

Biomarcadores celulares e inmunológicos en la ostra del Pacífico *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) cultivada en un estuario tropical durante la temporada lluviosa

Cellular and immunological biomarkers in Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) reared in a tropical estuary during rainy season

Autores: Mariela Loján-Avellán ^{1,2}
Edgar Zapata-Vívenes ^{1,3,4}
Luis Manuel Treviño ^{1,2}
César Lodeiros ^{1,2,5}

Dirección para correspondencia: mlojan1384@utm.edu.ec

Recibido: 2021-02-01

Aceptado: 2021-05-11

Resumen

Los estuarios tropicales han sido considerados ambientes excelentes para desarrollar cultivos de la ostra *Crassostrea gigas*; sin embargo, existen factores limitantes durante la temporada lluviosa que modulan cambios en las respuestas fisiológicas y celulares de las ostras, los cuales afectan su supervivencia. En este estudio, se evaluaron biomarcadores celulares e inmunológicos, crecimiento y supervivencia de *C. gigas* cultivada en suspensión en el estuario del Río Chone (Ecuador), desde diciembre 2019 a marzo 2020. Se registraron parámetros ambientales (pluviosidad, salinidad y temperatura), respuestas celulares-inmunológicas *in vitro* (viabilidad, número de hemocitos, fagocitosis y estabilidad

¹ Programa de Maestría en Acuicultura, Instituto de Postgrado, Universidad Técnica de Manabí, Bahía de Caráquez, Manabí, Ecuador.

² Grupo de Investigación en Biología y Cultivo de Moluscos, Departamento de Acuicultura y Pesca, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Técnica de Manabí, Bahía de Caráquez, Manabí, Ecuador.

³ Grupo de Investigación en Biología y Cultivos de Equinodermos (INBICEQ). Departamento de Acuicultura y Pesca, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Técnica de Manabí, Ecuador

⁴ Departamento de Biología, Escuela de Ciencias, Núcleo de Sucre, Universidad de Oriente, Venezuela. E-mail: edgar.zapata@utm.edu.ec ORCID 0000-0003-3720-5416.

⁵ Instituto Oceanográfico de Venezuela, Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela. E-mail: cesarlodeirosseijo@yahoo.es ORCID 0000-0001-9598-22354

de la membrana lisosomal) y actividad de catalasa en el fluido celómico. El promedio mensual de pluviosidad mostró incremento desde enero (78,8mm), alcanzando su valor máximo en febrero (174,8 mm), disminuyendo progresivamente en marzo (53,2 mm). La temperatura osciló entre 26 y 32°C, la salinidad descendió de 32 ups en diciembre a 10-14 ups en febrero y marzo respectivamente. Los organismos evaluados durante febrero y marzo mostraron una reducción entre 4-5% de la viabilidad de hemocitos circundantes, y más del 14% mostraban desestabilización de las membranas lisosomales. El número de fagocitos incrementó y la actividad de catalasa disminuyó durante estos meses. Las ostras mostraron una tasa de crecimiento diario baja (0,01 mm/día), y la supervivencia descendió a 64% (marzo). El sistema inmune-celular en ostras cultivadas es modulado por bajas salinidades e incremento de temperatura superficial del agua, lo que sugiere una relación directa con su crecimiento y supervivencia. Los biomarcadores celulares e inmunológicos estimados son propuestos como índices de condición fisiológica en *C. gigas* bajo cultivo.

Palabras clave: catalasa; crecimiento; estrés; fagocitosis; hemocitos; retención de rojo neutro.

Abstract

Tropical estuaries have been considered excellent environments to develop the oyster culture *Crassostrea gigas*; however, there are limiting factors during the rainy season that modulate changes in physiological and cellular responses, which affect oyster survival. In this study, cellular and immunological biomarkers, growth and survival of *C. gigas* were evaluated in suspending culture in the estuary of the Chone River (Ecuador), from December 2019 to March 2020. Environmental parameters (pluviosity, salinity and temperature) and *in vitro* cellular-immunological biomarkers (viability, count of hemocytes, phagocytosis and lysosomal membrane stability) and catalase activity from coelomic fluid were determined. The monthly average of precipitation showed an increase since January (78,8 mm), with a maximum value in February (174,8 mm), decreasing progressively in March (53,2 mm). The temperature varied between 26 and 32°C, the salinity decreased from 32 ups in December to 10-14 ups in February and March respectively. The organisms evaluated during February and March showed a reduction (4-5%) in surrounding hemocyte viability, and more than 14% showed destabilization of the lysosomal membranes. Phagocyte number increased and catalase activity decreased during these months. Oysters showed a low daily growth rate (0,01 mm/day), and survival decreased to 64% (March). The cellular-immune system in reared oysters is modulated by low salinity and increased water surface temperature, suggesting a direct relationship with growth and survival. The cellular and immunological biomarkers evaluated are recommended as indices of physiological condition in *C. gigas* under culture.

Keywords: catalase; growth; stress; phagocytosis; hemocytes; neutral red retention.

Introducción

La ostra del Pacífico, *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) ha sido la especie de bivalvo más ampliamente cultivada a nivel mundial (Troost, 2010; Reynaga *et al.*, 2018; FAO, 2021). Ha sido introducida con éxito en diversas regiones geográficas, principalmente en zonas costeras templadas (Mondol *et al.*, 2016), y subtropicales (Melo *et al.*, 2020). Lodeiros *et al.* (2018) demostraron que *C. gigas* presenta una tasa de crecimiento significativa en ambientes costeros marinos tropicales alcanzando tallas comerciales (80 mm) antes del año; no obstante, en el estuario del Río Chone de la región ecuatoriana *C. gigas* puede alcanzar tallas de 85 mm en tan solo 5 meses de cultivo durante la temporada seca (verano); la mitad del tiempo esperado en el medio marino (Treviño *et al.*, 2020). Sin embargo, durante el período de alta pluviosidad, contemplado entre los meses de diciembre a mayo, las ostras son sometidas a cambios ambientales bruscos que pueden ocasionarles gran estrés y altas mortalidades.

