
UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y

AGROPECUARIAS



"Efecto del estrés hipo- e hiperosmótico en la supervivencia
y respuesta fisiológica del ostión de placer *Crassostrea*
corteziensis (Hertlein, 1951) "

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

LICENCIADO EN BIOLOGIA

PRESENTA

RICARDO PÉREZ VELASCO

Las Agujas, Zapopan, Jal., Febrero del 2014

"Efecto del estrés hipo- e hiperosmótico en la supervivencia
y respuesta fisiológica del ostión de placer *Crassostrea*
corteziensis (Hertlein, 1951) “

Tesis presentada por:

Ricardo Pérez Velasco

Dirigida por:

Dr. Miguel Ángel Hurtado Oliva

Asesores:

Dr. Mario Nieves Soto

M. en C. Eduardo Juárez Carrillo



Universidad de Guadalajara
Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias
Coordinación de Carrera de la Licenciatura en Biología

COORD-BIO-001/2013.

C. RICARDO PÉREZ VELASCO
PRESENTE

Manifiestamos a usted, que con esta fecha, ha sido aprobado su tema de titulación en la modalidad de TESIS E INFORMES opción TESIS con el título: "Efecto del estrés hipo- e hiperosmótico en la supervivencia y respuesta fisiológica del ostión de placer *Crassostrea corteziensis* (Hertlein, 1951)", para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos, que ha sido aceptado como director de dicho trabajo: Dr. Miguel Angel Hurtado Oliva y como asesores al M.C Eduardo Juárez Carrillo y al Dr. Mario Nieves Soto.

Sin más por el momento, aprovechamos para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"PIENSA Y TRABAJA"

Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jal., 20 de junio de 2013


DRA. GEORGINA ADRIANA QUIROZ ROCHA
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN



COORDINACIÓN DE LA CARRERA DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA


M.C. VERÓNICA PALOMERA ÁVALOS
SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

FORMA F

Dra. Georgina Adriana Quiroz Rocha.
Presidente del Comité de Titulación.
Licenciatura en Biología.
CUCBA.
Presente

Nos permitimos informar a usted que habiendo revisado el trabajo de titulación, modalidad Tesis e informes, opción Tesis con el título: "Efecto del estrés hipo- e hiperosmótico en la supervivencia y respuesta fisiológica del ostión de placer *Crassostrea corteziensis* (Hertlein, 1951)" que realizó el pasante Ricardo Pérez Velasco con número de código 005125693 consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorizar su impresión.

Sin otro particular quedamos de usted con un cordial saludo.

Atentamente
Zapopan Jalisco a 27 de noviembre de 2013

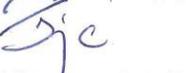

Firma
Dr. Miguel Ángel Hurtado Oliva
Director del trabajo


Firmas
M en C. Eduardo Juárez Carrillo
Dr. Mario Nieves Soto
Asesor(es)

Nombre completo de los Sinodales asignados por el Comité de Titulación

Dr. Eduardo Ríos Jara
M en C. Martín Pérez Peña
Dr. Alfonso Enrique Islas Rodríguez
Supl. M en C. Eduardo Juárez Carrillo

Firma de aprobado

	5 dic 2013
	9 dic 2013
	5 Dic 2013
	05 Dic 2013

COMITE DE
TITULACION



LICENCIATURA
EN BIOLOGIA



9-12-13

Dedicatoria

A DIOS POR HABERME PUESTO EN EL CAMINO.

A LA VIDA, POR DARME CADA DÍA UNA OPORTUNIDAD, UNA NUEVA PREGUNTA Y UNA RAZÓN DE SER.

A TI, QUERIDO LECTOR, QUE TE TOMAS LA MOLESTIA DE LEER ESTE HUMILDE TRABAJO.

Agradecimientos

A mis padres **Leticia Velasco** y **Marcos Pérez**, los cimientos de mi vida. Porque mis logros son sus logros y mis sueños sus sueños. Por haberme formado tan bien como lo hicieron. Esta Tesis es suya.

A mis hermanos: **Verónica Leticia Pérez, Fátima Saray Pérez y Marcos Alejandro Pérez**, mi primera manada, mi primer equipo y mis mejores amigos.

A mi director de Tesis el **Dr. Miguel Ángel Hurtado Oliva**, por guiarme en este camino. Por haber compartido tanta experiencia y conocimiento conmigo, le estaré eternamente agradecido.

A mis asesores el **Dr. Mario Nieves Soto** y el **M. en C. Eduardo Juárez Carrillo**, por las importantes aportaciones que hicieron a este trabajo.

