

Parámetros hemocitarios y química de la hemolinfa en reproductores de la concha prieta *Anadara tuberculosa* (Arcoida: Arcidae)

Haemocyte parameters and haemolymph chemistry in the black shell *Anadara tuberculosa* broodstock (Arcoida: Arcidae)

Karen Espinoza *¹

<https://orcid.org/0000-0003-1024-5311>
kespinoza3068@utm.edu.ec

Edgar Zapata-Vívenes²

<https://orcid.org/0000-0003-3720-5416>
edgar.zapata@utm.edu.ec

César Lodeiros²

<https://orcid.org/0000-0001-9598-2235>
cesarlodeirosseijo@yahoo.es

*Corresponding author

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

2. Grupo de Investigación, Biología y Cultivo de Moluscos, Departamento de Acuicultura, Pesca y Recursos Naturales Renovables, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Técnica de Manabí, Ecuador.

Citación

Espinoza K, Zapata-Vívenes E, Lodeiros C. 2022. Parámetros hemocitarios y química de la hemolinfa en reproductores de la concha prieta *Anadara tuberculosa* (Arcoida: Arcidae). Revista peruana de biología 29(4): e23624 001- 008 (Noviembre 2022). doi: <https://dx.doi.org/10.15381/rpb.v29i4.23624>

Presentado: 10/09/2022

Aceptado: 10/10/2022

Publicado online: 15/11/2022

Cierre de número: 25/11/2022

Editor: Leonardo Romero

Resumen

Con motivo de conocer el estado de salud de poblaciones silvestres de la concha prieta *Anadara tuberculosa* se estudiaron los parámetros hemocitarios (viabilidad, conteo total y diferencial, estabilidad lisosomal, fragilidad osmótica) y la química sanguínea (hemoglobina-Hb, proteínas, triglicéridos, glucosa, lactato deshidrogenasa-LDH y catalasa-CAT). Se extrajo hemolinfa en reproductores salvajes aparentemente sanos colectados en la isla Corazón, río Chone, Ecuador. La viabilidad celular fue elevada, con presencia de 5 morfotipos: eritrocitos (74%), granulocitos traslucidos (6%), amebocitos (3%), hialinocitos (12%), blastocitos (5%). Los hemocitos presentaron membranas lisosomales estables al rojo neutro durante 240 min y una fragilidad osmótica media (FO₅₀) de 4.8‰. Las concentraciones de Hb, proteínas, lípidos y glucosa denotan la función respiratoria y reservas energéticas durante los cambios de marea. La actividad de LDH está vinculada al metabolismo anaeróbico y CAT a la capacidad de mantener el equilibrio redox del sistema inmunitario. Los parámetros hemocitarios y química de la hemolinfa pueden servir como índices fisiológicos normales de referencia en reproductores de *A. tuberculosa*.

Abstract

In this work we studied the health status of wild populations of the black shell *Anadara tuberculosa*, haemocyte parameters (viability, total and differential count, lysosomal stability, osmotic fragility) and blood chemistry (haemoglobin-Hb, proteins, triglycerides, glucose, lactate dehydrogenase-LDH and catalase-CAT). Haemolymph was extracted from apparently healthy wild broodstock collected from Corazón Island, Chone River, Ecuador. Cell viability was high, with 5 morphotypes present: erythrocytes (74%), colorless granulocytes (6%), amebocytes (3%), hyalinocytes (12%), blastocytes (5%). Haemocytes showed stable lysosomal membranes to neutral red for 240 min and a mean osmotic fragility (OF₅₀) was 4.8‰. Hb, protein, lipid and glucose concentrations denote respiratory function and energy reserves during tidal changes. LDH activity is linked to anaerobic metabolism and CAT denotes the ability to maintain the redox balance of the immune system. The haemocyte parameters and haemolymph chemistry can serve as normal physiological reference indices in *A. tuberculosa* broodstock.

Palabras clave:

Eritrocito; granulocito; hemolinfa; hemoglobina; hialinocito.

Key word:

Erythrocyte; haemolymph; haemoglobin; granulocyte; hyalinocyte.

Introducción

Anadara tuberculosa (G. B. Sowerby I, 1833) conocida comúnmente como concha negra, concha prieta o pingua es una especie que habita en los ecosistemas de manglares y es importante en las economías locales de las costas del Pacífico tropical americano (Lucero et al. 2012, Panta-Vélez et al. 2020, Vega et al. 2021), ya que de su recolecta depende un número significativo de pescadores artesanales (Rodríguez-Monroy et al. 2020, Quiñónez-Cabeza et al. 2020). Sin embargo, sus densidades han disminuido debido a la sobreexplotación, la pérdida de hábitat por la deforestación de manglares, la contaminación costera producto de la acuicultura de camarones, la agricultura, la minería, el turismo y el desarrollo urbano (Castellanos-Galindo et al. 2011). Por tal motivo, esta especie se encuentra protegida por una veda permanente que restringe la extracción de ejemplares con tallas menores de 45 mm en su axis antero-posterior (Mora et al. 2010, VMAPE 2021).

El estado fisiológico de los animales de cultivo puede ser determinado a través de parámetros hematológicos y bioquímicos de su hemolinfa, los cuales son de importancia crítica en el diagnóstico de diversas condiciones fisiopatológicas (Reshma et al. 2020, Nabi et al. 2022). Las cantidades, distribución, tipos y diámetro de hemocitos son índices sencillos, económicos y de fácil interpretación para estimar la salud animal (Zapata-Vívenes et al. 2012, Loján et al. 2021, Kladchenko et al. 2022). Sin embargo, no existen registros de los valores referenciales normales de la mayoría de los animales y en particular de bivalvos.

Las poblaciones de hemocitos en bivalvos son heterogéneas, y su identificación y caracterización depende de las técnicas citoquímicas utilizadas (De la Ballina et al. 2022). En las distintas especies de bivalvos se han clasificado a los hemocitos en dos, tres o más morfotipos (Cheng 1996, Hine 1999, Donaghy & Volety 2011). Algunos investigadores coinciden en la existencia de tres tipos principales de hemocitos en moluscos bivalvos: granulocitos, hialinocitos y células blásticas. En particular, en el género *Anadara* (familia Arcidae), además de las células antes nombradas, también se observan glóbulos rojos, los cuales contienen hemoglobina como pigmento respiratorio (Uria-Galicia 1988, Fernández-Arias et al. 1988, Mangum 1992). La hemoglobina le confiere un color rojo oscuro a la hemolinfa, de allí su otro nombre popular "almejas de sangre". En la actualidad, se conoce poco sobre la fisiología de los hemocitos de la familia Arcidae.