Los ostreidos presentan un sistema efectivo de defensa inmunológico innato, el cual está mediado por la acción de células inmunitarias denominadas hemocitos, responsables del reconocimiento, fagocitosis y eliminación de microorganismos o cualquier material invasor foráneo. Participan en la respuesta inflamatoria, cicatrización, formación de concha, transporte de nutrientes y excreción de enzimas (Adzigbli *et al.*, 2019; Pourmozaffar *et al.*, 2020). Adicionalmente, existe un componente humoral constituido por sustancias químicas con un amplio espectro antimicrobiano (Guo *et al.*, 2015; Green *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2018). Dentro de las estrategias de defensa celular-mediadas, los hemocitos con actividad fagocítica pueden producir especies reactivas del oxígeno (EROs), como el peróxido de hidrógeno (H₂O₂), el cual es usado como sustancia microbicida durante el proceso fagocítico. Este compuesto altamente tóxico es mantenido a concentraciones fisiológicamente aceptables por la acción de varias enzimas; entre ellas, la catalasa (Alfonso-Prieto *et al.*, 2009).

Las variaciones ambientales pueden alterar los mecanismos de defensa inmune en bivalvos (Schmitt *et al.*, 2012; Chainy *et al.*, 2016). Una hipótesis plantea que el incremento de la sobreproducción de EROs bajo condiciones ambientales estresantes, puede afectar la fluidez de las membranas biológicas, particularmente las funciones de los lisosomas, que son compartimientos almacenadores de sustancias digestivas y de otros factores humorales vinculados con la actividad inmune (Cheng, 1981, Hauton *et al.*, 1998). La desestabilidad de las membranas lisosomales puede conllevar a su ruptura, lo que provocaría degradación del material citoplasmático y posterior lisis celular (Ringwood *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2006).

En los estuarios, la fisiología de las ostras está influenciada principalmente por la estacionalidad (Fisher & Tamplin, 1988), y debido a que son poiquilotérmicas y osmoconformadoras, todas sus células están potencialmente influenciadas por los factores ambientales de la misma manera. Los hemocitos pueden reflejar la condición fisiológica de las ostras (Fisher *et al.*, 1989), por lo tanto, parámetros como la viabilidad, número y subpoblaciones de hemocitos, así como sus

funciones inmunológicas pueden servir como indicadores de la salud del animal, por ello han sido utilizadas como biomarcadores de alerta temprana ante episodios de estrés (Allam & Raftos, 2015; Chan & Wang, 2019; Rahman *et al.*, 2019), pruebas ecotoxicológicas (Al-Subiai *et al.*, 2008) y monitoreo ambiental (Liu & Wang, 2016).

En *C. gigas* existen algunos estudios de biomarcadores en relación a factores de estrés ambiental en condiciones de laboratorio, estabilidad de la membrana lisosomal (Cho & Jeong, 2005; Zhang *et al.*, 2006), respuestas celulares y moleculares (Gagnaire *et al.*, 2006; Rahman *et al.*, 2019), pero existen pocos estudios en los que se utilicen biomarcadores para estimar la salud de los organismos en sistemas de cultivo (Gagnaire *et al.*, 2006). Partiendo de la suposición que las condiciones ambientales pueden provocar modulaciones en el sistema inmunológico, y a su vez mermar la tolerancia de la ostra en el medio, este estudio evaluó biomarcadores inmunológicos y su relación al crecimiento y sobrevivencia de *C. gigas* en cultivo suspendido en el estuario del Río Chone, durante temporada lluviosa ecuatorial.

Metodología

Ostras

Los individuos juveniles (semillas) de *C. gigas*, provenientes del Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas (CENAIM), fueron trasladados a un cultivo suspendido experimental en el estuario del Río Chone, Bahía de Caráquez, durante los meses correspondientes a la estación seca, hasta alcanzar su mínima talla comercial. Para este estudio, cuatrocientos ochenta individuos adultos ($73,0 \pm 9,62$ mm de longitud antero-posterior y $78,9 \pm 7,5$ g de masa húmeda) aparentemente sanos, se mantuvieron en cultivo durante 152 días en la temporada lluviosa, en el periodo desde diciembre 2019 hasta marzo del 2020.

El cultivo suspendido en el estuario del Río Chone se llevó a cabo en una balsa flotante ($0^{\circ} 33' 26.50''$ S; $80^{\circ} 25' 22.71''$ O). Las ostras fueron distribuidas en dos lanternas (*lantern nets*) de 9mm de abertura de ojo de malla, con cuatro niveles cada una, a una densidad de 60 organismos por nivel. El último nivel se estableció para reposición, con el fin de reemplazar cada mes las ostras muertas y organismos retirados de los demás niveles, y mantener la misma densidad de cultivo durante todo el estudio. Mensualmente, grupos de 20 organismos seleccionados al azar fueron retirados del cultivo y trasladados en contenedores isotérmicos (con agua del sitio de cultivo) al laboratorio de nutrición de la Universidad Técnica de Manabí (UTM) para estimar su biometría y parámetros celulares.

Parámetros ambientales

Los promedios mensuales y semanales de pluviosidad fueron proporcionados por el Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología (INAMHI). Semanalmente en el sistema de cultivo la salinidad fue estimada con un refractómetro marca ATAGO

(0,1 UPS de precisión), y la temperatura del agua se determinó usando una sonda multiparamétrica (YSI 550A).

Crecimiento y supervivencia

Las medidas de las longitudes antero-posterior, dorso-ventral y entre valvas de las ostras fueron estimadas con un calibrador digital de precisión de 0,1 mm, y la biomasa total se obtuvo pesando cada ostra en una balanza analítica (0,001 g de precisión). Durante las colectas mensuales se contabilizó la sobrevivencia en cada nivel de las linternas.

Extracción de la hemolinfa

Las valvas de cada organismo fueron separadas cuidadosamente de manera mecánica para evitar lesiones en sus órganos internos. La extracción de hemolinfa fue realizada por punción directa en el seno venoso con una jeringa hipodérmica de 1 mL de capacidad, previamente cargada con 200 μ L de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) preparada con agua de mar estéril y filtrada a miliporo, la cual sirvió como solución anticoagulante. La hemolinfa fue transferida a tubos eppendorf (1,5 mL) y mantenida a 10°C en un contenedor isotérmico (Gagnaire *et al.*, 2007) hasta el momento de los análisis.

