Universidad Autónoma de Baja California



Facultad de Ciencias Marinas



Efecto de la temperatura sobre la respuesta inmune celular de la almeja de sifón*, Panopea globosa* (Dall ,1898)

Tesis Que para obtener el título de Licenciada en Biotecnología en Acuacultura

> Presenta: Linda Sinaí Hernández Méndez

> > Ensenada Baja California México

Universidad Autónoma de Baja California Facultad de Ciencias Marinas

Efecto de la temperatura sobre la respuesta inmune celular de la almeja de sifón, *Panopea globosa* (Dall 1898)

Tesis Que para obtener el título de Licenciada en Biotecnología en Acuacultura

Presenta: Linda Sinaí Hernández Méndez

Aprobado por

Dra. Sheila Castellanos Martínez Directora de tesis

Soul Cacure ?

Dr. Zaúl García Esquivel Secretario

Dr. Oscar Basilio del Río Zaragoza Vocal

Resumen

Los hemocitos son células efectoras de la defensa inmune celular de bivalvos, lo cual realizan mediante las actividades de fagocitosis y producción de radicales de oxígeno (ROS). Ambos son aspectos sensibles a alteraciones en el ambiente (temperatura, salinidad, pH), infecciones por patógenos e inclusive a la presencia de contaminantes. Por ello, el número total, diferencial así como las actividades funcionales que los hemocitos realizan se utilizan como indicadores para evaluar el estado de salud de los bivalvos. Panopea globosa es una especie endémica de la Península de Baja California con significativo valor comercial. Sin embargo, no se tiene información referente al funcionamiento de su sistema inmune y menos aún, bajo diferentes temperaturas de aclimatación. El presente estudio tuvo por objetivo evaluar la capacidad fagocítica y producción intracelular del radical superóxido a 30, 60 y 120 min en los hemocitos de *P. globosa* expuesta a distintas temperaturas de aclimatación (15°C, 25 °C, 30 °C; 20 °C grupo control). El recuentro total de células varió de 2-9 x 10^5 hemocitos ml⁻¹, siendo significativamente (p < 0.05) más bajo en almejas aclimatadas a 15° C y más alto en aquellas a 30 °C. La viabilidad celular varió de 81-83% sin diferencias significativas (p>0.05) entre los tratamientos. La hemolinfa está conformada por tres subpoblaciones de hemocitos: hialinocitos grandes (12-18 µm) y hialinocitos pequeños (4-12 µm), que son células con pocos gránulos en el citoplasma celular; y granulocitos (12-18 µm), células con numerosos gránulos en el citoplasma. Todas las subpoblaciones celulares fagocitan partículas siendo los granulocitos las células más activas. No obstante, en todos los tiempos de incubación, se observó que la actividad fagocítica de las células tiende a disminuir (p>0.05) en almejas aclimatadas a 30° C. Los resultados obtenidos indican que el número total de hemocitos es afectado por la temperatura por lo cual, podría ser utilizado como indicador para evaluar el bienestar de *P. globosa*. Por su parte, las actividades defensivas de los hemocitos sufren ligeras alteraciones, principalmente después de 120 min de incubación, aunque éstas no son inhibidas, lo que sugiere que este bivalvo está adaptado a las amplias variaciones de temperatura a las que está expuesto de manera natural.

Palabras clave: *Panopea globosa*, temperatura, hemocitos, fagocitosis, estallido respiratorio.

Agradecimientos.

Quiero agradecer a dios por las bendiciones que me ha brindado.

A Juana Argelia Méndez Gómez

Gracias mamá por todo el apoyo, por cuidarme y por los innumerables sacrificas que ha realizado por mí y mis hermanos eres una gran mujer y extraordinaria madre sin duda alguna la mejor madre del mundo

A Gabriel Hernández Velázquez

Padre verdaderamente eres un padre maravillo no puedo imaginar un mejor padre gracias por todo el apoyo compresión, cariño por consejos valioso que me has dado que me guiaran toda la vida, los atesorare siempre.

A Perla Gabriela Hernandez Méndez y Abraham Hernández Méndez

Gracias por las incontables alegrías que me han brindado, por sus sacrificios y apoyo incondicional los amo son lo más hermoso que tengo en mi vida

A Misael Alejandro Rodríguez Cota

Gracias por el apoyo que me has brindado por abrirme las puertas de tu hogar y compartir grandes momentos recuerdos y sonrisas, pero sobre todo gracias por brindarme todo el cariño y amor que me has demostrado.

A Dra. Sheila Castellanos Martínez

Gracias por la confianza, los consejos, orientación, por sus conocimientos compartidos, por todas las atenciones que ha tenido hacia mi persona, pero sobre

todo gracias por la infinita paciencia que me ha brindado.

A Dr. Zaúl García Esquivel

Gracias por permitirme participar en el laboratorio de moluscos, por compartir sus historias, pero sobre todo gracias por la confianza que me brindo nunca lo olvidare. *A Dr. Oscar Basilio Del Río Zaragoza y Dra. Cynthia Lizzeth Araujo Palomares*

Gracias por la disponibilidad, enseñanzas, el apoyo, sugerencias y tiempo invertido en la realización de este trabajo muchísimas gracias.

A Yesenia, Ramsés, Nayel, Angell y Andres.

Gracias por brindarme alojamiento cuando lo necesite por compartir sus alimentos conmigo, por siempre escuchar y estar en los momentos difíciles, pero sobre todo gracias por todo el cariño, y apoyo incondicional los quiero y aprecio a cada uno de ustedes.

A Alejandra, Gabriel y Marco

Gracias por compartir sus experiencias consejos y conocimiento fueron una parte importante en mi formación infinitamente gracias.

Índice	Pag.
Página de aprobación	Ι
Resumen	II
Agradecimientos	IV
Índice	VI
Lista de tablas	VII
Lista de figuras	VII
1. Introducción	1-6
2. Hipótesis	7
3. Objetivos	7
3.1 Objetivos generales	7
3.2 Objetivos específicos	7
4. Metodología	8
4.1Obtención y aclimatación de organismos	8
4.2Diseno experimental.	9 9
4.3 (RTH)	<i>a giobosa.</i> 9 9
4.3.2Caracterización morfológica de hemocitos por microscopía óptic	ca 10
4.3.3Caracterización morfológica de hemocitos por microscopía e	lectrónica de
transmisión (MET)	11
4.3.4 Evaluación de la capacidad fagocítica de los hemocitos	11
4.3.5 Estallido respiratorio	13
4.4 Análisis estadístico	13
5. Resultados	14
5.1 Caracterización morfológica de hemocitos por microscopía óptica	y electrónica
de transmision (ME1).	14
5.2 Caracterización de hemolinfa y recuento total de hemocitos (RTH)	18
5.2.2 Fagocitosis	20
5.2.3 Estallido respiratorio	24
6. Discusión	25
7. Conclusiones	32
8. Referencias	33

Lista de figuras	Pag.
Figura 1. Localidad de extracción de Panopea globosa	9
Figura 2. Micrografías de las subpoblaciones de hemocitos caracterizadas en la hemolinfa de <i>Panopea globosa</i> .	16
Figura 3. Micrografías electrónicas de transmisión de los hemocitos de <i>Panopea globosa</i> .	17
Figura 4. Recuento total de hemocitos de <i>Panopea globosa</i> mantenidas a diferentes temperaturas.	19
Figura 5. Variación de las subpoblaciones de hemocitos en la hemolinfa de <i>P. globosa</i> en función de la temperatura.	19
Figura 6. Actividad fagocítica de los hemocitos.	22
Figura 7. Índice de partículas fagocitadas	23
Figura 8. Micrografía de hemocitos mostrando la producción del radical superóxido en hemocitos de <i>Panopea globosa</i>	24
Figura 9. Producción del radical superóxido en hemocitos de <i>Panopea globosa</i> .	25

Lista de tablas

Tabla I. Hemograma registrado en la hemolinfa de Panopea	16
globosa (n=10 mantenidas a 20° C).	

1. Introducción.

Panopea globosa es un moluscos bivalvo de importancia comercial que se distribuye en ambas costas del Golfo de California y en Bahía Magdalena Baja California Sur (Rivera, 2010). Esta especie habita desde 10 hasta 100 m de profundidad (Coan y Valentich, 2012) y se encuentra expuesta a amplias variaciones de temperatura de manera natural (16^{0} C - 30^{0} C) (Aragón-Noriega et al., 2007; Arambula-Pujol Edna et al., 2008; Calderon-Aguilera et al., 2010). Son organismos dioicos cuya gametogénesis y desove transcurre de otoño a invierno cuando la temperatura superficial del mar se encuentra entre 17^{0} C y 21^{0} C (Aragón-Noriega et al., 2007; Arambula-Pujol et al., 2008; Calderon-Aguilera et al., 2010).