A los compañeros **Idalia Osuna, Stephanie Navarro, Sarahí Ovalle Torres, Juan Flores Alarcón, Otbel Hernán Sepúlveda y Martín Guerrero**. Por su invaluable ayuda durante el desarrollo experimental de esta tesis. Esto no habría sido posible sin ustedes.

A la **Universidad de Guadalajara**, y especialmente al **CUCBA**, mi segundo hogar. Por haberme formado como profesional. A todos sus profesores, gracias por compartir ese tesoro invaluable llamado conocimiento.

A la **Universidad Autónoma de Sinaloa** y su **Facultad de Ciencias del Mar** que se volvió como una segunda casa de estudios para mí, a ella le debo gran parte de mi formación.

A la **casa estudiantil Octubre Rojo, sus moradores y ex moradores: Trompeta, Satanás, la comadre, la dueña, el porqui, el bolillo, el ratón, el tres letras y el legendario bebe dinosaurio**. Por haberme enseñado a vivir en comunidad. Porque mientras yo me buscaba entre silencio y soledad, me encontré entre la multitud y algarabía de sus cuartos.

Al **Dr. Tomas Lasso Gómez**, por haberme inculcado el arte de la estadística.

A mis amigos, camaradas y compañeros del camino, **mis queridos Gazapos: Enrique (basta masa pulposa), Mayra (chaneke), Fátima (chola), Alejandra Pérez (prima), Ana Laura (chona), y Sachis**. Gracias por ser mi segunda familia.

A **los ostiones** que dieron su vida en nombre de esta tesis. Espero que este trabajo ayude en algo a los de su especie.

SEDE DEL ESTUDIO

El presente trabajo se realizó en EL LABORATORIO DE ECOFISIOLOGIA DE ORGANISMOS ACUÁTICOS Y CULTIVOS DE APOYO EN LA ACUICULTURA, el cual pertenece al cuerpo académico del mismo nombre en la FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR de la UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA.

APOYO FINANCIERO

SEP-PROMEP “Caracterización de Organismos Acuáticos con Potencial para la Biorremediación de Efluentes Acuícolas” de la Red Desarrollo y Manejo Sustentable de Sistemas de Producción Acuícola, **UAS-CA-162-Ecofisiología y Cultivo de Organismos Acuáticos**.

SEP-PROMEP/103.5/12/3360 “Efecto del estrés ambiental y condiciones de cultivo en la supervivencia y respuesta inmunológica del ostión de placer *Crassostrea corteziensis*”.

UAS-PROFAPI2011/080 “Evaluación y aprovechamiento de efluentes acuícolas en la maduración del ostión *Crassostrea corteziensis*”.

Índice General

I. Resumen	1
II. Introducción	2
III. Antecedentes	5
3.1. Osmosis.....	5
3.2. Osmolitos orgánicos	7
3.3. Metabolitos del plasma	9
3.4. Estrés osmótico y respuesta inmune.....	10
IV. Planteamiento del problema y justificación	12
4.1 Planteamiento del problema	12
4.2 Justificación.....	12
V. Hipótesis	12
VI. Objetivos.....	13
6.1. Objetivo general.....	13
6.2. Objetivos Particulares.....	13
VII. Materiales y Métodos	14
7.1. Origen y muestreo de los ostiones.....	14
7.1.1. Preparación de los ostiones	14
7.2. Diseño experimental	14
7.3. Obtención, separación y preservación de las muestras	15
7.4. Presión osmótica en la hemolinfa	16
7.5. Humedad	16
7.6. Proteínas totales en tejidos	16
7.7. Proteínas totales en plasma.....	17
7.8. Concentración de hemocianina	17
7.9. Concentración de glucosa en plasma	18
7.10. Conteo total y diferencial de hemocitos	18
7.11. Viabilidad de hemocitos	18
7.12. Análisis estadístico	19
VIII. Resultados	20
8.1. Supervivencia	20
8.2. Presión osmótica	20

8.3. Humedad	22
8.4. Proteínas totales en tejidos	24
8.5. Variables metabólicas del plasma	26
8.5.1. Proteínas totales.....	26
8.5.2. Hemocianina	26
8.5.6. Glucosa.....	28
8.6. Variables inmunológicas	30
8.6.1. Número total y diferencial de hemocitos	30
8.6.2. Viabilidad de hemocitos.....	31
VIII. Discusión.....	33
IX. Conclusiones	40
XI. Literatura Citada	42