Viabilidad y conteo celular

La viabilidad celular (VC) y número total de hemocitos (NTH) fueron estimados según el protocolo descrito por Nusetti *et al.* (2004), empleando una tinción diferencial con azul de tripano al 0,4%. Se mezcló en un tubo eppendorf 10 μ L de hemolinfa con un volumen igual de la solución de azul de tripano. Se tomó una alícuota de 10 μ L de esta mezcla y se contaron las células en un hemocitómetro por microscopía de luz a una magnificación de 40X. Las células vivas se diferenciaron de las muertas porque éstas últimas toman una coloración azul. La VC fue expresada como porcentaje (%), al contabilizar 100 células (teñidas y no teñidas) para obtener el porcentaje promedio de células viables. El NTH se obtuvo promediando el total de células viables contadas en los cuatro cuadrantes externos del hemocitómetro multiplicado por el factor de dilución. El conteo diferencial de los hemocitos fue realizado cuantificando el número de cada tipo celular (hialinos, semigranulocitos y granulocitos) en un conteo de 100 células, de acuerdo a la clasificación morfológica de Wang *et al.* (2017).

Fagocitosis

La actividad fagocítica se determinó utilizando como antígeno un extracto de levadura *Saccharomyces cerevisiae* comercial. Para esto se preparó una solución de levadura de 400-500 células/ μ L aproximadamente. Se incubó una fracción de hemolinfa de 2×10^6 células por mL con la solución pre-contada de levadura en un tubo eppendorf en cámara oscura a 10°C. Después de las 4 h se cuantificó el número de células que poseían al menos una levadura o restos de las mismas en su citoplasma (Zapata-Vívenes *et al.*, 2012).

Catalasa

La actividad de la enzima catalasa (CAT, EC 1.11.1.6) fue determinada por espectrofotometría de acuerdo a los procedimientos descritos por Aebi *et al.* (1984), con ajustes en la concentración del sustrato para la especie en estudio. El desdoblamiento de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) fue monitoreado en una solución buffer fosfato de potasio 50 mM (pH 6,8) a una longitud de onda de 240 nm, a un coeficiente de extinción de 40 mol⁻¹ cm⁻¹.

Estabilidad de la membrana lisosomal

El porcentaje de hemocitos con daños aparentes en sus lisosomas fueron determinados según el método de Lowe *et al.* (1992) y Zapata-Vivenes *et al.* (2012). En distintas láminas fueron colocados 40 µL de la fracción de hemolinfa y se procedió a incubar con 40 µL de una solución de 45 µg/mL de rojo neutro y agua de mar con EDTA. La incubación fue realizada en cámara oscura a 15 °C. Las muestras fueron observadas desde 15 hasta 120 minutos en un microscopio a 400 X, estimando el porcentaje de células dañadas y sin daño aparente.

Análisis Estadístico

Los incrementos de los valores absolutos de los parámetros de crecimiento de la concha, y tejidos blandos, parámetros celulares e inmunológicos se analizaron a través de una ANOVA de una vía con una probabilidad de $p < 0,05$ después de comprobar su distribución normal y la homogeneidad de las varianzas (Sokal & Rohlf, 2012) Todos los datos se analizaron mediante el software Statgraphics ® Plus versión 5.1.

Resultados

Variables ambientales

La temporada de lluvias inició en el mes de enero con promedios de 78,8mm, con un incremento en las precipitaciones (174,8 mm) durante el mes febrero y luego un ajuste durante marzo (53,2 mm) (Figura 1a). La salinidad osciló entre 32 y 30 ups durante diciembre, pero a partir de enero se suscitaron descensos hasta 24 ups, y posteriormente durante febrero y marzo se registraron valores de 10 a 14 ups, respectivamente (Figura 1b); con un ascenso al finalizar el mes. La temperatura fue variable entre los meses de cultivo, y fluctuando en picos intermitentes desde 26 hasta 32°C, alcanzando los valores más altos en febrero y marzo (Figura 1c).

Biomarcadores

La viabilidad, y el número total y diferencial de hemocitos se muestran en la Tabla 1. La viabilidad de los hemocitos mostró descensos significativos ($F = 57,87$; $p < 0,05$) en el orden de 3,90-5,10% en los organismos colectados durante el mes de mayor pluviosidad (febrero), en contraste con el inicio del periodo de estudio.

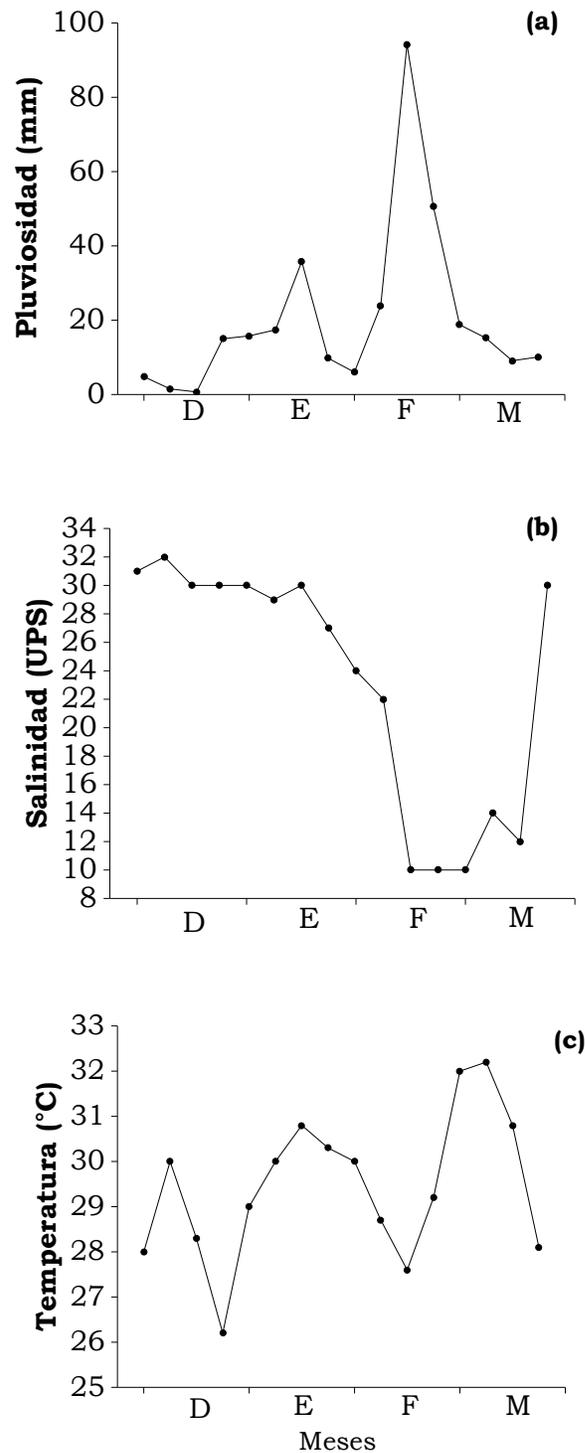


Figura 1. Valores semanales de (a) pluviosidad, (b) salinidad y (c) temperatura, registrados durante los meses de cultivo suspendido de *Crassostrea gigas* en el estuario del Río Chone, Ecuador.