P. globosa es un producto de alto valor comercial para el mercado asiático principalmente Japón, Corea y China siendo este último el mayor comprador. Solo del 2005-2010 se extrajeron 841 ton de *P. globosa* representando 77% de la pesca total del género *Panopea*, posicionándose como una de las principales pesquería artesanales del Estado de Baja California (Carta estatal pesquera). En este sentido, la acuicultura representa una alternativa para evitar la sobreexplotación de los bancos naturales. Por ello se ha desarrollado la tecnología de cultivo de esta especie (García-Esquivel et al., 2013; Quintana-Lopez, 2015) y a la par de ello, se han estudiado aspectos claves tales como desarrollo gonádico (Tapia-Morales, 2014; Arcos-Ortega et al., 2015), alimentación, tasas de crecimiento y supervivencia en

condiciones de laboratorio (Ferreira-Arrieta et al., 2015; Tapia- Morales et al., 2015). No obstante, se conoce que las condiciones de cultivo favorecen la transmisión de patógenos (Berthe, 2005). En el caso de las especies del genero Panopea spp. Este tema aún es poco conocido. Algunos estudios han descrito verrugas color crema a rosado-grisáceo, ampollas con un líquido transparente, cicatrices y verrugas de color naranja que afecta el manto y sifón en Panopea generosa (Bower y Blackbourn, 2003). En Panopea abbreviata, se han observado bacterias tipo Rickettsia en las células epiteliales de los túbulos de la glándula digestiva, ciliados en branquias y con menor prevalencias en los palpos labiales, así como protozoarios en las células epiteliales del intestino, gregarinas en el tejido conectivo del manto, nemertinos (Malacobdella arrokeana) en la cavidad del manto (Vázquez, 2015). También se han observado turbelarios (Paravortex panopea) en el lumen del intestino (Brusa et al., 2011; Vázquez et al., 2015). En Panopea globosa recientemente se ha podido aislar y cultivar el protozoario Uronema marium extraído de tejido dañado similar al descrito por Cáceres Martínez (2015). El tejido se encontraba parcialmente lacerado provocando la formación de agujeros que dan la apariencia de un tejido cavernoso invadido por numerosos protozoarios (Pérez Bustamante, 2017). Sin embargo, no se tiene información relacionada con el funcionamiento del sistema inmune de Panopea globosa.

Al igual que en el resto de moluscos el sistema inmune de *P.globosa* se encuentra restringido por una inmunidad innata, por lo tanto, no presenta especificidad antígeno anticuerpo (Vargas y Barracco, 2001). En moluscos, el sistema inmune está integrado por componentes humorales compuesto por proteínas plasmáticas como lisinas, lectinas, péptidos bioactivos, y citosinas (Anisimova, 2013); así como de componentes celulares, éstos son propiamente los hemocitos, los cuales se distribuyen a todo el organismo por medio de la hemolinfa (Vargas y Barracco, 2001).

Los hemocitos pueden clasificarse de acuerdo con la cantidad de gránulos presente en su citoplasma la afinidad a los colorantes morfología y función (Hine, 1999; Anisimova, 2013). Sin embargo, el criterio más aceptado para clasificar a los hemocitos ha sido el de Cheng (1984) el cual establece dos grandes grupos: hialinocitos o células agranulares que pueden tener pocos o ningún granulo; y granulocitos o células granulares los cuales, se caracterizan por tener una gran cantidad de gránulos dispersos en el citoplasma. Cabe resaltar que, en cualquier caso, no existe un número estándar de gránulos que caracterice a uno y otro grupo de células. Así se han identificado hemocitos irregulares, acidófilos, basófilos, pueden presentar un solo núcleo esférico, ovoide o en forma de herradura; y ocasionalmente se observan células binucleadas (Hine, 1999). Por ejemplo, en la ostra perlera Pinctada fucata los hemocitos se clasificaron en hialinocitos pequeños

(1 a 3 μ m), hialinocitos grandes (5 a 8 μ m) y granulocitos (3 a 5 μ m) (Li et al., 2015). Sin embargo el diámetro de los hemocitos varía entre las especies registrando tamaños para hialinocitos grandes que rondan 6-15 μ m, de 1-7 μ m los hialinocitos pequeños y granulocitos entre 7-13 μ m (Li et al., 2015; Vieira et al., 2017 y Li et al.2018). En el caso de la almeja gigante *Tridacna crocea* se encontraron tres subpoblaciones de hemocitos granulares una de las cuales, se clasifico como "tipo mórula" y se caracterizan por ser las células de mayor tamaño, en relación al resto de hemocitos (Nakayama et al., 1997).

Los hemocitos cumplen diferentes funciones tales, como el transporte y la digestión de nutrientes, y la reparación de tejidos dañados. Sin embargo, su participación más sobresaliente es la defensa contra agentes no propios del organismo ante los cuales, las distintas subpoblaciones de hemocitos tienen funciones diferentes en relación a la defensa inmune. Por tanto, la variación de la proporción de dichas subpoblaciones podría tener efectos importantes en la inmunocompetencia de los organismos (Ellis et al., 2011). La defensa celular se realiza por medio de un proceso denominado fagocitosis en el cual, la célula envuelve a todo lo que sea ajeno al organismo para su posterior eliminación mediante síntesis y liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Anisimova, 2013; Pila et al., 2016), también denominado estallido respiratorio, en el cual se

liberan radicales de oxígeno tales como anión superóxido (O₂), hidróxido (OH) y peróxido de hidrogeno (H₂O₂) (Anisimova, 2013; Pila et al., 2016), que son producidos una vez que la célula ha fagocitado un patógeno (Donaghy et al., 2012; Carrillo et al., 2016). Ambos aspectos funcionales de los hemocitos han sido evaluados en especies como *Mytilus galloprovincialis* y *Littorina littorea* (Carballal et al., 1997; Gorbushin and Iakovleva, 2007).

Los parámetros funcionales de los hemocitos son sensibles a diversos factores tanto internos como externos. La abundancia, así como la proporción de las subpoblaciones de hemocitos varían según la especie (Hine, 1999). Ambos aspectos se ven influenciados por factores como temperatura, salinidad, pH, amonio a los cuales se entren expuestos los organismos (Cheng et al., 2004; Gagnaire et al., 2006; Ding et al., 2016). Por tanto, los parámetros funcionales de los hemocitos se han empleado para monitorear el estado de salud de los organismos (Fournier et al., 2001). Por ejemplo, el aumento o disminución del número total de hemocitos en moluscos puede reflejar estrés fisiológico derivado de cambios ambientales, exposición a contaminantes o patógenos (Gagnaire et al., 2006; Yu et al., 2009; Giuliano y Fontanetti, 2010; Ding et al., 2016). En acuicultura, es importante poder predecir períodos de mayor estrés, ya que éstos se han asociado a la inmunodepresión de los organismos y por tanto a brotes de enfermedades (Hooper et al., 2014). En Crassostrea virginica, Chamelea gallina y *Mactra veneriformis* el incremento de la temperatura disminuye la capacidad fagocítica de los hemocitos (Hégaret et al., 2003; Monari et al., 2007; Yu et al., 2009). Del mismo modo, la producción de ROS en el abulón *Haliotis discus hannai* se vio afectada por el incremento de la temperatura (Ding et al., 2016).

Panopea globosa es una especie de notable relevancia económica para el sector pesquero y acuícola de Baja California. Para proporcionar un producto de calidad, es necesario obtener y mantener organismos sanos sin embargo, en la cadena productiva y de distribución existen condiciones tales como exposición al aire, al sol o bien, el traslado en contenedores no adecuados para el correcto transporte de los organismos, lo que originan estrés en los mismos y a su vez, puede suprimir su sistema inmune y favorecer el desarrollo de enfermedades (Mydlarz et al., 2006; Hurtado-Oliva et al., 2015). El estudio de la condición del sistema inmune de los organismos aporta herramientas para detectar su estado de salud, lo cual es particularmente relevante en especies que, como *P. globosa*, tienen relevancia acuícola y pesquera (Giuliano y Fontanetti, 2010; Hooper et al., 2014). Por ello, estudios como el que aquí se presenta, son necesarios para aportar conocimiento relativo a la defensa inmune de esta especie.

2. Hipótesis

La temperatura ambiental a la que están expuestos los bivalvos modula los parámetros inmunes de estos moluscos. Por tanto, el incremento de la temperatura ocasionará un aumento en el número total de hemocitos, así como en la actividad fagocítica y producción de ROS de los mismos, pero disminuirá la viabilidad celular.