Índice de Figuras

Figura 1. Producción (t) de las principales especies de ostión en México del año 2000 al 2010 (FAO 2011)..	2
Figura 2. Árbol filogenético de los Metazoarios, propuesto por Dunnet <i>al.</i> (2008).....	3
Figura 3. Presión osmótica (mOsm/kg) en la hemolinfa de ostiones sometidos a estrés hipoosmótico (A) e hiperosmótico (B) durante 48 horas.....	21
Figura 4. Humedad (%) en manto (A), músculo (B) y branquias (C) en ostiones sometidos a estrés hipo- , hiperosmótico y control (10, 50 y 35 ups respectivamente), durante 48 horas..	23
Figura 5. Proteínas totales (mg/g) en manto (A), músculo (B) y branquias (C) en ostiones sometidos a estrés hipo- , hiperosmótico y control (10, 50 y 35 ups respectivamente), durante 48 horas.	25
Figura 6. Concentración de hemocianina en plasma (mg/ml) de ostiones sometidos a estrés hipo- e hiperosmótico y control (10, 50 y 35 ups respectivamente), durante 48 horas..	27
Figura 7. Concentración de Hemocianina en plasma (medias globales, mg/ml) de ostiones sometidos a estrés hipo- ,hiperosmótico y control (10, 50 y 35 ups respectivamente), durante 48 horas..	27
Figura 8. Concentración de glucosa en plasma (mg/dl) de ostiones sometidos a estrés hipo- , hiperosmótico y control (10, 50 y 35 ups respectivamente), durante 48 horas.	29
Figura 9. Concentración de glucosa en plasma (medias globales, mg/dl) de ostiones sometidos a estrés hipo- , hiperosmótico y control (10, 50 y 35 ups respectivamente), durante 48 horas.	29
Figura 10. Hemocitos totales (células/ml) (A), Hialinocitos (B) y Granulocitos (C) de ostiones sometidos a estrés hipo- , hiperosmótico y control (10, 50 y 35 ups respectivamente), durante 48 horas.	32

Índice de Tablas

Tabla 1. Diseño experimental.....	15
Tabla 2. Supervivencia de los ostiones (%) sometidos a estrés hipo- , hiperosmotico y control (10, 50 y 35 ups respectivamente), durante de 48 horas.	20
Tabla 3. Proteínas totales (mg/ml) en plasma de ostiones sometidos a estrés hipo- , hiperosmotico y control (10, 50 y 35 ups respectivamente).....	26
Tabla 4. Mortalidad de hemocitos (%) en ostiones sometidos a estrés hipo- , hiperosmótico y control (10, 50 y 35 ups respectivamente).....	31

I. Resumen

El ostión de placer *Crassostrea corteziensis* es un importante recurso acuícola y pesquero en el noroeste del país, se pesca y cultiva principalmente en los estados de Sonora, Sinaloa y Nayarit. Actualmente los productores de la región han manifestado un incremento en la susceptibilidad a la mortalidad del ostión *C. corteziensis*, la cual se asocia a los incrementos en la salinidad de estuarios y lagunas donde habita o se cultiva, probablemente ocasionada por el represamiento de los ríos en algunos de estos sitios. Por tal motivo se evaluó el efecto del estrés hipo- e hiperosmótico en la supervivencia y fisiología del ostión *C. corteziensis*. Ciento ochenta ostiones fueron distribuidos bajo un diseño aleatorio en tres tratamientos de salinidad: estrés hipoosmótico, hiperosmótico y control (10, 50 y 35 ups respectivamente). Cuatro ostiones por tratamiento fueron muestreados a la 1, 2, 3, 6, 12, 24 y 48 horas. De cada organismo se determinó la presión osmótica de la hemolinfa, porcentaje de agua en tejidos (branquias, manto y músculo), concentración de proteínas totales en branquias, músculo y manto, concentración de proteínas, glucosa y hemocianina en el plasma, concentración total, diferencial y viabilidad de hemocitos en la hemolinfa. Los resultados demuestran que el ostión *Crassostrea corteziensis* es osmoconformador, puesto que la presión osmótica interna se ajustó a la del medio externo 6 y 48 hrs, durante el estrés hiperosmótico e hipoosmótico, respectivamente. El ajuste del volumen celular (humedad) fue más evidente en el manto y músculo que en las branquias, probablemente se deba a la diferencia en la exposición de los órganos y tejidos al medio externo. Se observó un incremento de la concentración de hemocianina en el estrés hipoosmótico, posiblemente causado por la disminución de la afinidad por el oxígeno, así como una mayor síntesis de la misma al incorporar los aminoácidos movilizados durante la disminución de la presión osmótica celular. Por el contrario, la disminución de la hemocianina en el estrés hiperosmótico pudiera deberse a una hidrólisis de la misma hasta aminoácidos libres para incrementar la presión osmótica celular con el incremento de la presión osmótica del medio externo. Se observaron variaciones en la concentración de glucosa en plasma, las cuales sugieren que la regulación iónica e hídrica, y el estrés osmótico en general, fue mayor durante el estrés hiperosmótico que en el hipoosmótico. Los cambios de salinidad no afectaron la viabilidad de los hemocitos, pero si su concentración total y diferencial (i.e. hialinos y granulares), disminuyendo particularmente en el estrés hiperosmótico. Esto podría aumentar la susceptibilidad a patógenos en esta especie de ostión, particularmente durante el incremento de la salinidad en estuarios y lagunas donde se cultiva.