En el presente trabajo se estudia la condición fisiológica de individuos reproductores de *A. tuberculosa* recolectados de una población natural de la isla Corazón (estuario del río Chone, Ecuador), a través de la estimación de parámetros hemocitarios y química sanguínea. Esta información será útil en la valoración del estado de salud de las poblaciones de reproductores silvestres para potenciar su acuicultura y realizar planes de repoblación.

Material y métodos

Colecta de ejemplares. Entre 40 a 50 reproductores maduros de concha prieta, *A. tuberculosa*, con tallas de 50 – 60 mm (50 – 60 g) fueron colectados manualmente durante la temporada de verano ecuatorial (agosto de 2021) en la localidad de isla Corazón (0°39'08"S, 80°22'12"W), estuario del río Chone, Ecuador. Los organismos fueron transportados al laboratorio de Moluscos de la Universidad Técnica de Manabí, en envases de aislamiento térmico (26 ± 1 °C). Las conchas fueron limpiadas y sumergidas en tanques de 200 L, a una densidad de 1 individuos por cada 10 L durante 24 h con agua de mar filtrada (10 µm) con salinidad 30‰, pH 7.8 ± 0.2 y temperatura 26 ± 1 °C, con aireación constante y moderada.

Extracción de hemolinfa. Fue realizada por punción directa en la región anterior del pie utilizando una jeringa hipodérmica. Se recolectó entre 1 – 1.5 mL de hemolinfa por cada individuo. Para mejorar la extracción se realizó un pequeño orificio en entre las valvas a la altura del pie. La hemolinfa fue colocada en tubos sellados que contenían cristales de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y mantenidos a 18 °C, en un contenedor isotérmico totalmente oscuro durante 30 min, hasta el momento de los análisis.

Parámetros celulares

Viabilidad y conteo de hemocitos. La viabilidad fue determinada por tinción diferencial con el colorante azul de tripano al 0.4 % (Louis & Siegel 2011). La viabilidad fue expresada como porcentaje de células vivas. El número total de hemocitos por mL fue determinado en una cámara Neubauer y se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\left(\frac{\text{Número de hemocitos}}{\text{mL}} \right) = \left(\frac{X}{4} \right) \times \left(\text{Factor de dilución} \right) \times 106$$

En el conteo diferencial los hemocitos se tomo en cuenta su forma y tamaño en fresco y se aplicó:

$$\left(\left(\frac{\text{Cantidad de morfotipo}}{\text{morfotipo}} \right) \times \frac{100}{n} \text{ total de hemocitos} \right)$$

Citometría de flujo. Un mililitro de hemolinfa de cada almeja fue colocado directamente en un tubo de citometría de flujo, a través de un analizador de hematología diferencial de 5 partes (Urit BH-5100). Las poblaciones de hemocitos se discriminaron en histogramas biparamétricos de morfología relativa (dot-plot): la dispersión lateral, que mide la complejidad interna y granulocidad (CI); y la dispersión frontal, que mide el tamaño de las células (TC).

Parámetros químicos

Hemoglobina (Hb). Las concentraciones de Hb fueron estimadas por formación de cianometahemoglobina a través de método colorimétrico (Kampen & Zijlstra 1966).

Proteínas. Las proteínas fueron determinadas por método colorimétrico de Biuret (Gomall et al. 1949). La

lectura fue obtenida a una absorbancia a 540 nm frente al blanco. El color es estable 1 h. Se usó como estándar albúmina de suero de bovino (1 mg/mL).

Glucosa. La glucosa total fue determinada por el método de Trinder (1969), acoplada a la reacción oxidación de glucosa a ácido glucónico, por medio de la catálisis de glucosa oxidasa (GOD). El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) producido se detectó mediante un aceptor cromogénico de oxígeno, fenol, 4-aminofenazona, en presencia de la peroxidasa (POD). La reacción fue seguida a 500 nm.

Triglicéridos. Los niveles de triglicéridos fueron determinados a través del Kit GPO-POD (Bucolo et al. 1973). Se realizó una curva de calibración con patrón primario acuoso de palmitato (200 mg/mL). Las muestras fueron leídas a 505 nm.

Lactato deshidrogenasa (LDH, EC 1.1.1.27). La actividad máxima de la LDH fue determinada a 25 °C por seguimiento de la oxidación del Nicotinamina Adenina Dinucleótido reducido (NADH) por piruvato a 340 nm ($E = 6.22 \text{ mM} \cdot \text{cm}^{-1}$) (Livingstone et al. 1990). La actividad de la LDH se expresó como actividad específica por miligramos de proteínas.

Catalasa (CAT, EC 1.11.1.6). La actividad fue determinada por el descenso de la concentración de H_2O_2 ($\epsilon = 40 \text{ mmol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) a una longitud de onda de 240 nm (Aebi 1984). La actividad específica de la CAT del tejido fue expresada como unidad (U) por mg de proteínas.

Estabilidad lisosomal. Una alícuota de suspensión celular (10 μL) se mezclaron e incubaron en tubos de centrífuga con 40 μL de la solución de rojo neutro (22.80 mg/mL disuelto en dimetilsulfóxido-Sigma), en cámara húmeda y oscura (Lowe & Pipe 1994). Cada 15 a 30 min, las láminas fueron observadas en un microscopio óptico a 400 X. Se estimó (en porcentaje) el número de hemocitos sin daños (lisosomas teñidos) y dañados (tinción del citoplasma) hasta dos horas (Zapata-Vívenes et al. 2012).