3. Objetivos

3.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de la temperatura sobre la respuesta inmune celular de los hemocitos de *Panopea globosa*.

3.2 Objetivos específicos

- Caracterizar los hemocitos de *Panopea globosa* mediante microscopía óptica y electrónica de transmisión.
- Determinar el efecto de la temperatura (15° C, 25° C y 30° C) sobre el número total de hemocitos en la hemolinfa de *Panopea globosa*.
- Determinar el efecto de la temperatura (15° C, 25° C y 30° C) sobre la viabilidad de los hemocitos de *Panopea globosa*.
- Determinar el efecto de la temperatura sobre la actividad fagocítica de los hemocitos de *Panopea globosa*.
- Determinar el efecto de la temperatura sobre el estallido respiratorio de los hemocitos de Panopea globosa.

4. Metodología

4.1 Obtención y aclimatación de organismos

Se obtuvieron 34 almejas adultas de San Felipe, B.C. (Figura 1) las cuales pesaron entre 738 y 1,295 \pm DS 133g y fueron trasladadas al laboratorio de Biotecnología de Moluscos del Instituto de Investigaciones Oceanológicas de la UABC en Ensenada, B.C. De éstas, un grupo de almejas (n=4) se utilizó para evaluar el estatus inmune inicial, previo a la aclimatación (denominadas tiempo cero, T0). Las almejas restantes se mantuvieron en aclimatación por 18 días a 20°C en tanques de 500 L con sistema abierto. Durante este periodo, se suministró a las almejas una dieta viva de *lsochrysis galbana* y *Pavlova pinguis* complementada con pasta (concentrado de *lsochrysis galbana* y *Pavlova pinguis*)



Figura 1. Localidad de extracción de Panopea globosa (tomado de: INEGI, 2018)

4.2 Diseño experimental

Una vez concluido el periodo de aclimatación las almejas se subdividieron en un grupo control conformado por 17 organismos mantenidos a 20° C ya que, es la temperatura óptima de alimentación de esta especie (García-Esquivel et al., 2014). Asimismo, se establecieron grupos experimentales a temperaturas de 15° C, 25° C y 30° C. Al momento de procesar las almejas de los grupos experimentales, se seleccionaron aleatoriamente también cinco almejas del grupo control para ser procesadas al mismo tiempo que aquellas mantenidas a 15° C. Asimismo, cuatro almejas del grupo control se procesaron al mismo tiempo que aquellas aclimatadas a 25° C y 30° C, respectivamente. En relación a la temperatura, ésta se incrementó o disminuyó gradualmente (1° C^{-día}) hasta alcanzar la deseada según el tratamiento correspondiente (15° C, 25° C o 30° C). Una vez ocurrido lo anterior, las almejas se mantuvieron durante 48 h en la respectiva temperatura de experimentación tras lo cual, se procedió a realizar el muestreo. Durante el periodo experimental, a todos los organismos se les suministró una dieta de las microalgas vivas lsochrysis galbana y Pavlova pinguis.

4.3 Caracterización morfológica y funcional de hemocitos de Panopea globosa

4.3.1 Extracción de hemolinfa y recuento total de hemocitos (RHT)

Se extrajo una muestra de hemolinfa de la cavidad pericárdica de las almejas utilizando una jeringa de 1 ml (0.9×25 mm), previamente cargada con

antiagregante (Modified Alsever's Solution: glucosa 20.8 g; citrato de sodio 8 g; EDTA 3.36 g; NaCl 22.3 g) en proporción 1:1. Las muestras se colocaron en viales y se mantuvieron en hielo hasta su uso. El número total de hemocitos (RHT) se cuantificó con una cámara de Neubauer. El ensayo de viabilidad celular se realizó mediante el método de exclusión azul tripán de acuerdo con Yao y Somero (2012) en el cual, las células muertas se tiñen de azul mientras que, las células vivas permanecen incoloras. El porcentaje de viabilidad celular se estimó de acuerdo con la siguiente fórmula:

% viabilidad =
$$\left(\frac{no. hemocitos teñidos}{no. total células}\right) \times 100$$

4.3.2 Caracterización morfológica de hemocitos por microscopía óptica

Con la hemolinfa extraída de cada almeja en las condiciones antes mencionadas se elaboraron, por triplicado, monocapas de hemocitos (1×10^4) en agua de mar filtrada y estéril (FSSW). Las monocapas se incubaron en cámara húmeda durante 30 min a temperatura ambiente (22-24° C) para permitir la adhesión celular en portaobjetos de vidrio. Posteriormente, se tiñeron con Hemacolor® de acuerdo con el protocolo del fabricante y se observaron en un microscopio óptico Axiostar (Zeiss). Se midieron, al menos, 100 hemocitos de cada tipo para determinar los tamaños de las diferentes células presentes en la hemolinfa de *P. globosa* utilizando el software ZEN (Zeiss).

4.3.3 Caracterización morfológica de hemocitos por microscopía electrónica de transmisión (MET)

La ultraestructura de los hemocitos se analizó mediante microscopía electrónica de transmisión (MET). Para ello, se extrajo una muestra de hemolinfa de la cavidad pericárdica de las almejas mantenidas 20° C utilizando una jeringa de 1 ml (0.9×25 mm), previamente cargada con glutaraldehído 2.5% en tampón cacodilato de sodio 0.2 M, pH 7.4. La fijación de las muestras se realizó durante 2h a 4° C tras lo cual se lavaron en el mismo tampón y se postfijaron en OsO4, 2% en las mismas condiciones de tiempo y temperatura antes mencionadas. Posteriormente, las células se deshidrataron en una serie gradual de etanol (15, 30, 50, 75 y 100%) durante 2h en cada concentración y se incluyeron en resina Spurr (EMS). Finalmente, se realizaron cortes ultrafinos de 70 nm de grosor en un ultramicrotomo Leica Ultracut R. Los cortes se montaron en rejillas de cobre con formvar/carbón, se tiñeron con acetato de uranilo y citrato de plomo, y se observaron en un microscopio electrónico de transmisión Hitachi H7500 a un voltaje de 80 keV..

4.3.4 Evaluación de la capacidad fagocítica de los hemocitos

La evaluación de la capacidad fagocítica de los hemocitos se realizó en todas las almejas en los diferentes tratamientos térmicos se realizó de acuerdo con Carballal et al., (1997). Se elaboraron, por triplicado, monocapas con $1 \times$

 10^4 hemocitos/ml en FSSW incubadas en cámara húmeda, a temperatura ambiente, durante 30 min para permitir la adhesión de las células. A cada preparación se le agregó zimosán (SIGMA) en proporción 1:10 (hemocito: zimosán) y se incubaron durante 30, 60, y 120 min a temperatura ambiente (22- 24° C) tras lo cual, el zimosán no fagocitado se lavó con FSSW. Las preparaciones se fijaron en metanol durante 1min y se tiñeron con el kit de tinción rápida Hemacolor®, siguiendo las indicaciones del fabricante. El número de células fagocíticas se cuantificó en, al menos, 200 células en total observadas en 10 campos seleccionados al azar usando un microscopio compuesto Carl Zeiss primo star a una magnificación de 400 ×. El porcentaje de células fagocíticas y el índice de partículas fagocitadas (IPF) se estimaron, respectivamente, de acuerdo con Oliver y Fisher (1995) como se indica a continuación:

% céls fagocíticas =
$$\left(\frac{no. cels. con zimosán}{no. total céls. analizadas}\right) \times 100$$

$$IPF = \frac{no. partículas fagocitadas}{no. céls. fagocíticas}$$

4.3.5 Estallido respiratorio

El estallido respiratorio se determinó mediante la prueba de nitroazul de tetrazolio (NBT) en la cual, la presencia del radical superóxido utilizado para eliminar potenciales patógenos se demuestra mediante la formación de depósitos de formazán color azul-morado (Carballal et al., 1997). Para ello, se elaboraron monocapas de 1×10^4 hemocitos/ml. Para estimular las células se añadió zimosán en proporción 1:10 (hemocito: zimosán) y se incubaron en 0.1% NBT durante 60 min, en cámara húmeda, a temperatura ambiente (22-24° C). En los controles se añadieron 100 µl FSSW. Para verificar la especificidad de la reacción, se elaboraron monocapas en las que, además de NBT y zimosán se añadió el inhibidor SOD (300U/ml) para verificar la especificidad de la reacción. Finalmente, las monocapas se fijaron en glutaraldehido 1.25% en FSSW. Todas las preparaciones se elaboraron por triplicado. Se cuantificaron, al menos, 200 células en un microscopio compuesto Carl Zeiss primo star a una magnificación de 400×.

