T. C. 1993. Noninfectious diseases of marine mollusks. pp. 289-318. In: Couch, J. A. and Fournie, J.W. (eds.). *Pathobiology of marine and estuarine organisms. CRC Press. USA.*
- DAVIS, B. D.; R. Dulbecco; H. N. Eisen; H. S. Ginsberg; W. B. Wood y M. McCarty. 1978. Tratado de microbiología. *Salvat Editores, S. A. Barcelona España. 2da. Ed.*
- _____. 1979. Tratado de Microbiología con inclusión de inmunología y genética molecular. *Salvat Editores, S. A. Barcelona, España. 2da. Ed.* 1559 pp.
- DAVIS, G. E. 1993. Mysterious demise of Southern California black abalone, *Haliotis cracherodii* Leach 1814. *J. Shellfish Res.* 12(2):189-194.
- ELSTON, R. 1986. Occurrence of branquial rickettsiales -like infections in the bivalve molluscs, *Tapes japonica* and *Patinopecten yessoensis*, with comments on their significance. *J. Fish Dis.* 9:69-71.
- ELSTON, R. A. and M. G. Peacock. 1984. A rickettsiales -like infection in the Pacific razor clam, *Siligua patula*. *J. Invertebr. Pathol.* 44:84-86.
- FARMER, J. N. 1980. The Protozoa. Introduction to Protozoology. *The C. V. Mosby Company, USA.* 732 pp.
- FRIEDMAN, C. S.; T. McDowell; J. M. Groff; J. T. Hollibaugh; D. Manzer and R. P. Hedrick. 1989. Presence of *Bonamia ostreae* among populations of the european flat oyster, *Ostrea edulis* Linné, in California, USA. *J. Shellfish Res.* 8(1):133-137.
- FRIES, C. R.; S. B. Grau and M. R. Tripp. 1991. Rickettsiae in the cytoplasm of gill epithelial cells of the soft-shelled clam, *Mya arenaria*. *J. Invertebr. Pathol.* 57:443-445.
- GARDNER, G. R.; J. C. Harshbarger; J. L. Lake; T. K. Sawyer; K. L. Price; M. D. Stephenson; P. L. Haaker and H. A. Togstad. 1995. Association of procaryotes with symptomatic appearance of withering syndrome in black abalone *Haliotis cracherodii*. *J. Invertebr. Pathol.* 66:11-120.
- GULKA, G. and P. W. Chang. 1983. Pathogenicity and infectivity of a rickettsia-like organism in the sea scallop, *Placopecten magellanicus*. *J. Fish Dis.* 6:355-364.
- _____. 1984. Host response to rickettsial infection in blue mussel, *Mytilus edulis* L. *J. Fish Dis.* 8:319-323.
- GULKA, G.; K. A. Marty and P. W. Chang. 1983. Prokaryotic infection associated with a mass mortality of the sea scallop, *Placopecten magellanicus*. *J. Fish Dis.* 6:355-364.
- HAAKER, P. L.; D. O. Parker; H. Togstad; D. V. Richard; G. E. David and C. S. Friedman. 1992. Mass mortality and withering syndrome in black abalone *Haliotis cracherodii* in California. pp. 214-224. In: S. A. Shepherd, M. J. Tegner and S. A. Guzman del Proo (eds.). *Abalone of the world. Biology fisheries and culture proceeding of the 1st. International Symposium on Abalone. Fishing News Book. The University Press. Cambridge, Great Britain.*
- HARSHBARGER, J. C.; C. S. Chang and S. V. Otto. 1977. Chlamydiae (with phages) Mycoplasmas, and Rickettsiae in Chesapeake Bay Bivalves. *Science* 196:666-668.
- HUMASON, G. L. 1967. Animal tissue techniques. 2nd. Edition. W. H. Freeman and Company. *San Francisco and London. 2da. Ed.*, 569 p.
- JAWETZ, E.; J. L. Melnick and E. A. Adelberg. 1966. Review of medical Microbiology. *Lange Medical Publication. Los Altos, California USA. 7th. Ed.* 494 pp.
- JOHNSON, P. T. 1984. A rickettsia of the blue king crab, *Paralithoides platypus*. *J. Invertebr. Pathol.* 44:112-113.
- LAFFERTY, K. D. and A. M. Kuris. 1993. Mass mortality of black abalone *Haliotis cracherodii* in the California Channel Island. Test of epidemiological hypothesis. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 96:239-248.

- LAUCKNER, G. 1980. Diseases of mollusca gastropoda. pp 311-424. In: O. Kinne (ed.). Diseases of Marine Animals. Vol. I General aspects, protozoa to gastropoda. *John Wiley and Sons*.
- LOWE, J. I.; P. R. Parrish; J. M. Patrick jr. and J. Forester. 1972. Effects of the polychlorinated biphenyl aroclor 1254 on the American oyster *Crassostrea virginica*. *Mar. Biol.* 17:209-214.
- MALEK, E. A. 1977. Studies on the parasitism of mollusks as models for comparative pathology. *J. Invertebr. Pathol.* 29:1-6.