Fragilidad osmótica. La suspensión hemocitaria de cada individuo (100 μL) se colocaron en 2.5 mL de concentraciones descendentes de NaCl (en unidades de 0.1 g/v %) desde 1.5% hasta 0%, a pH 7.20 a 25 °C. Se mantuvieron durante una hora a temperatura ambiente en cámara oscura. Cada muestra fue centrifugada a 2000 g por 10 min, se tomaron lecturas a 540 nm de los sobrenadantes en un espectrofotómetro UV-Vis Evolution™ 220. El porcentaje de hemólisis se determinó comparándolo con la solución 0% (que corresponde al 100% de hemólisis). El porcentaje de hemólisis se estimó mediante la fórmula de Daci y Lewis (1996):

$$\% \text{ hemólisis} = \frac{\text{Abs. tubo muestra} \times 100}{\text{Abs. tubo } 0\% \text{ NaCl}}$$

La concentración media de hemólisis (FO_{50}) fue estimada por método gráfico.

Resultados

Parámetros celulares. En la Tabla 1 se muestran los parámetros hemocitarios (viabilidad, número total y diferencial) de la hemolinfa de los reproductores de *A. tuberculosa*. La viabilidad de los hemocitos es elevada observándose más del 99%, inclusive pueden mantenerse viables (80 – 90%) en solución fisiológica salina (0.90%) a 25 °C durante 3 días. El número de hemocitos totales por mililitro registró valores entre $1.9 - 2.4 \times 10^7$ hemocitos/mL, siendo considerado una alta concentración celular en contraste a otros bivalvos. El conteo diferencial mostró dos grupos de células de acuerdo a la granularidad: los granulocitos ($\approx 88\%$) y los agranulocitos ($\approx 12\%$). Los hemocitos principalmente distribuidos en orden de abundancia: eritrocitos (87 – 90%), granulocitos traslucidos (1 – 2%), hialinocitos (4 – 8%), amebocitos (1 – 3%) y células blásticas (3 – 6%) (Fig. 1). En eritrocitos se incluyen los subtipos eritrocitos tipo I y II, y hialinocitos subdivididos en grandes y pequeños. Similarmente, en la citometría de flujo se demuestra la presencia de las 3 poblaciones celulares que varían en sus tamaños y cantidad de gránulos, los cuales son granulocitos, hialinocitos y blastocitos (Fig. 2).

Tabla 1. Parámetros hemocitarios de *Anadara tuberculosa* en reproductores aparentemente sanos (N=8). Los resultados se muestran en media $\pm$ desviación estándar (DE). NTH=Número total de hemocitos.

Conteo	Parámetro	Promedio
Total	Viabilidad (%)	99.09 $\pm$ 0.95
	NTH ($\times 10^6$)	2.15 $\pm$ 0.45
Diferencial	Eritrocitos (%)	74.0 $\pm$ 7.36
	Hialinocitos (%)	12.4 $\pm$ 2.98
	Granulocitos traslucidos (%)	5.60 $\pm$ 3.59
	Amebocitos (%)	2.80 $\pm$ 1.30
	Blastocitos (%)	5.20 $\pm$ 1.69

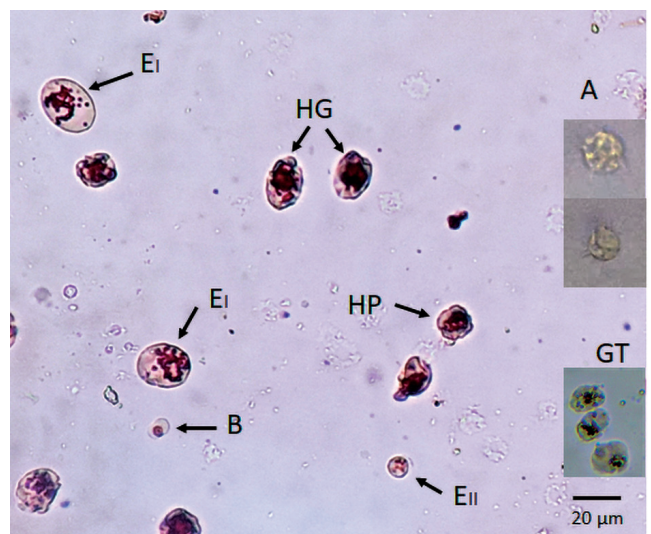


Figura 1. Hemocitos (morfotipos) de *Anadara tuberculosa*: Eritrocitos (tipo I, Ei), Eritrocitos (tipo II, Eii), granulocitos traslucidos (GT) teñidos con rojo neutro, hialinocitos grandes (HG), hialinocitos pequeños (HP), amebocitos (A) y blastocitos (B).

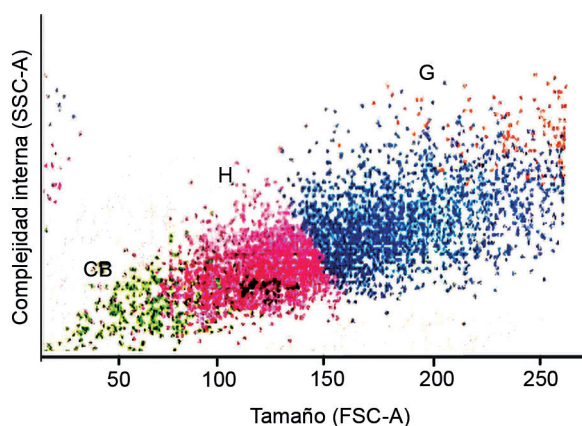


Figura 2. Análisis por citometría de flujo de las poblaciones de hemocitos de *Anadara tuberculosa*. Tamaño (FSC-A) frente a la complejidad interna (SSC-A). Se distinguen tres tipos de células: granulocitos (**G**) que incluyen Eritrocitos tipo I, Eritrocitos tipo II, granulocitos traslucidos, hialinocitos (**H**) grandes y pequeños, y células de tipo blastocitos (**CB**).

Desestabilización lisosomal y fragilidad osmótica. La retención de rojo neutro fue mayor a los 240 min, lo que indica hemocitos de membranas lisosomales muy estables y un estado saludable (Fig. 3). Fue perceptible un aumento de tamaño de los lisosomas, sin fuga de colorante al citoplasma desde los primeros 15 min hasta los 120 min; mientras durante los 240 min se observó baja proporción de lisosomas aumentados de tamaño (algunos fusionados), pero sin el citoplasma teñido, lo que sugiere que el colorante no ha salido de los lisosomas.