4.4 Análisis estadístico

Los datos se analizaron con el software SigmaPlot 9 (Systat Software, Inc., San Jose, CA, EE.UU.) mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA), seguido de una prueba de Tukey cuando fue necesario. La normalidad de las variables se analizó con la prueba de Kolmogorov-Smirnov mientras que, la prueba de Levene se utilizó para verificar la homogeneidad de varianzas. Cuando los datos no siguieron una distribución normal, se analizaron con la prueba de Kruskal-Wallis seguida de la prueba de comparaciones múltiples Holm-Sidak o la prueba de Dunn. Los resultados se expresaron como la media \pm desviación estándar (DS) de la muestra y se consideraron significativos a una *p*<0.05.

5. Resultados

5.1 Caracterización morfológica de hemocitos por microscopía óptica y electrónica de transmisión (MET)

En la hemolinfa de la almeja *P. globosa* se identificaron dos subpoblaciones de hemocitos: granulocitos y hialinocitos (Fig. 2). Los hialinocitos, a su vez, se clasificaron en dos subtipos: hialinocitos pequeños y hialinocitos grandes (Tabla1). Los hialinocitos pequeños son células redondeadas que en promedio miden 8 ± 0.16 µm de diámetro, el núcleo es redondeado, central, basófilo y presenta pocos gránulos en el citoplasma celular del que derivan pequeños pseudópodos (Fig. 2C). Los hialinocitos pequeños son las células menos representadas en la hemolinfa de la almeja (Tabla 1). Los hialinocitos grandes miden en promedio 13 ± 1 µm de diámetro, presentan núcleo central a excéntrico, redondeado, acidófilo (Fig. 2A), presentan pocos gránulos en el citoplasma y gran capacidad de extensión de pseudópodos (Fig. 2A, 2B). Los hialinocitos grandes son las células más abundantes en la hemolinfa de *P. globosa* y muestran una proporción núcleo/citoplasma similar a la de los hialinocitos pequeños (Tabla I). Los

granulocitos miden en promedio $11\pm0.33 \,\mu$ m de diámetro, el núcleo es redondeado y excéntrico, basófilo, presentan numerosos gránulos basófilos en el citoplasma (Fig. 2D). La proporción núcleo/citoplasma de los granulocitos es menor que en los hialinocitos y son células menos abundantes que los hialinocitos grandes (Tabla I). El análisis ultraestructural confirma la presencia de las distintas subpoblaciones celulares. Los hialinocitos pequeños muestran un núcleo ovalado, excéntrico, con visible heterocromatina condensada principalmente, en la periferia del mismo (Fig. 3A-B).

En el citoplasma se distinguen pocos gránulos electron-claros y electron-densos (Fig. 3 A-B). La membrana celular muestra pseudópodos muy pequeños (Fig. 3 A-B). La abundancia de hialinocitos grandes fue evidente (Fig. 3C). Estas células muestran núcleo circular, excéntrico, con notable heterocromatina condensada (Fig. 3C-D). En el citoplasma celular se observan pocos gránulos principalmente, electron-claros, numerosas mitocondrias electron-densas y vacuolas (Fig. 3C-D). Ambos tipos de hialinocitos muestran abundantes vesículas y depósitos de glicógeno en el citoplasma (Fig. 3B, D). La ultraestructura de los granulocitos muestra células con núcleo excéntrico de abundante heterocromatina dispersa (Fig. 3E-F). Numerosos gránulos electron-claros, lisosomas, vacuolas, vesículas y pequeño gránulos de glicógeno se observan dispersos en el citoplasma celular del cual se desprenden delgados pseudópodos de tipo filópodos (Fig. 3E-F).

Tabla I. Hemograma de la hemolinfa de *Panopea globosa* (n=10, 20° C). Los valores se presentan media ±
DS (n=100 células) N/C, proporción núcleo/citoplasma.

Diámetro (µm)				
Tipo			N/C	Abundancia (%)
Hemocito	min	máx		
Hialinocitos pequeños	4	12	0.63±0.11	5±0.1
Hialinocitos grandes	6	18	0.63±0.15	67±.43
Granulocitos	6	18	0.44 ± 0.10	28±.38



Figura 2. Micrografías de las subpoblaciones de hemocitos caracterizadas en la hemolinfa de *Panopea globosa*. A-B: Hialinocitos grandes mostrando núcleo (N) acidofilo y la presencia pseudópodos (Ps). Tipo filópodos C: Hialinocito pequeño mostrando el núcleo basófilo, la presencia de pequeños pseudópodos y pocos gránulos en el citoplasma celular. D: Granulocito mostrando núcleo ovalado, excéntrico y abundantes gránulos basófilos en citoplasma celular.



Figura. 3 Micrografías electrónicas de transmisión de los hemocitos de *Panopea globosa*. A-B: Hialinocitos pequeños, C-D: Hialinocitos grandes, D-E: Granulocitos. N: núcleo, C: citoplasma, PS: pseudópodos, HE: heterocromatina, Va: vacuolas y Mi: mitocondria.

5.2 Caracterización funcional de los hemocitos

5.2.1 Extracción de hemolinfa y recuento total de hemocitos (RTH)

El RTH en la hemolinfa circulante de P. globosa incubada a diferentes temperaturas mostró una gran heterogeneidad (Fig. 4). El RTH de las almejas aclimatadas en las distintas temperaturas varió $2-9 \times 10^5$ hemocitos/ml, siendo significativamente (p < 0.05) más bajo el número de hemocitos en almejas aclimatadas a 15° C y más alto (p < 0.05) en aquellas aclimatadas a 30° C (Fig. 4). En relación a la variación de los tipos celulares, el porcentaje de hialinocitos pequeños fue significativamente (p < 0.05) menor en las almejas analizadas tal como se obtuvieron del campo y aquellas aclimatadas a 30° C en comparación con las almejas aclimatadas a 15° C (Fig. 5). Por su parte, la proporción de hialinocitos grandes fue significativamente menor en las almejas aclimatadas a 15° C, aunque, esto sólo fue estadísticamente significativo de las almejas aclimatadas a 25º C (Fig.5). La proporción de granulocitos mostró amplias variaciones, principalmente, una notable disminución de este tipo celular en almejas aclimatadas a 25° C aunque, no se registraron diferencias significativas (Fig. 5). En todos los casos, la viabilidad celular varió de 81-83% sin diferencias significativas entre los tratamientos (p> 0.05).



Figura 4. Recuento total de hemocitos de *Panopea globosa* en los diferentes tratamientos C: grupo control (20°C) y T0: almejas del tiempo cero previo a la manipulación. Los datos muestran la media \pm DS. Letras distintas indican diferencias significativas al p < 0.05.



Figura 5. Variación de las subpoblaciones de hemocitos en la hemolinfa de *P. globosa* en función de los tratamientos utilizados. C: grupo control (20°C) y T0: almejas del tiempo cero, previo a la manipulación. Los valores muestran la media \pm DS. Letras distintas indican diferencias significativas al (*p*<0.05)

5.2.2Fagocitosis

La actividad fagocítica de los hemocitos de P. globosa se determinó mediante la incubación de las células con zimosán. Las células se incubaron durante tres tiempos distintos en los cuales, se analizó el efecto de la temperatura sobre la fagocitosis celular observándose que, las tres subpoblaciones celulares tienen la capacidad de fagocitar zimosán, siendo los granulocitos las células que mostraron una mayor actividad, seguidas de los hialinocitos grandes y pequeños, respectivamente (p>0.05) (Fig. 6). La incubación de las células durante 30 min mostró una ligera reducción en la fagocitosis de los distintos tipos celulares y en las temperaturas analizadas, (p>0.05) (Fig. 6A). Los valores más altos se observaron en la actividad fagocítica de los hialinocitos pequeños y granulocitos de las almejas aclimatadas a 25° C (Fig. 6A), aunque sin ser estadísticamente diferentes (p>0.05). En las células incubadas con zimosán durante 60 min (Fig. 6B), la fagocitosis de los hialinocitos pequeños mostró poca variación en relación a la temperatura y (p>0.05). En cambio, la fagocitosis de los hialinocitos grandes y granulocitos fue mayor en las almejas aclimatadas a 15° C y 25° C (p>0.05), respectivamente, en relación al resto de tratamientos y disminuyó en las almejas de 30° C (p > 0.05) (Fig. 6B). En las muestras incubadas durante 120 min se incluyeron aquellas almejas analizadas tal como se obtuvieron del campo, mismas que mostraron los valores significativamente (p<0.05) más altos de fagocitosis, alcanzado hasta 70% en los granulocitos (Fig.6C).