Tabla 1. Valores mensuales de viabilidad, número total (NTH) y conteo diferencial de hemocitos de *Crassostrea gigas*, durante el cultivo suspendido en el estuario del Río Chone, Ecuador. Los resultados muestran los promedios \pm desviación estándar. Tratamientos con letras desiguales son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Biomarcador	DICIEMBRE	ENERO	FEBRERO	MARZO
Viabilidad	98,90 \pm 0,72 ^a	98,80 \pm 0,42 ^a	95,90 \pm 0,74 ^b	97,10 \pm 0,74 ^a
NTH	1,32 \pm 0,48	1,10 \pm 0,22	0,85 \pm 0,44	1,02 \pm 0,72
<i>Conteo Diferencial</i>				
Granulocitos	25,95 \pm 2,60	30,80 \pm 3,46	39,30 \pm 6,35	28,60 \pm 6,37
S-granulocitos	18,65 \pm 2,32	23,2 \pm 4,02	19,40 \pm 2,18	15,20 \pm 1,22
Agranulocitos	55,4 \pm 3,18	46,0 \pm 5,27	41,3 \pm 6,95	54,2 \pm 5,78

A pesar de esto, los valores se encuentran en los rangos de viabilidad aceptable. El número total de hemocitos (NTH) no varió durante el período de estudio ($F=2,18$; $p>0,05$). Los promedios celulares oscilaron entre 0,85 a $1,32 \times 10^5$ células/mL en los organismos cultivados, observándose los promedios menores en febrero. El conteo diferencial de hemocitos no mostró variabilidad entre meses de evaluación. Los organismos presentaron similares promedios celulares en el número de hialinos ($F=1,89$; $p>0,05$), semi-granulocitos ($F=1,22$; $p>0,05$) y granulocitos ($F=1,71$; $p>0,05$).

El número de fagocitos, actividad de catalasa, y la estabilidad lisosomal se muestran en la Tabla 2. La fagocitosis mostró un incremento significativo en los organismos colectados en los meses de mayor pluviosidad, en contraste al inicio del cultivo ($F=9,29$; $p<0,05$); concomitantemente, la actividad de la catalasa disminuyó durante el mes de febrero ($F=13,18$; $p<0,05$). Los mayores daños en las membranas lisosomales de los hemocitos se observaron durante los meses de febrero y marzo ($F=27,17$; $p<0,05$), mostrando promedios entre 14 a 19 %, respectivamente.

Tabla 2. Valores mensuales de fagocitosis (número de fagocitos), catalasa (μ moles de H_2O_2 /min/mL) y daño lisosomal (%) en *Crassostrea gigas* durante el cultivo suspendido en el estuario del Río Chone, Ecuador. Los resultados muestran los promedios \pm desviación estándar. Tratamientos con letras desiguales son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Biomarcador	DICIEMBRE	ENERO	FEBRERO	MARZO
Fagocitosis	79,0 \pm 5,55 ^a	96,0 \pm 19,74 ^b	184,33 \pm 15,95 ^c	130,4 \pm 9,46 ^b
Catalasa	0,82 \pm 0,05 ^c	0,54 \pm 0,08 ^b	0,33 \pm 0,04 ^a	0,56 \pm 0,06 ^b
Daño lisosomal	5,55 \pm 0,52 ^a	8,40 \pm 0,71 ^b	14,55 \pm 1,23 ^c	19,0 \pm 2,39 ^{cd}

Crecimiento y supervivencia

Las ostras mostraron una tasa de crecimiento diario baja (0,01 mm/día), mostrando valores promedios de $73,02 \pm 9,62$ mm a $96,08 \pm 7,23$ mm (axis antero-posterior) durante diciembre a enero. Sin embargo, durante el resto del periodo, caracterizado de lluvia, no se detectó un crecimiento significativo (Figura 2a). No obstante, se registraron incrementos en la masa total de manera paulatina desde diciembre a marzo (Figura 2b), las ostras alcanzaron un peso total promedio de $101,5 \pm 6,8$ g, con una tasa 0,15 g de ganancia por día. La supervivencia a fines de diciembre fue del 94%, con una reducción significativa a 64% al finalizar el mes de marzo (Figura 3).

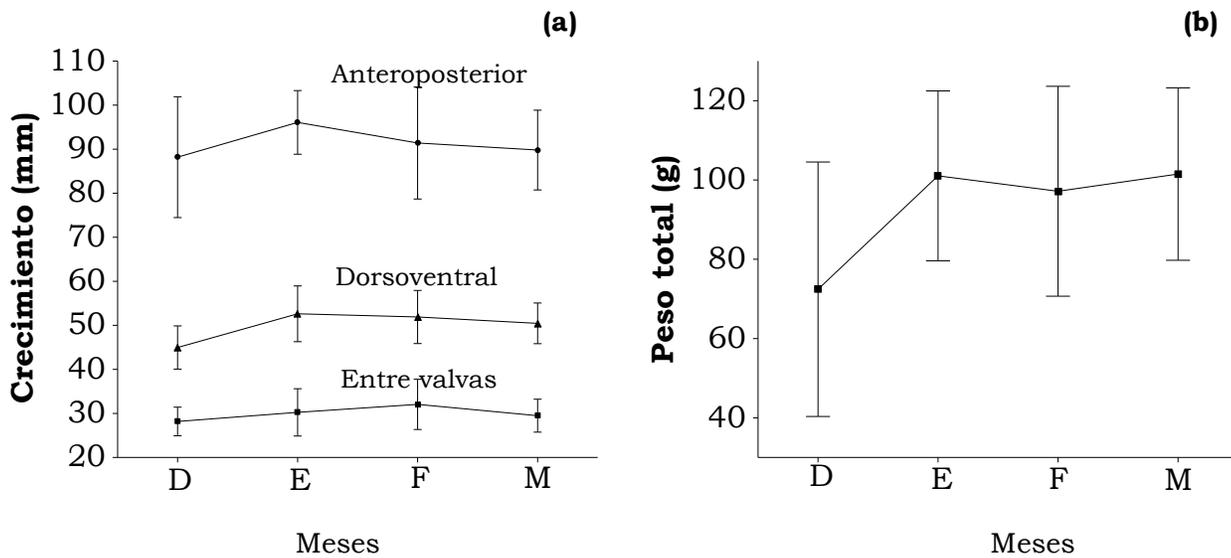


Figura 2. Crecimiento en (a) longitud y (b) masa total de *Crassostrea gigas* durante los meses de cultivo suspendido en el estuario del Río Chone.