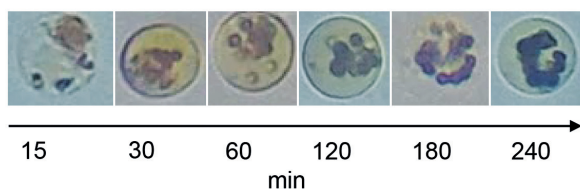


Figura 3. Hemocitos de *Anadara tuberculosa* mostrando lisosomas reteniendo rojo neutro durante 15, 30, 60, 120, 180 y 240 minutos. Fotomicrografías (400X).

La curva sigmoideal monótona muestra que la fragilidad osmótica media (FO_{50}) ocurre una salinidad de 4.8‰ (Fig. 4). Por debajo de 6.0‰ se evidencia la ruptura de la membrana plasmática de los hemocitos por choque hiposmótico, alcanzado un 22% de lisado hemocitario.

Química sanguínea. Las concentraciones de hemoglobina oscilaron entre 2.7 a 6.6 g/dL. Las moléculas relacionadas con las funciones energéticas tales como glucosa, triglicéridos y proteínas oscilaron entre 3.4 – 10.1 mg/dL; 55.24 – 66.50 mg/dL y de 0.4 a 0.8 g/dL respectivamente. La actividad de las enzimas LDH y catalasa muestran rangos entre 9.00 – 19.5 U/mL y de 3.50 – 20.00 U/mL, respectivamente (Tabla 2).

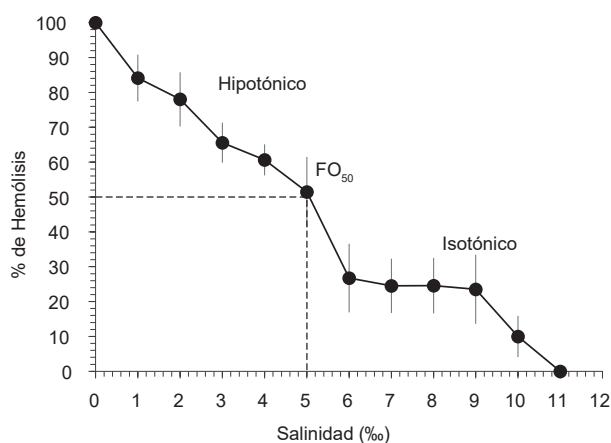


Figura 4. Porcentaje de hemólisis en la almeja *Anadara tuberculosa* (N=8) en función a la salinidad extracelular (‰). La línea punteada representa la fragilidad osmótica media (FO_{50}).

Tabla 2. Química sanguínea de *Anadara tuberculosa* en reproductores aparentemente sanos (N=8). Los resultados se muestran en media $\pm$ desviación estándar (DE). Hb= Hemoglobina; LDH= Lactato deshidrogenasa; CAT= Catalasa.

Parámetro	X $\pm$ DE
Hb (g/dL)	4.56 $\pm$ 1.96
Glucosa (mg/dL)	6.40 $\pm$ 2.98
Triglicéridos (mg/dL)	58.45 $\pm$ 5.70
Proteínas (mg/dL)	0.58 $\pm$ 0.14
LDH (U/mg proteínas)	15.18 $\pm$ 3.38
CAT (U/mg proteínas)	9.20 $\pm$ 6.70

Discusión

En la hemolinfa de *A. tuberculosa* se observan cinco morfotipos celulares; eritrocitos, granulocitos traslucidos, hialinocitos, amebocitos y blastocitos, ordenados según su abundancia. La variedad celular confirma la complejidad funcional de este tejido y la posible participación en los mecanismos de tolerancia a las condiciones ambientales del manglar. Al igual que en la mayoría de los bivalvos, los granulocitos son un tipo celular abundante, los cuales contienen en su citoplasma numerosos gránulos ricos en diferentes moléculas de almacenaje, inmunitarias y pigmentos respiratorios (Allan & Raftos 2015, Kladchenko et al. 2020a). Se ha sugerido que la aparición de varios tipos de gránulos intracelulares podrían estar relacionados con los procesos de diferenciación y maduración; concretamente los gránulos inmaduros son basófilos, y que al madurarse se convierten en acidófilos (Chen et al. 1996). De igual manera, los amebocitos comparten funciones defensivas con los eritrocitos y hialinocitos (Kladchenko et al. 2020b).

Comparando los morfotipos celulares encontrados en las especies de *Anadara*, encontramos que en *A. senilis* (Gabriel et al. 2011), *A. broughtonii* (Zhou et al. 2013) y *A. antiqueta* se han dividido a los hemocitos en células rojas, blancas y trombocitos (Hameed et al. 2018). En *A. inaequalis* fueron denotados como granulocitos, hialinocitos, blastocitos y eritrocitos (Holden et al. 1994; Kim et al. 2020), y agranulocitos, fibrocitos, monocitos, pla-

quetas (Suganthi et al. 2009). En *A. trapezia* y *A. ovalis* se mencionan agranulocitos, amebocitos y eritrocitos (Dang et al. 2013). Recientemente, Kladchenko et al. (2020) consideró separar a los hemocitos de *A. kagoshimensis* en eritrocitos, amebocitos y células intermediarias. Por otra parte, se conoce que la abundancia relativa de los hemocitos puede ser afectada por los cambios estacionales, la temperatura, el tamaño, el sexo, la madurez, la disponibilidad de alimento y la variabilidad interindividual (Soudant et al. 2004; Matozzo et al. 2010; Kim et al. 2022); aspectos que deben ser investigados en *A. tuberculosa*.

La retención de rojo neutro en los hemocitos de *A. tuberculosa* fue mayor a los 240 min, lo que demuestra la estabilidad de sus membranas lisosomales y el óptimo estado de salud de los reproductores. Cualquier alteración de los organelos produciría una reducción en el tiempo de retención del colorante, por ejemplo, se esperaría que células estresadas en los primeros minutos de observación muestren hemocitos con lisosomas fragmentados y citoplasma coloreado (Martínez-Gómez et al. 2015, Zapata-Vívenes et al. 2022). Se conoce que valores menores de 90 min en el tiempo de retención del rojo neutro sugieren que los organismos muestreados están gravemente estresados o probablemente presentan una patología; pero los valores de retención menores de 120 min indicarían estrés, que puede ser compensado (Davies et al. 2012). La poca retención del colorante sería el reflejo del deterioro de la bomba de iones H^+ de la membrana (Lowe & Pipe 1994).