En relación con el número de partículas que pueden fagocitar los distintos tipos celulares, se observó que tras 30 min incubación, el número de partículas por tipo celular se incrementó gradualmente conforme se incrementó la temperatura (p>0.05), excepto en los hialinocitos grandes de almejas aclimatadas a 15° C (Fig.7A), donde el número de partículas fagocitadas se redujo significativamente (p < 0.05) en comparación con el resto de los tratamientos (Fig. 7A). Por su parte, tras 60 min de incubación, la actividad fagocítica de las células se incrementó paulatinamente conforme el incremento de la temperatura. Los granulocitos fueron las células con capacidad para fagocitar el mayor número de partículas, en relación a los hialinocitos grandes y pequeños (Fig. 7B). Por su parte, los hialinocitos pequeños de almejas aclimatadas a 15º C fagocitaron un mayor número de partículas (p < 0.05) en comparación con el resto de los tratamientos mientras que, en los tratamientos restantes, esta mismas células se mantuvieron sin cambios (Fig. 7B). En relación a las células incubadas durante 120 min (Fig. 7C), se observó un incremento no significativo (p>0.05) en el número de partículas fagocitadas por los granulocitos de almejas aclimatadas a 15° y 25° C, respectivamente; mientras que, en los hialinocitos (ambos tipos), el número de partículas fagocitadas se mantuvo prácticamente sin cambios (p>0.05) (Fig. 7C)



Figura 6. Actividad fagocítica de los hemocitos C: grupo control (20°C) y T0: almejas del tiempo cero. (Hp: hialinocitos pequeños, Hg: hialinocitos grandes, G: granulocitos) de *Panopea globosa* (media \pm DS) a diferentes temperaturas y tiempos de incubación. (A) 30 min, (B) 60 min y (C) 120 min. Letras distintas indican diferencias significativas a p<0.05.



Figura 7. Índice de partículas fagocitadas T0: almejas del tiempo cero y C: grupo control (20°C) (IPF) (Hp: hialinocitos pequeños, Hg: hialinocitos grandes, Gr: granulocitos) por los hemocitos de *Panopea globosa* (media \pm DS) a distintas temperaturas y tiempos de incubación: (A) 30 minutos, (B) 60 minutos y (C) 120 minutos. Los letras indican diferencias significativas p < 0.05 con respecto al control.

5.2.3 Estallido respiratorio

La detección intracelular del estallido respiratorio se determinó mediante la precipitación de formazán que otorga a los hemocitos un color azul-morado, mismo que fue detectado principalmente, en hialinocitos grandes y granulocitos (Fig. 8). La capacidad de las células para producir radicales de oxígeno quedó así demostrada, sin observarse efecto alguno por la temperatura a la cual se mantuvieran las almejas (p>0.05) (Fig.9). El patrón general muestra una producción de radicales de oxígeno similar en los hemocitos de almejas de 15° C, 30° C y el grupo control (20° C) así como entre las almejas mantenidas a 25° C y aquellas del tiempo cero (Fig.9) aunque, sin diferencias significativas (p>0.05) entre los tratamientos.



Figura 8. Producción de ROS en hemocitos de Panopea globosa. Micrografía de hemocitos (A) mostrando la producción del radical superóxido y, (B) la inhibición del mismo en el grupo control (con SOD).



Fig. 9. Producción del radical superóxido en hemocitos de *Panopea globosa*. Los datos muestran valores media ± DS de los distintos tipos celulares, C: grupo control (20°C) y T0: almejas del tiempo cero, previo a la manipulación

6. Discusión

El presente estudio es el primero en su tipo en caracterizar las células circulantes en la hemolinfa de *P. globosa*, así como, determinar el efecto de la temperatura sobre la actividad funcional de las mismas.

En la hemolinfa de *P. globosa* se identificaron dos subpoblaciones celulares, granulocitos y hialinocitos (pequeños y grandes), mismos que han sido previamente observados en la hemolinfa de otros bivalvos (Carballal et al, 1997; Donaghy y Volety,2011 y Jun Li et al, 2018). Ambos tipos celulares muestran diferencias morfológicas con base en la presencia/ausencia de gránulos en el citoplasma y la proporción núcleo/citoplasma (N/C) (Carballal et al., 1997), lo cual se confirmó a nivel ultraestructural. La afinidad a los colorantes permitió identificar a los

granulocitos como células basófilas con númerosos gránulos, igualmente basófilos, en el citoplasma celular. En cambio, los hialinocitos (ambos tipos), se distinguen de los anteriores por su característica acidófila, igual que los pocos gránulos presentes en su citoplasma. Usualmente, células pequeñas (3-8 µm de diámetro), de núcleo central, con poco citoplasma y carente de gránulos, son clasificadas como blast-like (Travers et al., 2008) las cuales, presumiblemente, son células inmaduras que han sido vertidas a la hemolinfa y por tanto, aún no son capaces de desarrollar ninguna actividad (Donaghy et al., 2009; Evariste et al., 2016). No obstante, en P. globosa, las células caracterizadas como hialinocitos pequeños presentan una proporción N/C similar a la de los hialinocitos grandes, son capaces de extender pseudópodos y fagocitar partículas. Todo ello implica que son células totalmente funcionales y por tanto, no es posible considerarlas inmaduras. Por su parte, los hialinocitos grandes, fueron las células más abundantes en la hemolinfa de P. globosa seguidas por los granulocitos, similar a lo observado en Ostrea edulis y Pteria hirundo (Xue et al., 2001).

En moluscos, las variaciones en el número total de hemocitos puede estar asociado a cambios ambientales, la presencia de contaminantes o patógenos y por tanto, se considera un indicador del estado de salud de los organismos (Giuliano y Fontanetti, 2010; Ding, J et al, 2016). En el caso de *P. globosa* el recuento total de hemocitos (RTH) en las almejas del grupo control no excedió de 9 x 10⁵ cels ml⁻¹ mientras que, en las almejas aclimatadas a distintas temperaturas el RTH no superó 7 x 10^5 cels ml⁻¹. Tales valores indican pocas células en la hemolinfa circulante de la almeja, en comparación con otros bivalvos de menor tamaño como el mejillón *Mitylus edulis*, que presenta 4.2 x 10^6 cels ml⁻¹(Renwrantz, 2013). Sin embargo, pocos hemocitos también han sido observados en bivalvos de aguas profundas como *Bathymodiolus japonicus* (9 x 10^5 cels ml⁻¹), *Bathymodiolus platifrons* (8 x 10^5 cels ml⁻¹) (Tame et al., 2015) y un bivalvo de gran tamaño como el callo de hacha *Pinna nobilis* (5 x 10^5 cels ml⁻¹) (Matozzo et al., 2016).

La temperatura es uno de los factores ambientales de mayor influencia sobre procesos fisiológicos en bivalvos, tales como el crecimiento y la reproducción además de los parámetros inmunes (Donaghy et al., 2009). Con base en Sánchez (2012) y Tapia-Morales (2014), las tallas y pesos de los organismos empleados en este estudio se encontraban en etapas tempranas de maduración gonadal. Sin embargo, en las etapas tempranas de desarrollo gonádico no se han registrado alteraciones en la respuesta inmune (Anisimova et al., 2017). Así, en *P. globosa* se observó que el número total de hemocitos se redujo significativamente en las almejas aclimatadas a 15° C, pero éstos se incrementaron significativamente en las almejas incubadas a 30° C, similar a lo registrado en *Mactra veneriformis* ($3x10^5$ - $7x10^5$ cels ml⁻¹) incubada a 10° C y 30° C; y *Crassostrea corteziensis* (6.10x10⁵-1.50x10⁶ cels ml⁻¹) incubada a 22° C y 30° C (Yu et al.,2009; Hurtado-Oliva et al.,2015). En ambos casos, la fluctuación en el número de hemocitos circulantes probablemente es debida a la migración de estas células desde la hemolinfa hacia tejidos periféricos y viceversa, distribuyendo material energético de reserva para frenar lesiones o detener infecciones oportunistas (Yu et al.,2009; Ding et al.,2016). En el abulón *Haliotis rubra*, el incremento de la temperatura reduce la actividad antibacteriana de la hemolinfa, dejando a los organismos susceptibles a infecciones bacterianas (*Vibrio spp.*) que originan las mortalidades en verano (Dang et al., 2012).

En *P. globosa* incubadas a 30 ° C fueron las únicas almejas en las que se observaron bacterias (tipo bacilos) en la hemolinfa, similar a lo observado en *Chamelea* gallina (Monari et al.,2017) en la cual, un gran número de bacterias estaba presente en la hemolinfa de almejas incubadas a 30 ° C. En ambos casos, es probable que se trate de bacterias del genero Vibrio ya que, la cantidad de las mismas generalmente se incrementa conforme se incrementa la temperatura (Holstein et al.2018). No obstante, este aspecto tendrá que ser estudiado más a detalle en estudios futuros en *P. globosa*.