- MARTIN, G. G.; K. Romero and C. Miller-Walker. 1983. Fine structure of the ovary in the red abalone *Haliotis rufescens* (Mollusca:Gastropoda). *Zoomorphology* 103:89-102.
- MOORE, M. N. 1988. Cellular and histopathological effects of a pollutant gradient- Summary. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 46:109-110.
- NORTON, J. H.; M. A. Shepherd; M. R. Abdon-Naguit and S. Lindsay. 1993. Mortalities in giant clam *Hippopus hippopus* associated with rickettsiales-like organisms. *J. Invertebr. Pathol.* 62:207-209.
- OTTO, S. V.; J. C. Harshbarger and S. C. Chang. 1979. Status of selected unicellular eucaryote pathogens, and prevalence and histopathology of inclusions containing obligate procaryotes parasites in commercial bivalve mollusks from Maryland estuaries. *Haliotis* 8: 285-295.
- PAULEY, G. B. 1969. A critical review of neoplasia and tumor-like lesion in mollusks. In: Neoplasms and Related Disorders in Invertebrates and lower Vertebrate Animals. *Nat. Cancer Inst. Monogr.* 31: 509-535.
- PERKINS, F. O. 1993. Infectious diseases of molluscs. pp 255-287. In: Couch, J.A. and J.W. Fournie (eds.). Pathobiology of marine and estuarine organisms. *CRC. Press. USA*.
- RENAULT, T. and N. Cochenne. 1994. Rickettsia-like organisms in the cytoplasm of gill epithelial cells of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *J. Invertebr. Pathol.* 64:160-162.
- RICHARDS, D. U. y G. E. Davis. 1993. Early Warnings of modern population collapse in black abalone *Haliotis cracherodii*, Leach 1814 at the California Channel Island. *J. Shellfish Res.* 12(2):189-194.
- SEVILLA, M. L. 1971. Desarrollo gonádico del abulón azul *Haliotis fulgens* Philippi. *Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural. Tomo XXXII.* pp.129-139.
- STEINBECK, J. R.; J. M. Groff; C. S. Friedman; T. McDowell and R.P. Hedrick. 1992. Investigation into a mortality among population of the California black abalone *Haliotis cracherodii* of the central coast of the California, U.S.A. pp 201-213. In: S. A. Shepherd, M. J. Tegner and S. A. Guzman del Proo (eds.). Abalone of the world. Biology, fisheries and Culture Proceeding of the 1st. International Symposium on abalone. *Fishing news book. The University Press. Cambridge, Great Britain*.
- THOMPSON, R. J.; N. A. Ratcliffe and B. L. Bayne. 1974. Effects of starvation on structure and function in the digestive gland of the mussel *Mytilus edulis* L. *J. Mar. Biol. Ass. U. K.* 54:699-672.
- TISSOT, B. N. 1990. El Niño, responsible for decline of black abalone of southern California. *Hawaiian Shells News.* 38(5):3-4.
- TRUEMAN, E. R. and A. N. Hodgson. 1990. The fine structure and function of the foot of *Nassarius kraussianus*, a gastropod moving by ciliary locomotion. *J. Moll. Stud.* 56:221-228.
- TURRUBIATES M., J. M. and J. L. Castro O. 1989. Growth of *Haliotis fulgens* in Bahía Tortugas, Baja California. In: S. A. Shepherd; M. J. Tegner and S. A. Guzman del Proo (eds.). Abalone of the world. Biology fisheries and culture. Supplementary papers. Proceeding of the 1st. International Symposium on Abalone, in La Paz, Mexico, 21-25 November, 1989. *Fishing news book. The University Press. Cambridge, Great Britain*.
- VANBLARICOM, G. R.; J. L. Ruediger; C. S. Friedman; D. D. Wooderd and R. P. Hedrick. 1993. Discovery of Withering Syndrome among black abalone *Haliotis cracherodii*, Leach, 1814, populations at San Nicolas Island, California. *J. Shellfish Res.* 12(2):185-188.
- WEBBER, H. H. and A.C. Giese. 1969. Reproductive cycle and gametogenesis in the black abalone *Haliotis cracherodii* (Gastropoda:Prosobranchiata). *Mar. Biol.* 4:152-159.
- WEINSTEIN, J. E. 1995. Fine structure of the digestive tubule of the eastern oyster, *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791). *J. Shellfish Res.* 14(1):97-103.
- WEN, C. M.; G. H. Kou and S. N. Chen. 1994. Rickettsiaceae-like microorganisms in the gill and digestive gland of the hard clam, *Meretrix lusoria* roding. *J. Invertebr. Pathol.* 64:138-142.
- WINSTEAD, J. T. 1995. Digestive tubule atrophy in eastern oysters, *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791), exposed to salinity and starvation stress. *J. Shellfish Res.* 14(1):105-111.
- YOUNG, J. S. and J. D. DeMartini. 1970. The reproductive cycle, gonadal histology, and gametogenesis of the red abalone, *Haliotis rufescens* (Swainson). *Calif. Fish and Game.* 56(4):298-309.