La concentración hemolítica media demostró la tolerancia de los hemocitos de *A. tuberculosa* hasta 5‰ de salinidad durante 2h; resistencia celular que estaría regida por la tonicidad de sus membranas. Este registro evidencia la capacidad de osmorregulación y su adaptación a ambientes con fluctuaciones osmóticas. La fragilidad osmótica puede proporcionar información sobre la relación superficie/volumen de los hemocitos, la cual puede variar bajo cambios de osmorregulación u otras condiciones patológicas, como puede ocurrir en vertebrados (Beutler, 1990; Tritschler 2015). En *A. tuberculosa*, la FO demuestra la tolerancia celular a los cambios de salinidad en el medio y los trastornos asociados a la resistencia de las membranas hemocitarias. En experimentos realizados con adultos de *A. tuberculosa* se ha registrado tolerancias entre 20 y 40‰; sin embargo, en el ecosistema de manglar la salinidad puede descender hasta 10‰ durante las temporadas de lluvias intensas, provocando incremento en mortalidad de semillas y adultos (Nieves et al. 2009, Mendoza et al. 2017). Vega et al. (2021) señalan que el hábitat ideal de *A. tuberculosa* está influenciado por los ciclos de mareas y salinidades superiores a 12‰. Posiblemente esta capacidad de los hemocitos pueda garantizar la supervivencia en medios de cambios de salinidad temporales. Kladchenko et al. (2022) reportan tolerancia de salinidades menores a 7‰ en hemocitos de *A. kagoshimensis*. También, se conoce que la fragilidad de las células sanguíneas puede aumentar por la edad, contaminación y daño celular (Orbach et al. 2017). Entonces, la FO puede llegar a ser una prueba para examinar la tolerancia de bivalvos reproductores a cambios de salinidad de su entorno.

Las concentraciones de hemoglobina demuestran la importancia que tiene esta proteína en la fisiología y supervivencia de la almeja. Los hemocitos de las almejas del género *Anadara* contienen Hb dimérica (30%) y tetramérica (60%) localizadas en citoplasma o acumulada en gránulos (Bao et al. 2013). En *A. tuberculosa*, al igual que en vertebrados, la Hb es de tipo A y está contenida en los eritrocitos en elevadas concentraciones, cumpliendo funciones de transporte del oxígeno y otras sustancias desde la hemolinfa a los tejidos. Sin embargo, se ha implicado a la Hb en las respuestas de defensa inmunitaria contra infección bacteriana (Bao et al. 2011), reflejando un alto grado de especialización y adaptación a una amplia gama de condiciones. Las concentraciones de Hb pueden variar de acuerdo con ciertas condiciones ambientales de baja disponibilidad de oxígeno (Kladchenko et al. 2020; Wang et al. 2021). Adicionalmente, el hábito de *A. tuberculosa* de vivir enterrada en el fango y condicionados a los cambios de mareas propicia el mantenimiento de reservas de biomoléculas tales como carbohidratos, lípidos y proteínas en sus tejidos blandos, para luego ser transferidos y mantenerlos disponibles en la hemolinfa, con la finalidad de suplir los requerimientos energéticos de la reproducción y crecimiento (Haider et al. 2020). Por lo tanto, los análisis de química sanguínea indicarían la disponibilidad de los combustibles energéticos en la hemolinfa y la condición fisiológica de los reproductores.

La actividad de las enzimas LDH y catalasa dan referencia a la capacidad anaeróbica y aeróbica que posee *A. tuberculosa* para tolerar los cambios ambientales en el ecosistema donde habita, particularmente los cambios de marea. Durante la bajamar, la LDH citoplasmática es preponderante para la generación continua de energía bajo condiciones anaeróbicas provocada por una hipoxia inducida (Farhana et al. 2022). La liberación de LDH puede señalar la pérdida de la integridad de la membrana celular bajo procesos de apoptosis, necrosis u otras formas de deterioro (Chan, 2013; Kamiloglu et al. 2020). Sin embargo, durante la pleamar la entrada de oxígeno a los tejidos estimula a la reactivación de producción de energía a través las rutas aeróbicas mitocondriales, lo que puede conllevar a la formación de especies reactivas del oxígeno (ROS) (Freire et al. 2011; Donaghy et al. 2015; Yin et al. 2017), particularmente el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). El H_2O_2 es un potente oxiradical el cual puede ser removido rápidamente por la acción de la catalasa (Soldatov et al. 2013). La actividad de catalasa en la hemolinfa demuestra la capacidad de protección antioxidante en el continuo cambio de condiciones aeróbicas durante la disponibilidad de oxígeno de la pleamar a condiciones anaeróbicas durante la baja mar (hipoxia), garantizando la supervivencia de las almejas durante los cambios de mareas.

Se propone el uso de los parámetros hemocitarios y la química sanguínea como marcadores de salud en reproductores de *A. tuberculosa*, los cuales pueden servir como referencia del estado fisiológico en individuos de vida libre, cultivados, mantenidos en cautiverio y/o afectados por estrés ambiental.