En *P. globosa* los hialinocitos grandes fueron las células más abundantes, seguidos por los granulocitos y hialinocitos pequeños, respectivamente. De éstos, los granulocitos son las células con mayor actividad en la defensa inmune, ya que

son células fagocíticamente más activas y capturan más partículas que los hialinocitos tal como tal como en Mytilus galloprovincialis, Perna viridis, Crassostrea virginica y Crassostrea gigas (Carballal et al., 1997; Donaghy et al.,2011; Wang et al.,2017; Lau et al.,2017). No obstante, los hialinocitos (particularmente los hialinocitos grandes) de P. globosa también son capaces de fagocitar partículas al igual que los de Bellamya bengalensis (Ray et al., 2013) y *Callista chione* (Matozzo et al., 2015). De hecho, con base en lo observado en este estudio, los hialinocitos grandes pueden fagocitar casi el mismo número de partículas que los granulocitos. En función de lo anterior, cabría esperar un mayor porcentaje de granulocitos en P. globosa. Sin embargo, las únicas variaciones significativas fueron observadas en la proporción de hialinocitos pequeños de almejas del T0, en comparación con aquellas aclimatadas a 15° C y 30° C (p < 0.05); así como de los hialinocitos grandes en almejas aclimatadas a 15° C y 25° C (p < 0.05). Rebelo et al. (2013) sugiere que las subpoblaciones de hemocitos corresponden a células en distintas etapas de madurez con diferente capacidad de respuesta. De ser así, es imprescindible para los organismos contar con aquellas células capaces de erradicar potenciales agentes extraños esto es, granulocitos y hialinocitos grandes. Las almejas del T0 reflejan el estrés de origen biótico y abiótico al que están sometidas de manera natural, lo que podría explicar la escaza proporción de hialinocitos pequeños. Por su parte, la proporción de hialinocitos grandes se mantuvo prácticamente sin cambios excepto en las almejas aclimatadas a 15° C, donde se redujeron significativamente en comparación con las temperaturas analizadas principalmente a 25° C.

La fagocitosis y citotoxicidad son mecanismos importantes de la respuesta inmune celular de bivalvos para eliminar patógenos (Pila et al., 2016). A nivel funcional, los hemocitos de P. globosa mostraron su capacidad fagocítica en los distintos tiempos de incubación sin embargo, se reduce en los hemocitos de las almejas aclimatadas a 30° C en comparación con aquellas aclimatadas a 25° C. En todos los casos, los granulocitos son las células de mayor actividad fagocítica, resaltando así que son las principales células responsables de capturar patógenos como se ha observado en Crassostrea gigas (Wang et al., 2017). En relación al estallido respiratorio, la producción de radicales de oxigeno ocurre cuando el organismo es atacado por patógenos por lo cual, se reconoce como una estrategia importante para destruir todo aquello no propio sin embargo, requiere ser caracterizada para cada especie ya que, puede presentar variaciones entre las mismas (Song et al., 2010). Por ejemplo, en el abulón Haliotis discus hannai la producción de ROS se incrementó significativamente en la temperatura más baja (8 ° C) a la que se expusieron los organismos y disminuyó considerablemente en la temperatura más alta analizada (26 ° C) (Ding et al., 2016). En cambio, en la almeja Spisula solidissima expuesta a 19° C y 23° C, la producción de ROS se redujo en la temperatura más baja y se incrementó en la temperatura más alta analizada, respectivamente (Hornstein et al., 2018). En el caso de P. globosa, se demostró la producción de radicales de oxígeno en las distintas temperaturas analizadas (p < 0.05).Los distintos tratamientos mostrando ligeras variaciones entre sí, principalmente en las almejas aclimatadas a 15° C en las cuales la producción del radical superóxido fue limitada prácticamente igual al de los organismos control (p < 0.05). Sin embargo, no desaparece lo que sugiere que la respuesta citotóxica defensiva no disminuye en consecuencia de la temperatura (p>0.05). Los análisis funcionales son consistentes con las observaciones realizadas a nivel molecular ya que, se identificó la activación de genes asociados a la respuesta antioxidante en juveniles de P. globosa tras la exposición a temperaturas de 29° C y 31° C (Juárez et al., 2018). Si bien, la respuesta citotóxica es necesaria para combatir patógenos, los radicales de oxigeno también pueden afectar a las células que las producen por ello, el sistema antioxidante es necesario para proteger a la almeja (Bandyopadhyay et al., 1999). Lo anterior muestra, a nivel funcional y molecular, que la respuesta citotóxica de la almeja P. globosa no es afectada por la temperatura. Por el contrario, se activan genes del sistema inmune que impiden la muerte celular (Juárez et al., 2018) lo cual, evidencia que P. globosa está adaptada para tolerar amplias variaciones de temperatura a las que se encuentra expuesta de manera

natural (16°C- 30°C) (Aragón-Noriega et al., 2007; Arambula-Pujol Edna et al., 2008; Calderon- Aguilera et al., 2010; Juárez et al., 2018).

7. Conclusiones

1. Se identificaron dos subpoblaciones de hemocitos: hialinocitos, subdivididos en función del tamaño y afinidad a los colorantes en pequeños ($4 \mu m$ - $12 \mu m$) y grandes ($6 \mu m$ - $18 \mu m$); y granulocitos.

2. La temperatura afecta al número total de hemocitos presentes en la hemolinfa de *Panopea globosa*.

3. La fagocitosis de los hemocitos tiende a disminuir con el incremento de la temperatura.

4. Los granulocitos fueron las células de mayor actividad fagocítica, seguida de los hialinocitos grandes.

5. La producción del radical superóxido fue limitada en almejas aclimatadas a 15°
C, con variaciones en los tratamientos restantes. Sin embargo, no es inhibida por cambios en la temperatura.

6. Los hemocitos de las almejas del tiempo cero (T0) mostraron mayor actividad fagocítica en comparación con el resto de tratamientos; la producción de ROS fue similar al que presentaron almejas aclimatadas a 25° C (p>0.05).

7. Las actividades defensivas de los hemocitos no son interrumpidas por los cambios en la temperatura.

Referencias.

- Anderson, R.S., Oliver, L.M., Brubacher, L.L., 1992. Superóxide anion generation by *Crassostrea virginica* hemocytes as measured by nitroblue tetrazolium reduction. Journal of Invertebrate Pathology 59: 303-307.
- Anisimova, A. A. (2013). Morpho functional parameters of hemolytic in the assessment of the physiological status of bivalves. Russian Journal of Marine Biology, 39(6): 381-391.
- Anisimova, A. A., Ponomareva, A. L., Grinchenko, A. V., Kirsanova, I. A., y Kravchenko, D. N. (2017). The composition and seasonal dynamics of the hemocyte cell population in the clams *Corbicula japonica* Prime (1864) of the Kievka River (the basin of the Sea of Japan). Russian Journal of Marine Biology, 43(2): 156-163.
- Aragón-Noriega, E. A., Chávez-Villalba, J., Gribben, P. E., Alcántara-Razo, E., Maeda-Martínez, A. N., Arambula-Pujol, E. M., Maldonado-Amparo, R. (2007). Morphometric relationships, gametogenic development and spawning of the geoduck clam *Panopea globosa* (*Bivalvia: Hiatellidae*) in the central Gulf of California. Journal of Shellfish Research, 26(2): 423-431.