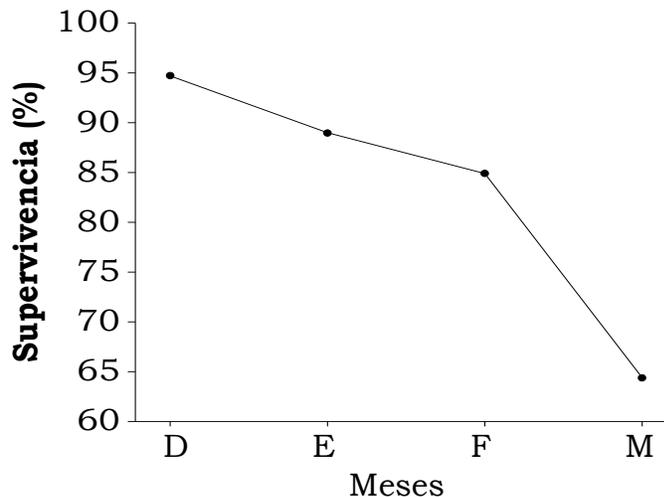


Figura 3. Supervivencia mensual (%) de *Crassostrea gigas* durante el cultivo suspendido en el estuario del Río Chone.

Discusión

Los cultivos de ostras en los estuarios están expuestos a grandes fluctuaciones de salinidad debido a las fuertes lluvias y las descargas de agua dulce gestionadas localmente de las presas de los ríos. La estación lluviosa trae consigo cambios en los ecosistemas estuarinos tales como descenso de la salinidad e incremento de la temperatura superficial del agua, los cuales pueden alterar los procesos de homeostasis de los organismos. *C. gigas* cultivada en el estuario del Río Chone mostró variaciones en sus respuestas inmunológicas, celulares y actividad de catalasa durante la temporada lluviosa. La viabilidad de los hemocitos osciló entre 95-98%. Solo durante el mes de febrero este parámetro descendió en el orden del 4 al 5%, coincidiendo con la caída brusca de la salinidad. El descenso de la viabilidad es una señal de daño en las células circundantes asociada a un estrés hiposmótico, ocasionado por salinidades de 10 a 12 ups durante 3 semanas continuas. Estudios *in vitro* han demostrado una disminución notable de la viabilidad de los hemocitos de *C. gigas*, hasta del 80% después de un período corto de incubación (2 o 18 horas) a bajas salinidades (Gagnaire *et al.*, 2006).

La sobrevivencia al final del cultivo se mantuvo en un rango aceptable (64%), pero con un bajo crecimiento somático. En un entorno hiposmótico el crecimiento lento se ha atribuido al aumento de la excreción de amoníaco y al metabolismo de los aminoácidos libres (Gosling, 2015), lo cual podría suponer una pérdida continua de energía para bivalvos (Tedengren & Kautsky 1986). Por ejemplo, en almejas y cárdidos, las respuestas difirieren según la intensidad del estrés por salinidad y la estación, por ejemplo, salinidades menores a 15 ups provocan una fuerte disminución de la actividad de bombeo, y de la energía disponible para el crecimiento (Domínguez *et al.*, 2020).

La disminución de la salinidad en el estuario del Río Chone, además de estar condicionada por los periodos de lluvia, depende a su vez de su hidrodinámica, el régimen de cambios de la marea y la apertura de compuertas que almacenan agua dulce (Arriaga *et al.*, 1999). Este cambio de salinidad no influyó en el contenido de hemocitos de los organismos bajo cultivo, aunque se denota una tendencia al descenso. Los conteos de hemocitos totales y diferenciales se encuentran entre los rangos comunes para la especie. Según estudios los cambios en el conteo de hemocitos en los bivalvos expuestos a baja salinidad pueden depender de la especie (Pourmozaffar *et al.*, 2020). Por ejemplo, Perrigault *et al.*, (2012) reportaron un aumento en el recuento total de hemocitos y la actividad de lisozima en la almeja *Mercenaria*, después de 2 meses de exposición a la salinidad 17 ppt. Similares respuestas han sido encontradas en hemocitos de *Chamelea gallina* y *Mytilus edulis* expuestos a baja salinidad (Matozzo *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2019).

La fagocitosis *in vitro* en *C. gigas* incrementó en los meses de alta pluviosidad, demostrando los ajustes que puede llevar a cabo la especie en el sistema inmune ante condiciones de estrés ambiental. Se conoce que la actividad fagocítica de los hemocitos en bivalvos marinos está extremadamente influenciada por las

fluctuaciones de salinidad, temperatura, xenobióticos y anhidrobiosis (Park *et al.*, 2012). En comparación, otros trabajos muestran la reducción de varios parámetros inmunitarios (concentración de hemocitos, la actividad de fagocitosis y el porcentaje de hemocitos eosinofílicos) en *Crassostrea virginica* después de una exposición a baja salinidad (Bussell *et al.*, 2008). Se observaron tendencias similares en fagocitosis, esterasa y contenido de lisosomas cuando *Mytilus coruscus* fue expuesto a diferentes niveles de salinidad (15, 25 y 35 ppt) durante un tiempo corto (5 h). Además, la actividad fagocítica y la actividad de lisozima de los hemocitos de *Chamelea gallina* disminuyeron significativamente después de 7 días de exposición a salinidades bajas (28 ppt) y altas (40 ppt) (Matozzo *et al.*, 2007). También, las elevadas temperaturas pueden afectar algunos parámetros hemocitarios e inmunológicos, evidenciándose mortalidades en masa de *C. gigas* en verano, asociado a la concentración de nutrientes inorgánicos (Soletchnik *et al.*, 2007).