Literatura citada

- Aebi H. 1984. [13] Catalase in vitro. In: *Methods in Enzymology*. Vol. 105; p. 121–126. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3)
- Allam B, Raftos D. 2015. Immune responses to infectious diseases in bivalves. *Journal of Invertebrate Pathology*. 131:121–136. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.05.005>
- Bao Y, Wang Q, Lin Z. 2011. Hemoglobin of the bloody clam *Tegillarca granosa* (Tg-HbI) is involved in the immune response against bacterial infection. *Fish & Shellfish Immunology*. 31(4):517–523. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2011.05.029>
- Bao YB, Wang Q, Guo XM, Lin ZH. 2013. Structure and immune expression analysis of hemoglobin genes from the blood clam *Tegillarca granosa*. *Genetics and Molecular Research* 12(AOP). <https://doi.org/10.4238/2013.february.28.5>
- Beutler E. 1990. Osmotic Fragility. En: Williams JW, Beutler E, Erslev AJ, et al. 1990. (Eds). *Hematology*. 4th edition, pp. 1726–1728. New York: McGraw Hill Publishing Co.
- Bucolo G, David H. 1973. Quantitative Determination of Serum Triglycerides by the Use of Enzymes. *Clinical Chemistry*. 19(5):476–482. <https://doi.org/10.1093/clin-chem/19.5.476>
- Castellanos-Galindo GA, Cantera JR, Espinosa S, Mejía-Ladino LM. 2011. Use of local ecological knowledge, scientist's observations and grey literature to assess marine species at risk in a tropical eastern Pacific estuary. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*. 21(1):37–48. <https://doi.org/10.1002/aqc.1163>
- Chan FK-M, Moriawaki K, De Rosa MJ. 2013. Detection of Necrosis by Release of Lactate Dehydrogenase Activity. In: Snow AL, Lenardo MJ, editors. *Immune Homeostasis: Methods and Protocols*. Totowa, NJ: Humana Press; p. 65–70. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-290-2_7
- Cheng TC. 1996. Hemocytes: Forms and Functions. In: Kennedy VS, Newell RIE, Eble AF, (Eds). *The Eastern Oyster: Crassostrea virginica*. p. 772. College Park, MD: Maryland Sea Grant Book.
- Daci JV, Lewis SM. 1996. *Practical Hematology*. 7th Edition, pp. 196–200. London: Charchill and Livingston.
- Dang C, Cribb TH, Osborne G, Kawasaki M, Bedin A-S, Barnes AC. 2013. Effect of a hemiuroid trematode on the hemocyte immune parameters of the cockle *Anadara trapezia*. *Fish & Shellfish Immunology*. 35(3):951–956. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.07.010>
- Davies IM, Gubbins M, Hylland K, Maes T, Martínez-Gómez C, Giltrap M, Burgeot T, Wosniok W, Lang T, Vethaak AD. 2012. Technical annex: assessment criteria for biological effects measurements, 209–212. En: Davies IM, Vethaak AD (Eds). *Integrated monitoring of chemicals and their effects*. 277 pp. ICES Cooperative Research Report No. 315
- de la Ballina NR, Maresca F, Cao A, Villalba A. 2022. Bivalve Haemocyte Subpopulations: A Review. *Frontiers in Immunology* 13. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2022.826255>
- Donaghy L, Volety AK. 2011. Functional and metabolic characterization of hemocytes of the green mussel, *Perna viridis*: in vitro impacts of temperature. *Fish & Shellfish Immunology*. 31(6):808–814. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2011.07.018>
- Donaghy L, Hong H-K, Jauzein C, Choi K-S. 2015. The known and unknown sources of reactive oxygen and nitrogen species in haemocytes of marine bivalve molluscs. *Fish & Shellfish Immunology*. 42(1):91–97. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.10.030>
- Farhana A, Lappin SL. Biochemistry, Lactate Dehydrogenase. (Updated 2022 May 8). In: StatPearls (Internet). Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557536/>
- Freire CA, Welker AF, Storey JM, Storey KB, Hermes-Lima M. 2011. Oxidative Stress in Estuarine and Intertidal Environments (Temperate and Tropical). In: Abele D, Vázquez-Medina JP, Zenteno-Savín T, editors. *Oxidative Stress in Aquatic Ecosystems*. West Sussex: John Wiley & Sons, Ltd; p. 41–57. <https://doi.org/10.1002/9781444345988.ch3>
- Fernández-Arias, H.T, Miranda Ávila, Y E., Uria Galicia. 1988. Estudio descriptivo de la hemolinfa de *Anadara* (*Anadara*) tuberculosa Sowerby, 1833. (Mollusca: Peleopoda: Arcidae). I Componentes y características generales del plasma. *Anales de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, México*, 32: 63–73.
- Gabriel UU, Akinrotimi OA, Orlu EE. 2011. Haematological characteristics of the Bloody cockle *Anadara senilis* (L.) from Andoni flats, Niger Delta, Nigeria. *Science World Journal*. 6(1):1–4. <https://doi.org/10.4314/swj.v6i1.70305>
- Gornall, Ag., Bardawill, Cj., David, Mm. 1949. Determination of serum proteins by means of the Biuret reaction. *Journal of Biological Chemistry* 177(2):751–66. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)57021-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)57021-6)
- Haider F, Timm S, Bruhns T, Noor MN, Sokolova IM. 2020. Effects of prolonged food limitation on energy metabolism and burrowing activity of an infaunal marine bivalve, *Mya arenaria*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*. 250:110780. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2020.110780>
- Hameed A, Muhammad F, Muhammad AA, Shafi M, Sultana R. 2018. Morphological and structural characterization of blood cells of *Anadara antiquata*. *Iranian Journal of Fisheries Sciences* 17:613–9.
- Hine PM. 1999. The inter-relationships of bivalve haemocytes. *Fish & Shellfish Immunology*. 9(5):367–385. <https://doi.org/10.1006/fsim.1998.0205>
- Holden JA, Pipe RK, Quaglia A, Ciani G. 1994. Blood cells of the arcid clam, *Scapharca inaequivalvis*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*. 74(2):287–299. <https://doi.org/10.1017/S0025315400039333>
- Kamiloglu S, Sari G, Ozdal T, Capanoglu E. 2020. Guidelines for cell viability assays. *Food Frontiers*. 1(3):332–349. <https://doi.org/10.1002/fft2.44>
- Kampen EJ van, Zijlstra WG. 1966. Determination of Hemoglobin and Its Derivatives. In: Sobotka H, Stewart CP, editors. *Advances in Clinical Chemistry*. Vol. 8; p. 141–187. [https://doi.org/10.1016/S0065-2423\(08\)60414-X](https://doi.org/10.1016/S0065-2423(08)60414-X)
- Kladchenko ES, Andreyeva AY, Kukhareva TA, Soldatov AA. 2020a. Morphologic, cytometric and functional characterisation of *Anadara kagoshimensis* hemocytes. *Fish & Shellfish Immunology*. 98:1030–1032. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.11.061>