- Arambula-Pujol Edna María, García-Juárez Alma Rosa, Alcántara-Razo Edgar, y Aragón-Noriega Eugenio Alberto. (2008). Aspects of reproductive biology of the geoduck clam *Panopea globosa* (Dall 1898) in the Gulf of California, *18*(2): 10.
- Arcos-Ortega, F. G., León-Hing, S. J. S., Rodriguez-Jaramillo, C., Burgos-Aceves,
 M. A., Giffard-Mena, I., y García-Esquivel, Z. (2015). Biochemical And
 Histochemical Changes Associated with Gonad Development of the Cortez
 Geoduck, *Panopea globosa* (Dall 1898), from the Gulf of California,
 Mexico. Journal of Shellfish Research, *34*(1), 71-80.
- Bandyopadhyay, U., Das, D., y Banerjee, R. K. (1999). Reactive oxygen species:
 Oxidative damage and pathogenesis. Current Science, 77(5): 658-666.
 Berthe, F. C. J. (2005). Diseases in Mollusc Hatcheries and their paradox in health management, 10.
- Bower, S.M, & Blackbourn, J. (2003). Geoduck clam (*Panopea abrupta*):
 Anatomy, Histology, Development, Pathology, Parasites and Symbionts.
 Recuperado 29 de mayo de 2018, de http://www.dfo-mpo.gc.ca/science/aah-saa/species-especes/shellfish-coquillages/geopath/warts-eng.html

- Brusa, F., Vázquez, N., & Cremonte, F. (2011). Paravortex panopea n. sp.(Platyhelminthes: Rhabdocoela) on clams from the northern Patagonian coast, Argentina: pathogeny and specificity. Helminthologia, 48(2).
- Calderon-Aguilera, L. E., Aragón-Noriega, E. A., Reyes-Bonilla, H., Paniagua-Chavez, C. G., Romo-Curiel, A. E., y Moreno-Rivera, V. M. (2010).
 Reproduction of the Cortes Geoduck *Panopea globosa* (Bivalvia: Hiatellidae) and Its Relationship with Temperature and Ocean Productivity. Journal of Shellfish Research, 29(1): 135-141.
- Carballal, M. J., López, C., Azevedo, C., y Villalba, A. (1997). In vitrostudy of phagocytic ability of *Mytilus galloprovincialis* Lmk. haemocytes. Fish & Shellfish Immunology, 7(6): 403-416.
- Carballal, M., López, M., Azevedo, C., y Villalba, A. (1997). Hemolymph cell types of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. Diseases of Aquatic Organisms, 29: 127-135.
- Cheng, W., Hsiao, I., y Chen, J. (2004). Effect of nitrite on immune response of Taiwan abalone *Haliotis diversicolor* supertexta and its susceptibility to Vibrio parahaemolyticus. Diseases of Aquatic Organisms, 60: 157-164.
- Cochennec-Laureau, N., Auffret, M., Renault, T., y Langlade, A. (2003). Changes in circulating and tissue-infiltrating hemocyte parameters of European flat

oysters, *Ostrea edulis*, naturally infected with *Bonamia ostreae*. Journal of Invertebrate Pathology, *83*(1): 23-30.

- Coan, E.V. y P. Valentich. 2012. Bivalve seashells of tropical west America.Marine bivalve mollusks from Baja California to Peru. Santa BarbaraMuseum of Natural History. Santa Barbara. California, pp. 1257.
- Cortez-Lucero, G., Arreola-Lizárraga, J. A., Chávez-Villalba, J., y Aragón-Noriega, E. A. (2011). Edad, crecimiento y mortalidad de la almeja de sifón, *Panopea globosa* (Bivalvia: Hiatellidae) en la región central del Golfo de California, México. Revista de biología marina y oceanografía, *46*(3): 453-462.
- Dang, C., Tan, T., Moffit, D., Deboutteville, J. D., y Barnes, A. C. (2012). Gender differences in hemocyte immune parameters of bivalves: The Sydney rock oyster *Saccostrea glomerata* and the pearl oyster *Pinctada fucata*. Fish & Shellfish Immunology, *33*(1): 138-142.
- Dang, V. T., Speck, P., y Benkendorff, K. (2012). Influence of elevated temperatures on the immune response of abalone, Haliotis rubra. Fish y shellfish immunology, 32(5): 732-740.
- Ding, J., Li, L., Wu, F., y Zhang, G. (2016). Effect of chronic temperature exposure on the immunity of abalone, *Haliotis discus hannai*. Aquaculture Research, 47(9): 2861-2873.

- Donaghy, L., Kim, B.-K., Hong, H.-K., Park, H.-S., y Choi, K.-S. (2009). Flow cytometry studies on the populations and immune parameters of the hemocytes of the Suminoe oyster, *Crassostrea ariakensis*. Fish & Shellfish Immunology, 27(2): 296-301.
- Donaghy, L., y Volety, A. K. (2011). Functional and metabolic characterization of hemocytes of the green mussel, *Perna viridis:* in vitro impacts of temperature. Fish & Shellfish Immunology.
- Ellis, R. P., Parry, H., Spicer, J. I., Hutchinson, T. H., Pipe, R. K., y Widdicombe,
 S. (2011). Immunological function in marine invertebrates: Responses to environmental perturbation. Fish & Shellfish Immunology, 30(6): 1209-1222.
- Evariste, L., Rioult, D., Brousseau, P., Geffard, A., David, E., Auffret, M. y
 Betoulle, S. (2017). Differential sensitivity to cadmium of immunomarkers
 measured in hemocyte subpopulations of zebra mussel *Dreissena polymorpha*. Ecotoxicology and Environmental Safety, *137*: 78-85.
- Ferreira-Arrieta, A., García-Esquivel, Z., González-Gómez, M. A., y Valenzuela-Espinoza, E. (2015). Growth, Survival, and Feeding Rates for the Geoduck *Panopea globosa* During Larval Development. Journal of Shellfish Research, 34(1), 55-61.

- Fournier, M., Pellerin, J., Clermont, Y., Morin, Y., y Brousseau, P. (2001). Effects of in vivo exposure of *Mya arenaria* to organic and inorganic mercury on phagocytic activity of hemocytes. Toxicology, 161(3): 201-211.
- Flye-Sainte-Marie, J., Soudant, P., Lambert, C., Le Goïc, N., Goncalvez, M.,
 Travers, M. A., y Jean, F. (2009). Variability of the hemocyte
 parameters of *Ruditapes philippinarum* in the field during an annual cycle.
 Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 377(1): 1-11
- García-Esquivel, Z., Valenzuela-Espinoza, E., Buitimea, M. I., Searcy-Bernal, R., Anguiano-Beltrán, C., y Ley-Lou, F. (2013). Effect of lipid emulsion and kelp meal supplementation on the maturation and productive performance of the geoduck clam, *Panopea globosa*. Aquaculture, 396-399, 25-31.
- García-Esquivel, Z., González-Gómez, M.A., Valenzuel Espinoza, E., 2014.
 Temperature-dependent ingestion rates exhibited by adult geoduck clams,
 Panopea globosa, under laboratory conditions. In: Memoirs of 106th
 Annual Meeting National Shellfisheries Association.
- Gagnaire, Béatrice, Duchemin, M., Auffret, M., Thomas-Guyon, H., y Renault, T. (2008). Comparison of hemocyte parameters in the pericardial cavity and the adductor muscle sinus in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* using two types of flow cytometers. Aquatic Living Resources, 21(1): 39-43.

- Gagnaire, Beatrice, Frouin, H., Moreau, K., Thomas-Guyon, H., y Renault, T. (2006). Effects of temperature and salinity on haemocyte activities of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). Fish & Shellfish
- Giannuzzi, L., Krock, B., Minaglia, M. C. C., Rosso, L., Houghton, C., Sedan, D., y Hernando, M. (2016). Growth, toxin production, active oxygen species and catalase activity of Microcystis aeruginosa (*Cyanophyceae*) exposed to temperature stress. Comparative Biochemistry and Physiology Part C:Toxicology y Pharmacology, 189, 22-30.Immunology, 20(4): 536-547.
- González, P. S. S., y Lluch, C.D. B. (2010). Cambio climático y la pesquería de la almeja generosa (*Panopea ssp.*) en el Pacífico Mexicano. Cambio climático en México, un enfoque costero-marino. Universidad Autónoma de Campeche CETYS- Universidad, Gobierno del Estado de Campeche, Campeche, 519-532.
- Gorbushin, A. M., y Iakovleva, N. V. (2007). Functional characterization of Littorina littorea (*Gastropoda: Prosobranchia*) blood cells. Journal of the Marine Biological Association of the UK, 87(03): 741.
- Hégaret, H., Wikfors, G. H., y Soudant, P. (2003). Flow cytometric analysis of haemocytes from eastern oysters, *Crassostrea virginica*, subjected to a sudden temperature elevation. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 293(2): 249-265.

- Hine, P. (1999). The inter-relationships of bivalve haemocytes. Fish & Shellfish Immunology, 9(5): 367-385.
- Hooper, C., Day, R., Slocombe, R., Benkendorff, K., Handlinger, J., y Goulias, J. (2014). Effects of severe heat stress on immune function, biochemistry and histopathology in farmed Australian abalone (*hybrid Haliotis laevigata×Haliotis rubra*). Aquaculture, 432: 26-37.
- Hornstein, J., Pales Espinosa, E., Cerrato, R. M., Lwiza, K. M. M., y Allam, B. (2018). The influence of temperature stress on the physiology of the Atlantic surfclam, *Spisula solidissima*. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 222: 66-73.
- Hurtado-Oliva, M. ángel, Gómez-Hernández, S. J., Gutiérrez-Rivera, J. N., Estrada, N., Piña-Valdez, P., Nieves-Soto, M., y Medina-Jasso, M. A. (2015). Gender Differences and Short-Term Exposure to Mechanical, Thermic, and Mechanical—Thermic Stress Conditions on Hemocyte Functional Characteristics and *HSP* 70 Gene Expression in Oyster *Crassostrea corteziensis* (Hertlein, 1951). Journal of Shellfish Research, 34(3): 849-859.
- Juárez, O. E., Lafarga-De la Cruz, F., Leyva-Valencia, I., López-Landavery, E., García-Esquivel, Z., Díaz, F., Galindo-Sánchez, C. E. (2018).