II. Introducción

Los ostiones son un importante recurso económico para la pesca y la acuicultura en México. Durante el año 2009 este grupo aportó el 25.31 % de la producción nacional de moluscos (CONAPESCA, 2010). Las principales especies de ostiones que se aprovechan en México son *Crassostrea gigas*, *Crassostrea virginica* y *Crassostrea corteziensis* (FAO, 2010). De estas especies *C. gigas* es introducida, mientras que *C. virginica* y *C. corteziensis* son nativas (Fig. 1). El ostión *C. corteziensis* se explota en el noroeste de México, principalmente en los estados de Nayarit, Sinaloa y Sonora.

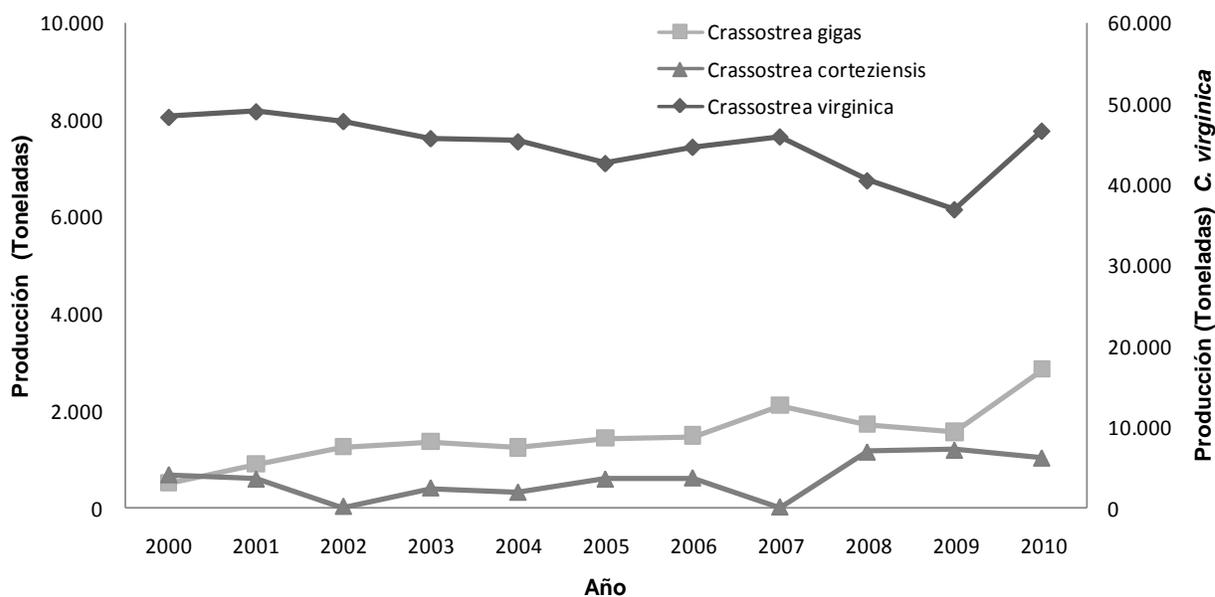


Figura 1. Producción (t) de las principales especies de ostión en México del año 2000 al 2010 (FAO 2011).

Los ostiones pertenecen al filo Mollusca, clase Bivalvia y orden Ostreoida. En la figura 2 podemos observar la posición de los moluscos en el árbol filogenético propuesto por Dunn *et al.* (2008).