En este estudio se observó una disminución en la actividad de catalasa en la hemolinfa en los organismos colectados en el mes de febrero. Esta disminución hace susceptible al sistema de defensa inmunológico celular, con una reducida posibilidad de evitar el desarrollo de daño oxidativo por inducción de los procesos fagocíticos, asociado con una excesiva producción de H₂O₂ u otras moléculas altamente reactivas. Se ha demostrado que las sub-poblaciones de granulocitos y semi-granulocitos son los ejecutores mayoritarios encargados de la eliminación de partículas extrañas por fagocitosis. Durante los procesos fagocíticos, existe la formación de moléculas oxidantes como el H₂O₂, u otras especies reactivas de oxígeno (Wang *et al.*, 2018). El desbalance entre la producción de los oxiradicales y el sistema de defensa antioxidante en los sistemas vivos ocasiona una ruptura de la función celular y daño. Este desbalance ocurre por una sobreproducción de EROs y una reducción del mecanismo de defensa antioxidante (Carvajal Carvajal, 2019), lo que puede estar relacionado con la mayor mortalidad de ostras en el cultivo.

La ostra *C. gigas* mostró incremento en el daño de las membranas lisosomales en los meses de máxima pluviosidad. Se ha determinado que cuando los hemocitos son sometidos a estrés ambiental, la membrana lisosómica se desestabiliza y aumenta la permeabilidad (Moore, 1980). El papel de los lisosomas dentro del sistema inmunológico y la digestión celular está bien establecido. Los lisosomas se desgranulan y liberan hacia la hemolinfa sustancias que median el proceso fagocítico. El rango óptimo de temperatura del agua para mantener la estabilidad de la membrana lisosomal en las ostras del Pacífico varía de 13 y 17 °C (Zhang *et al.*, 2006). Hauton *et al.*, (2001) sugiere la máxima estabilidad lisosomal de los hemocitos en *C. gigas* a 15 °C en agua con 32 ups de salinidad.

La disminución de la salinidad y el aumento de la temperatura son factores importantes que pueden regular la tasa de crecimiento de ostreidos (Heilmayer *et al.*, 2008). La tasa de crecimiento diaria de *C. gigas* fue relativamente baja (0,01 mm/día) en el periodo de estudio, relacionado a la salinidad por debajo del

intervalo óptimo para el crecimiento de la especie, 20–25 ups (FAO, 2021). En cambio, la supervivencia de ostras en el cultivo puede ser modulada por la inmunidad innata, como se ha evidenciado en variedad de invertebrados marinos, tales como camarones, ostras, mejillones y almejas (Gagnaire *et al.*, 2006; Monari *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2011). Estos cambios ambientales afectan potencialmente la resiliencia de los organismos marinos a los patógenos invasores.

Conclusiones

Los resultados demuestran un desbalance en el sistema inmune celular de *C. gigas*, asociado a las condiciones ambientales imperantes durante la temporada de lluvia, que conlleva a la disminución de la supervivencia en el cultivo. La actividad de catalasa y el daño lisosomal exhibieron cambios estrechamente relacionados con las variaciones ambientales de la temporada de mayor pluviosidad, destacando así, su sensibilidad a la baja salinidad entre los marcadores evaluados. Esta investigación propone el uso de biomarcadores celulares y enzimáticos como parámetros de evaluación de rutina para evaluar la salud de *C. gigas* en cultivo.

Agradecimientos

Esta investigación es producto del proyecto “Viabilidad del cultivo de la ostra del Pacífico *Crassostrea gigas* y la ostra perlífera *Pteria sterna* en el estuario del Río Chone, provincia de Manabí”, Ecuador' del Grupo de Investigación en Biología y Cultivo de Moluscos. Los autores agradecen la colaboración de la Escuela de Acuicultura y Pesquería de la Universidad Técnica de Manabí, la cooperación de la Administración de Puerto Amistad de Bahía de Caráquez, por permitir la logística para el uso de la balsa flotante para el cultivo experimental, y al INAMHI por proporcionar los datos de la estación meteorológica.

Referencias bibliográficas

- Aebi, H. (1984). [13] Catalase in vitro. In *Methods in Enzymology*: Vol. 105. Oxygen Radicals in Biological Systems (pp. 121–126). Academic Press. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3)
- Adzighli, L., Hao, R., Jiao, Y., Deng, Y., Du, X. & Huang, R. (2019). Immune response of pearl oysters to stress and diseases. *Reviews in Aquaculture*, 12. <https://doi.org/10.1111/raq.12329>
- Alfonso-Prieto, M., Biarnés, X., Vidossich, P., & Rovira, C. (2009). The Molecular Mechanism of the Catalase Reaction. *Journal of the American Chemical Society*, 131, 11751–11761. <https://doi.org/10.1021/ja9018572>
- Allam, B., & Raftos, D. (2015). Immune responses to infectious diseases in bivalves. *Journal of Invertebrate Pathology*, 131, 121–136. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.05.005>