- Kladchenko ES, Andreyeva AY, Kukhareva TA, Rychkova VN, Soldatov AA. 2020b. Impact of 24-hour hypoxia on hemocyte functions of *Anadara kagoshimensis* (Tokunaga, 1906). *Marine Biological Journal*. 5(4):28–36. <https://doi.org/10.21072/mbj.2020.05.4.03>
- Kladchenko ES, Andreyeva AY, Mindukshev IV, Gambaryan S. 2022. Cellular osmoregulation of the ark clam (*Anadara kagoshimensis*) hemocytes to hyposmotic media. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological and Integrative Physiology*. 337(5):434–439. <https://doi.org/10.1002/jez.2578>
- Kim J-H, Lee H-M, Cho Y-G, Shin J-S, You J-W, Choi K-S, Hong H-K. 2020. Flow cytometric characterization of the hemocytes of blood cockles *Anadara broughtonii* (Schrenck, 1867), *Anadara kagoshimensis* (Lischke, 1869), and *Tegillarca granosa* (Linnaeus, 1758) as a biomarker for coastal environmental monitoring. *Marine Pollution Bulletin*. 160:111654. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2020.111654>
- Kim J-H, Lee H-M, Cho Y-G, Shin J-S, Yoo J-W, Hong H-K, Choi K-S. 2022. Effects of spawning stress on the immune capacity of blood cockle *Tegillarca granosa* occurring on the south coast of Korea. *Fish & Shellfish Immunology*. 120:15–22. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2021.11.013>
- Livingstone DR, Stickle WB, Kapper MA, Wang S, Zurburg W. 1990. Further studies on the phylogenetic distribution of pyruvate oxidoreductase activities. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*. 97(4):661–666. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(90\)90104-2](https://doi.org/10.1016/0305-0491(90)90104-2)
- Louis KS, Siegel AC. 2011. Cell Viability Analysis Using Trypan Blue: Manual and Automated Methods. In: Stoddart MJ, editor. *Mammalian Cell Viability: Methods and Protocols*. Totowa, NJ: Humana Press; p. 7–12. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-108-6_2
- Lucero C, Cantera J, Neira R. 2012. Pesquería y crecimiento de la piangua (Arcoida: Arcidae) *Anadara tuberculosa* en la Bahía de Málaga del Pacífico colombiano, 2005–2007. *Revista de Biología Tropical*. 60(1). <https://doi.org/10.15517/rbt.v60i1.2754>
- Loján Avellán MC, Zapata Vivenes E, Lodeiros Seijo C, Treviño LM. 2021. Biomarcadores celulares e inmunológicos en la ostra del Pacífico *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) cultivada en un estuario tropical durante la temporada lluviosa. *La Técnica: Revista de las Agrociencias, edición especial (julio)*:52–68. https://doi.org/10.33936/la_tecnica.v0i0.3065
- Lowe DM, Pipe RK. 1994. Contaminant induced lysosomal membrane damage in marine mussel digestive cells: an in vitro study. *Aquatic Toxicology*. 30(4):357–365. [https://doi.org/10.1016/0166-445X\(94\)00045-X](https://doi.org/10.1016/0166-445X(94)00045-X)
- Mangum ChP. 1992. Respiratory Function of the Red Blood Cell Hemoglobins of Six Animal Phyla. In: Mangum Charlotte P, editor. *Blood and Tissue Oxygen Carriers*. Berlin, Heidelberg: Springer; p. 117–149. https://doi.org/10.1007/978-3-642-76418-9_5
- Martínez-Gómez C, Bignell J, Lowe D. (Eds). 2015. Lysosomal membrane stability in mussels. *ICES Techniques in Marine Environmental Science*, 56. pp. <https://doi.org/10.17895/ices.pub.5084>
- Matozzo V, Marin MG. 2010. First evidence of gender-related differences in immune parameters of the clam *Ruditapes philippinarum* (Mollusca, Bivalvia). *Marine Biology*. 157(6):1181–1189. <https://doi.org/10.1007/s00227-010-1398-4>
- Mendoza O, Pretell K, Diringier B, Avellan R, Zapata K, Marchan A, Cedeño V, Peralta T, Ordinola A, Mialhe E. 2017. Respuesta fisiológica y molecular de *Anadara tuberculosa* (Arcoida: Arcidae) al estrés de salinidad. *Revista de Biología Tropical*. 65(3):1142–1151. <https://doi.org/10.15517/rbt.v65i3.29448>
- Mora E, Jurado J, Flores VY. 2010. La pesquería de la concha prieta (*Anadara tuberculosa* y *Anadara similis*) en el 2009: indicadores pesqueros y condición reproductiva en la zona sur y norte de Ecuador. *Boletín Científico-Técnico*, 20(8), 35–49.
- Nabi N, Ahmed I, Wani GB. 2022. Hematological and serum biochemical reference intervals of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* cultured in Himalayan aquaculture: Morphology, morphometrics and quantification of peripheral blood cells. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 29(4):2942–2957. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2022.01.019>
- Nieves M, Román JC, Piña P, Medina A, Leal S, Miranda A, Muñoz G. 2009. Balance energético de *Anadara tuberculosa* (SOWERBY, 1833) a diferentes temperaturas. *Revista de Investigaciones Marinas*, 30: 135–144.
- Orbach A, Zelig O, Yedgar S, Barshtein G. 2017. Biophysical and Biochemical Markers of Red Blood Cell Fragility. *Transfusion Medicine and Hemotherapy-TMH*. 44(3):183–187. <https://doi.org/10.1159/000452106>
- Panta-Vélez, R.P., Bermúdez-Medrandá, A., Mero, P., Arrieche, D., Acosta-Balbás, V. 2020. Reproductive Cycle of *Anadara tuberculosa* (Sowerby, 1833) (Bivalvia: Arcidae) in a mangrove system of the Chone River Estuary, Ecuador. *Adv. Environ. Biol.* 14(2): 1–11. <https://doi.org/10.22587/aeb.2020.14.2>
- Rodríguez-Monroy C, Prado-Carpio E, Martínez-Soto M, Morris-Díaz A. 2020. Agribusiness Management Characterization and Performance of the Value Chain in the Production of the “Concha Prieta.” *Proceedings in Food System Dynamics* (0):63–83. <https://doi.org/10.18461/pfsd.2020.2007>
- Quiñónez-Cabeza MR, Nazareno-Veliz IT, Camacho-Marín RA, y Cedeño-Coveña MV. 2020. Proceso de comercialización y extracción de productos de manglar, San Lorenzo-Ecuador. *Revista Venezolana de Gerencia* 25(91), 885–899. <https://doi.org/10.37960/rvg.v25i91.33172>
- Reshma KJ, Sumithra TG, Vishnu B, Jyothi R, Ratheesh Kumar R, Pootholathil S, Sanil NK. 2020. Indexing serum biochemical attributes of *Lutjanus argentimaculatus* (Forsskal, 1775) to instrument in health assessment. *Aquaculture Research*. 51(6):2590–2602. <https://doi.org/10.1111/are.14601>
- Soldatov AA, Gostyukhina OL, Borodina AV, Golovina IV. 2013. Qualitative composition of carotenoids, catalase and superoxide dismutase activities in tissues of the bivalve mollusc *Anadara inaequalis* (Bruguere, 1789). *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*. 49(4):389–398. <https://doi.org/10.1134/S0022093013040026>
- Soudant P, Paillard C, Choquet G, Lambert C, Reid HI, Marhic A, Donaghy L, Birkbeck TH. 2004. Impact of season and rearing site on the physiological and immunological parameters of the Manila clam *Venerupis (=Tapes, =Ruditapes) philippinarum*. *Aquaculture*. 229(1):401–418. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00352-1](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00352-1)