Transcriptomic and metabolic response to chronic and acute thermal exposure of juvenile geoduck clams *Panopea globosa*. Marine Genomics.

- Nakayama, K., Nomoto, A., Nishijima, M., y Maruyama, Ta. (1997). Morphological and Functional Characterization of Hemocytes in the Giant Clam *Tridacna crocea*, 7
- Lau, Y.-T., Sussman, L., Pales Espinosa, E., Katalay, S., y Allam, B. (2017).
 Characterization of hemocytes from different body fluids of the eastern oyster *Crassostrea virginica*. Fish & Shellfish Immunology, 71: 372-379.
- Li, J., Zhang, Y., Mao, F., Lin, Y., Xiao, S., Xiang, Z. Yu, Z. (2018). The first morphologic and functional characterization of hemocytes in Hong Kong oyster, *Crassostrea hongkongensis*. Fish & Shellfish Immunology, 81: 423-429.
- Li, S., Liu, Y., Liu, C., Huang, J., Zheng, G., Xie, L., y Zhang, R. (2015). Morphology and classification of hemocytes in *Pinctada fucata* and their responses to ocean acidification and warming. Fish & Shellfish Immunology, 45(1), 194-202.
- Matozzo, V., Pagano, M., Spinelli, A., Caicci, F., y Faggio, C. (2016). *Pinna nobilis*: A big bivalve with big haemocytes? Fish & Shellfish Immunology, 55: 529-534.

- Matozzo, Valerio, y Bailo, L. (2015). A first insight into haemocytes of the smooth venus clam *Callista chione*. Fish & Shellfish Immunology, *42*(2): 494-502.
- Monari, M., Matozzo, V., Foschi, J., Cattani, O., Serrazanetti, G., y Marin, M. (2007). Effects of high temperatures on functional responses of haemocytes in the clam *Chamelea gallina*. Fish & Shellfish Immunology, 22(1-2): 98-114.
- Mydlarz, L. D., Jones, L. E., y Harvell, C. D. (2006). Innate Immunity, Environmental Drivers, and Disease Ecology of Marine and Freshwater Invertebrates. Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics, 37(1): 251-288.
- Oliver, L., y Fisher, W. (1995). Comparative form and function of oyster *Crassostrea virginica* hemocytes from Chesapeake Bay (Virginia) and Apalachicola Bay (Florida). *D*iseases of Aquatic Organisms, 22: 217-225.
- Perez, D. G., y Fontanetti, C. S. (2011). Hemocitical responses to environmental stress in invertebrates: a review. Environmental Monitoring and Assessment, 177(1-4): 437-447.
- Pérez Bustamante, I. S. (2017). Protozoarios asociados a lesiones del sifón de las almejas *Panopea generosa* y *Panopea globosa*. Universidad Autónoma de Baja California, Ensenada Baja California México.

- Pila, E. A., Sullivan, J. T., Wu, X. Z., Fang, J., Rudko, S. P., Gordy, M. A., y Hanington, P. C. (2016). Haematopoiesis in molluscs: A review of haemocyte development and function in gastropods, cephalopods and bivalves. Developmental y Comparative Immunology, 58: 119-128.
- Quintana Lopez, A. (2015). Utilización de una dieta balanceada inerte como suplemento de microalgas vivas en la maduración gonadal de la almeja de sifón *Panopea globosa*. Universidad Nacional del Comahue, Ensenada Baja California México.
- Ray, M., Bhunia, N. S., Bhunia, A. S., y Ray, S. (2013). A comparative analyses of morphological variations, phagocytosis and generation of cytotoxic agents in flow cytometrically isolated hemocytes of Indian molluscs. Fish & Shellfish Immunology, 34(1): 244-253.
- Rebelo, M. de F., Figueiredo, E. de S., Mariante, R. M., Nóbrega, A., de Barros, C.
 M., y Allodi, S. (2013). New Insights from the Oyster Crassostrea rhizophorae on Bivalve Circulating Hemocytes. PLoS ONE, 8(2), e57384.
- Renwrantz, L., Siegmund, E., y Woldmann, M. (2013). Variations in hemocyte counts in the mussel, *Mytilus edulis*: Similar reaction patterns occur in disappearance and return of molluscan hemocytes and vertebrate leukocytes. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular y Integrative Physiology, 164(4): 629-637.

- Song, L., Wang, L., Qiu, L., Zhang, H., 2010. Bivalve immunity. (Ed.). Invertebrate Immunity. Springer. En: Söderhäll, K; 4-65
- Sánchez León Hing Santiago José(2012). Cambios histológicos y bioquímicos asociados al ciclo de maduración de la almeja de sifón, *Panopea globosa* en San Felipe, B.C. México (tesis de posgrado maestría) Ensenada Baja California México.
- Tapia-Morales, S., García-Esquivel, Z., Vadopalas, B., y Davis, J. (2015). Growth and Burrowing Rates of Juvenile Geoducks *Panopea generosa* and *Panopea globosa* under Laboratory Conditions. Journal of Shellfish Research, 34(1): 63-70.
- Tapia-Morales, S.,(2014). Movilización de reservas bioquímicas y expresión del gen de la vitelina (mRNA VT/VTG), durante el desarrollo gonádico de la almeja de sifón, *Panopea globosa* (tesis de posgrado maestría) Ensenada Baja California México.
- Travers, M.-A., Le Goïc, N., Huchette, S., Koken, M., y Paillard, C. (2008). Summer immune depression associated with increased susceptibility of the European abalone, *Haliotis tuberculata* to Vibrio harveyi infection. Fish y Shellfish Immunology, 25(6): 800-808.
- Van der Knaap, W. P. W., Adema, C. M., y Sminia, T. (1993). Invertebrate blood cells: Morphological and functional aspects of the haemocytes in the pond

snail *Lymnaea stagnalis*. Comparative Haematology International, 3(1):20-26.

- Vargas, F., y Barracco, M. A. (2001). Mecanismos de defensa de los moluscos bivalvos, con énfasis en pectínidos. Los moluscos pectinidos de Iberoamerica: Ciencia y Acuicultura, pp. 127-146.
- Vázquez, N., Ituarte, C., y Cremonte, F. (2015). A histopathological study of the geoduck clam Panopea abbreviata from San José Gulf, North Patagonia, Argentina. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom, 95(06): 1173-1181.
- Vázquez, N. N. (2012). Patologías que afectan a poblaciones comercialmente explotadas de moluscos bivalvos del litoral norpatagónico y la vinculación con sus historias de vida. Univiercidad Nacional del Comahue, Centro Nacional Patagónico (CONICET), Puerto Madryn, Chubut, Argentina.
- Vieira, G. C., da Silva, P. M., Barracco, M. A., Hering, A. F., Albuquerque, M. C.
 P. de, Coelho, J. da R., Perazzolo, L. M. (2017). Morphological and functional characterization of the hemocytes from the pearl oyster *Pteria hirundo* and their immune responses against Vibrio infections. Fish & Shellfish Immunology, 70: 750-758.

- Wang, W., Li, M., Wang, L., Chen, H., Liu, Z., Jia, Z., Song, L. (2017). The granulocytes are the main immunocompetent hemocytes in *Crassostrea* gigas. Developmental & Comparative Immunology, 67: 221-228.
- Xue, Q., Renault, T., Cochennec, N., y Gerard, A. (2000). Separation of European flat oyster, *Ostrea edulis*, haemocytes by density gradient centrifugation and SDS-PAGE characterisation of separated haemocyte sub-populations. Fish & Shellfish Immunology, 10(2): 155-165.
- Yao, C.-L., y Somero, G. N. (2013). Thermal stress and cellular signaling processes in hemocytes of native (*Mytilus californianus*) and invasive (*M. galloprovincialis*) mussels: Cell cycle regulation and DNA repair. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 165(2): 159-168.
- Yu, J. H., Song, J. H., Choi, M. C., y Park, S. W. (2009). Effects of water temperature change on immune function in surf clams, *Mactra veneriformis* (Bivalvia: Mactridae). Journal of Invertebrate Pathology, 102(1): 30-35.