- Al-Subiai, S. N., Jha, A. N., & Moody, A. J. (2008). Contamination of bivalve haemolymph samples by adductor muscle components: implications for biomarker studies. *Ecotoxicology*, 18(3), 334. <https://doi.org/10.1007/s10646-008-0287-9>
- Arriaga, L., Montaña, M., & Vásconez, J. (1999). Integrated management perspectives of the Bahía de Caráquez zone and Chone River estuary, Ecuador. *Ocean & Coastal Management*, 42(2), 229–241. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0964-5691\(98\)00055-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0964-5691(98)00055-6)
- Bussell, J. A., Gidman, E. A., Causton, D. R., Gwynn-Jones, D., Malham, S. K., Jones, M. L. M., ... Seed, R. (2008). Changes in the immune response and metabolic fingerprint of the mussel, *Mytilus edulis* (Linnaeus) in response to lowered salinity and physical stress. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 358(1), 78–85. doi:10.1016/j.jembe.2008.01.018
- Carvajal Carvajal, C. Especies reactivas del oxígeno: formación, función y estrés oxidativo. *Med. leg. Costa Rica* [online]. 2019, vol.36, n.1, pp.91-100. https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1409-00152019000100091&lng=en&nrm=iso&tlng=es
- Chainy, G., Paital, B. & Dandapat, J. (2016). An Overview of seasonal changes in oxidative stress and antioxidant defense parameters in some invertebrate and vertebrate species. *Scientifica*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/6126570>
- Chan, C. Y., & Wang, W.-X. (2019). Biomarker responses in oysters *Crassostrea hongkongensis* in relation to metal contamination patterns in the Pearl River Estuary, southern China. *Environmental Pollution*, 251, 264–276. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.04.140>
- Cheng, T. C. (1981). Bivalves. In: Ratcliffe NA, Rowley AF, editors. *Invertebrate Blood Cells* 729 New York Academic Press; 1981, p. 233-300.
- Cho, S.-M., & Jeong, W.-G. (2005). Spawning impact on lysosomal stability of the Pacific Oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquaculture*, 244(1), 383–387. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.12.013>
- Domínguez, R., Vázquez, E., Woodin, S. A., Wethey, D. S., Peteiro, L. G., Macho, G., & Olabarria, C. (2020). Sublethal responses of four commercially important bivalves to low salinity. *Ecological Indicators*, 111, 106031. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2019.106031>
- FAO (2021). Fishery statistical collections. Global Aquaculture production. In FAO Fisheries and Aquaculture Department. Retrieved from <http://www.fao.org/fishery/statistics/global-aquacultureproduction/enwww.fao.org/fishery/statistics/software/fishstatj/es>
- Fisher, W. S., Chintala, M. M., & Moline, M. A. (1989). Annual variation of estuarine and oceanic oyster *Crassostrea virginica* Gmelin hemocyte capacity. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 127(2),

- 105–120. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0022-0981\(89\)90178-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0022-0981(89)90178-0)
- Fisher, W. S., & Tamplin, M. (1988). Environmental Influence on Activities and Foreign-Particle Binding by Hemocytes of American Oysters, *Crassostrea virginica*. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 45(7), 1309–1315. <https://doi.org/10.1139/f88-153>
- Gagnaire, B., Frouin, H., Moreau, K., Thomas-Guyon, H., & Renault, T. (2006). Effects of temperature and salinity on haemocyte activities of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). Fish & Shellfish Immunology, 20(4), 536–547. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fsi.2005.07.003>
- Gagnaire, B., Soletchnik, P., Faury, N., Kerdudou, N., Moine, O. Le, & Renault, T. (2007). Analysis of hemocyte parameters in Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, reared in the field — Comparison of hatchery diploids and diploids from natural beds. Aquaculture, 264(1), 449–456. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.12.041>
- Gosling, E. (2003). Bivalve Molluscs: Biology, Ecology and Culture. Wiley-Blackwell.
- Green, T. J., Vergnes, A., Montagnani, C. & de Lorgeril, J. (2016). Distinct immune responses of juvenile and adult oysters (*Crassostrea gigas*) to viral and bacterial infections. Veterinary Research, 47(1). doi:10.1186/s13567-016-0356-7
- Guo, X., He, Y., Zhang, L., Lelong, C. & Jouaux, A. (2015). Immune and stress responses in oysters with insights on adaptation. Fish & Shellfish Immunology, 46(1), 107–119. doi: 10.1016/j.fsi.2015.05.018
- Hauton, C., Hawkins, L. E., & Hutchinson, S. (1998). The use of the neutral red retention assay to examine the effects of temperature and salinity on haemocytes of the European flat oyster *Ostrea edulis* (L). Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 119(4), 619–623. doi: 10.1016/S0305-0491(98)00036-4
- Hauton, C., Hawkins, L. E., & Hutchinson, S. (2001). Response of haemocyte lysosomes to bacterial inoculation in the oysters *Ostrea edulis* L. and *Crassostrea gigas* (Thunberg) and the scallop *Pecten maximus* (L.). Fish & Shellfish Immunology, 11(2), 143–153. doi:10.1006/fsim.2000.0301
- Heilmayer, Olaf, Julian Digialleonardo, Lianfen Qian, and Guritno Roesijadi. 2008. “Stress Tolerance of a Subtropical *Crassostrea Virginica* Population to the Combined Effects of Temperature and Salinity.” Estuarine, Coastal and Shelf Science 79(1):179–85. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2008.03.022>.
- Liu, X., & Wang, W.-X. (2016). Time changes in biomarker responses in two species of oyster transplanted into a metal contaminated estuary. Science of The Total Environment, 544, 281–290. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.11.120>

- Lodeiros, C., Rodríguez-Pesantes, D., Márquez, A., Revilla, J., Chávez-Villalba, J., & Sonnenholzner, S. (2018). Suspended cultivation of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in the Eastern Tropical Pacific. *Aquaculture International*, 26(1), 337–347. <https://doi.org/10.1007/s10499-017-0217-z>
- Lowe, D., Moore, M., & Evans. (1992). Contaminant impact on interactions of molecular probes with lysosomes in living hepatocytes from dab *Limanda*. *Marine Ecology Progress Series*, 91. <https://doi.org/10.3354/meps091135>
- Matozzo, V., Monari, M., Foschi, J., Serrazanetti, G. P., Cattani, O. & Marin, M. G. (2007). Effects of salinity on the clam *Chamelea gallina*. Part I: alterations in immune responses. *Marine Biology*, 151(3), 1051–1058. <https://doi.org/10.1007/s00227-006-0543-6>
- Melo, E. M. C., Sühnel, S., Oliveira, A. C. S. de, Lopes, B. de O., Bachi, G. C., & De Melo, C. M. R. (2020). Growth, mortality and reproductive traits of diploid and triploid Pacific oysters (*Crassostrea gigas*, Thunberg, 1793) in Southern Brazil. *Aquaculture Research*, 51(9), 3631–3640. <https://doi.org/10.1111/are.14713>
- Mondol, M. R., Kim, C.-W., Kang, C.-K., Park, S. R., Noseworthy, R. G., & Choi, K.-S. (2016). Growth and reproduction of early grow-out hardened juvenile Pacific oysters, *Crassostrea gigas* in Gamakman Bay, off the south coast of Korea. *Aquaculture*, 463, 224–233. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.05.047>
- Monari, M., Matozzo V., Foschi J., Cattani O., Serrazanetti G. P. & Marin M. G.. 2007. Effects of high temperatures on functional responses of haemocytes in the clam *Chamelea gallina*.” *Fish & Shellfish Immunology* 22(1):98–114. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2006.03.016>.
- Moore, M.N., 1980. Cytochemical determination of cellular responses to environmental stressors in marine organisms. *Rapp. P.-V. Réun. Cons. Int. Explor. Mer.* 170, 7–15.
- Nuseti, O., Marcano, L., Zapata Vivenes, E., Esclapés, M., Nuseti, S., & Lodeiros, C. (2004). Respuestas inmunológicas y de enzimas antioxidantes en la ostra perla *Pinctada imbricata* (Mollusca: Pteridae) expuesta a niveles subletales de fuel oil no6. *Interciencia*, 29, 324–328.
- Park, K.-I., Donaghy, L., Kang, H.-S., Hong, H.-K., Kim, Y.-O., & Choi, K.-S. (2012). Assessment of immune parameters of manila clam *Ruditapes philippinarum* in different physiological conditions using flow cytometry. *Ocean Science Journal*, 47(1), 19–26. doi:10.1007/s12601-012-0002-x
- Perrigault, M., Dahl, S. F., Espinosa, E. P., & Allam, B. (2012). Effects of salinity on hard clam (*Mercenaria mercenaria*) defense parameters and QPX disease dynamics. *Journal of Invertebrate Pathology*, 110(1), 73–82. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jip.2012.02.004>
- Pourmozaffar, S., Tamadoni Jahromi, S., Rameshi, H., Sadeghi, A., Bagheri, T., Behzadi, S., Gozari, M., Zahedi, M. R. & Abrari Lazarjani, S. (2020). The role