- Suganthi, K., Bragadeeswaran, S., Prabhu, K., Rani, S.S. 2009. In Vitro Assessment of haemocyte and thrombocyte count from the blood clam of *Anadara inequalvis*. Middle-East Journal of Scientific Research (MEJSR) 4:163-7.
- Trinder P. 1969. Determination of blood glucose using an oxidase-peroxidase system with a non-carcinogenic chromogen. Journal of Clinical Pathology. 22(2):158-161. <https://doi.org/10.1136/jcp.22.2.158>
- Tritschler C, Mizukami K, Raj K, Giger U. 2016. Increased erythrocytic osmotic fragility in anemic domestic shorthair and purebred cats. Journal of Feline Medicine and Surgery. 18(6):462-470. <https://doi.org/10.1177/1098612X15587574>
- Uria-Galicia, E., Fernández Arias H. Miranda Avila, Y T. 1988. Estudio descriptivo de la hemolinfa de *Anadara* (*Anadara*) tuberculosa Sowerby, 1833. (Mollusca: Pelecipoda: Arcidae). Cuantificación de la hemoglobina celular y plasmática. Anales de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, México32: 75-81.
- Vega ÁJ, P YAR, Alvarado O, Mitre CC. 2021. Estructura de tallas, distribución y abundancia de *Anadara tuberculosa* (Bivalvia: Arcidae) en dos sistemas de manglar del Pacífico de Panamá. Revista de Biología Tropical. 69(2):422-433. <https://doi.org/10.15517/rbt.v69i2.43934>
- Viceministerio de Acuicultura y Pesca de Ecuador (VMAPE). 2021. Plan de acción provincial para el manejo y la conservación de la concha prieta (*Anadara similis* y *A. tuberculosa*) en El Oro, Ecuador. Proyecto Iniciativa Pesquerías Costeras. Manta, Ecuador: Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo y Conservación Internacional Ecuador.
- Wang Y, Zheng Y, Dong J, Zhang X. 2021. Two-sided effects of prolonged hypoxia and sulfide exposure on juvenile ark shells (*Anadara broughtonii*). Marine Environmental Research. 169:105326. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2021.105326>
- Yin X, Chen P, Chen H, Jin W, Yan X. 2017. Physiological performance of the intertidal Manila clam (*Ruditapes philippinarum*) to long-term daily rhythms of air exposure. Sci Rep. 7(1):41648. <https://doi.org/10.1038/srep41648>
- Zapata-Vívenes E, Astudillo LR de, Sánchez G, Barreto M. 2012. Heavy metals and related biomarkers in *Perna viridis* (Bivalvia: Mytilidae) collected on the coast of Sucre State, Venezuela. Ciencias Marinas. 38(3):517-528. <https://doi.org/10.7773/cm.v38i3.2046>
- Zapata Vívenes E, Sánchez G, Nusetti O, Marcano L del V. 2022. Modulation of innate immune responses in the flame scallop *Ctenoides scaber* (Born, 1778) caused by exposure to used automobile crankcase oils. Fish & Shellfish Immunology. 130:342-349. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2022.09.020>
- Zhou L, Yang A, Wang Q, Liu Z, Wu B, Tian J, et al. 2013. Studies on the hemocytes types and their immunological functions in bloody clam (*Scapharca broughtonii*). Journal of Fisheries of China 37:599-606. <https://doi.org/10.3724/SPJ.1231.2013.38321>

Agradecimientos / Acknowledgments:

Al Licenciado Arturo Moreira MSc. coordinador del laboratorio clínico BIO-LAB (San Vicente, Manabí) y al Departamento de Acuicultura, Pesca y Recursos Naturales Renovables de la Universidad Técnica de Manabí.

Conflicto de intereses / Competing interests:

Los autores declaran que no tienen intereses financieros conocidos que compitan con ellos ni relaciones personales que pudieran parecer influir en el trabajo presentado en este artículo.

Rol de los autores / Authors Roles:

KE: Análisis formal; Investigación; Visualización; Redacción: revisión y edición; Escritura-Preparación del borrador original.

EZ-V: Conceptualización; Análisis formal; Investigación; Visualización; Escritura-Preparación del borrador original; Redacción: revisión y edición.

CL: Conceptualización; Análisis formal; Investigación; Visualización; Escritura-Preparación del borrador original; Redacción: revisión y edición.

Fuentes de financiamiento / Funding:

Parte del desarrollo de la investigación fue logrado a través de una beca de titulación en la Maestría Académica con Trayectoria de Investigación en Acuicultura obtenida por la Ingeniero Karen Espinoza, y otorgada por el Vicerrectorado de la Universidad Técnica de Manabí.

Aspectos éticos / legales; Ethics / legals:

Los autores declaran no haber incurrido en aspectos antiéticos. Las colectas de las conchas fueron realizadas por los integrantes de la Asociación de Pescadores Artesanales "Portovelo", San Vicente, Manabí. Los autores declaran no haber violado u omitido normas éticas o legales al realizar la investigación y esta obra.