- of salinity in physiological responses of bivalves. *Reviews in Aquaculture*, 12(3), 1548–1566. <https://doi.org/10.1111/raq.12397>
- Rahman, M. A., Henderson, S., Miller-Ezzy, P., Li, X. X., & Qin, J. G. (2019). Immune response to temperature stress in three bivalve species: Pacific oyster *Crassostrea gigas*, Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* and mud cockle *Katelaysia rhytiphora*. *Fish & Shellfish Immunology*, 86, 868–874. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.12.017>
- Reynaga-Franco, F., Grijalva-Chon, J., Castro-Longoria, R., Barraza-Guardado, R., Arreola-Lizárraga, J., & Chávez-Villalba, J. (2018). Biological performance of *Crassostrea gigas* stocks produced at different hatcheries and cultivated under same environmental conditions. *Aquaculture Research*. doi:10.1111/are.13940
- Ringwood, A., Hogue, J., Keppler, C., Gielazyn, M., Ward, B., & Rourk, A. (2003). Cellular Biomarkers (Lysosomal Destabilization, Glutathione & Lipid Peroxidation) in Three Common Estuarine Species: A Methods Handbook.
- Schmitt, P., Rosa, R. D., Duperthuy, M., de Lorgeril, J., Bachère, E., & Destoumieux-Garzón, D. (2012). The Antimicrobial Defense of the Pacific Oyster, *Crassostrea gigas*. How Diversity may Compensate for Scarcity in the Regulation of Resident/Pathogenic Microflora. *Frontiers in Microbiology*, 3. doi:10.3389/fmicb.2012.00160
- Sokal R. & Rohlf J. (2012). *Biometry: the principles and practice of statistics in biological research*, Fourth edition. WH Freeman and Company. San Francisco.
- Soletchnik, P., Ropert, M., Mazurié, J., Gildas Fleury, P., & Le Coz, F. (2007). Relationships between oyster mortality patterns and environmental data from monitoring databases along the coasts of France. *Aquaculture*, 271(1-4), 384–400. doi:10.1016/j.aquaculture.2007.02.049
- Tedengren, M., & Kautsky, N. (1986). Comparative study of the physiology and its probable effect on size in Blue Mussels (*Mytilus Edulis* L.) from the North Sea and the Northern Baltic Proper. *Ophelia*, 25. <https://doi.org/10.1080/00785326.1986.10429746>
- Treviño, L., Lodeiros, C., Vélez-Falcones, J., Chávez-Alcivar, C., Isea-León, F., Bermúdez-Medrandá, A. E., Vélez-Chica, J. C., Cruz-Quintana, Y., Leal, D., Santana-Piñeros, A. M., & Rodríguez-Pesantes, D. (2020). Suspended culture evaluation of Pacific oyster *Crassostrea gigas* in a tropical estuary. *Aquaculture Research*, *Aquaculture Research*. 00:1–10. <https://doi.org/10.1111/are.14556>
- Troost, K. (2010). Causes and effects of a highly successful marine invasion: Case-study of the introduced Pacific oyster *Crassostrea gigas* in continental NW European estuaries. *Journal of Sea Research*, 64(3), 145–165. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.seares.2010.02.004>
- Wang, L., Song, X., & Song, L. (2018). The oyster immunity. *Developmental & Comparative Immunology*, 80, 99–118. doi:10.1016/j.dci.2017.05.025

- Wang, Y., Hu, M., Shin, P. K. S. & Cheung, S. G. (2011) Immune responses to combined effect of hypoxia and high temperature in the green-lipped mussel *Perna viridis*. *Marine Pollution Bulletin* 63(5):201–8. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.05.035>.
- Wang, W., Li, M., Wang, L., Chen, H., Liu, Z., Jia, Z., Qiu, L., & Song, L. (2017). The granulocytes are the main immunocompetent hemocytes in *Crassostrea gigas*. *Developmental & Comparative Immunology*, 67, 221–228. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.dci.2016.09.017>
- Wu, F., Falfushynska, H., Dellwig, O., Piontkivska, H., & Sokolova, I. M. (2020). Interactive effects of salinity variation and exposure to ZnO nanoparticles on the innate immune system of a sentinel marine bivalve, *Mytilus edulis*. *Science of The Total Environment*, 712, 136473. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.136473>
- Zapata-Vívenes, E., Rojas de Astudillo, L., Sánchez, G., & Barreto, M. (2012). Metales pesados y biomarcadores relacionados en *Perna viridis* (Bivalvia: Mytilidae) recolectado en las costas del estado Sucre, Venezuela. *Ciencias Marinas*, 38, 517–528. Retrieved from http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-38802012000400004&nrm=iso
- Zhang, Z., Li, X., Vandeppeer, M., & Zhao, W. (2006). Effects of water temperature and air exposure on the lysosomal membrane stability of hemocytes in pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture*, 256(1), 502–509. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.02.003>