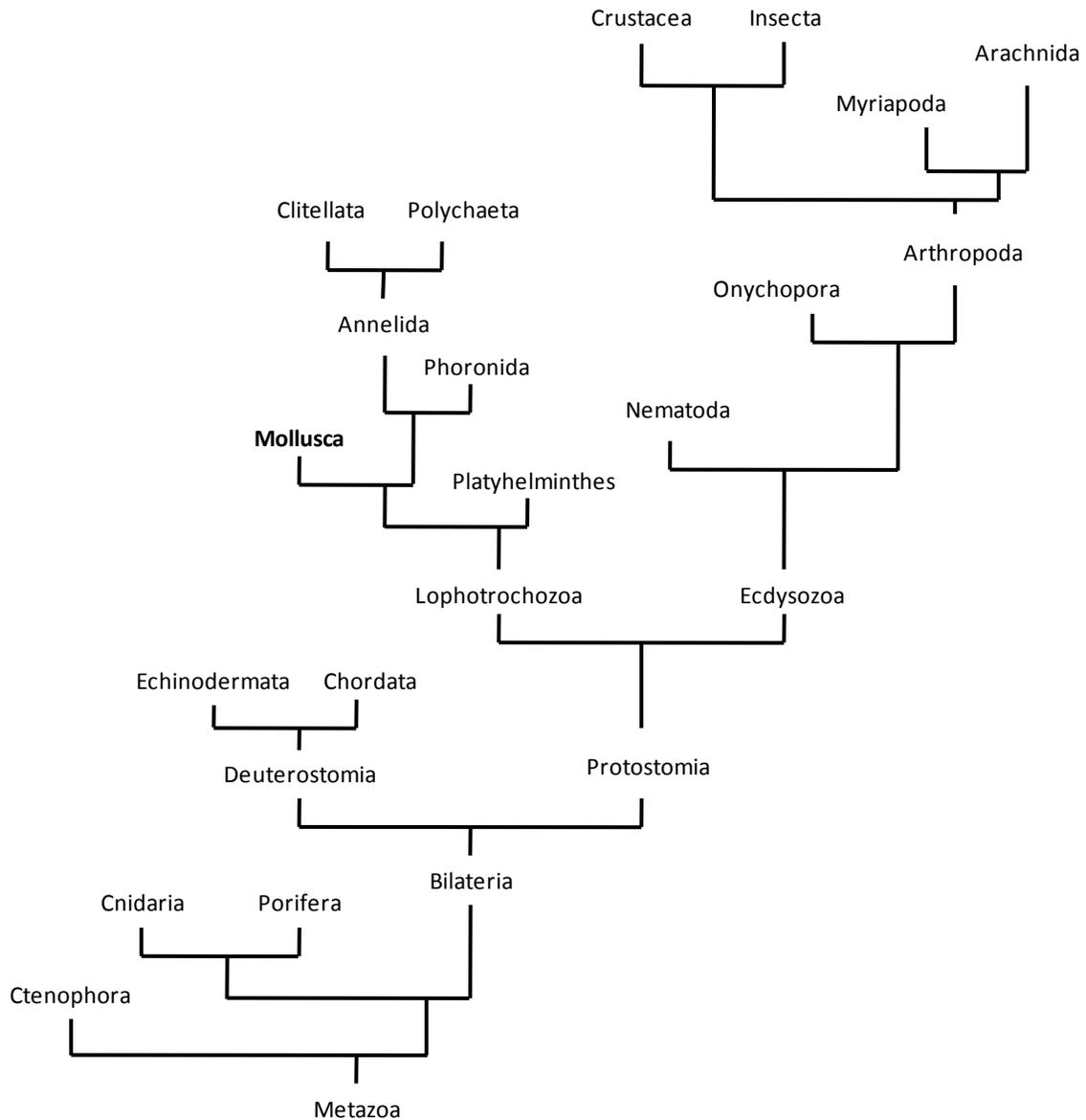


Figura 2. Árbol filogenético de los Metazoarios, propuesto por Dunnet *al.*(2008).

El ostión de placer *C. corteziensis* alcanza hasta 250 mm de longitud en promedio. Las conchas tienen una coloración blanquecina en su superficie externa y son de formas muy variables, generalmente alargadas y ovaladas. La valva derecha es aplanada y lisa o con láminas concéntricas, ligeramente café o gris púrpura; mientras que la izquierda se encuentra unida al

sustrato, es convexa y más grande que la derecha, frecuentemente con el umbo encorvado hacia atrás, externamente lisa o con tenues surcos radiales (Keen, 1971).

Esta especie de ostión se distribuye del Golfo de California hasta Panamá (Keen 1971). Habita en la zona intermareal en estuarios y lagunas costeras, adherido a las raíces del mangle y sustratos rocosos (Stuardo y Martínez, 1975). Los estuarios y lagunas costeras en las que se distribuye esta especie se caracterizan por la interacción entre agua dulce y salada, por lo que habitan regularmente en agua salobre.

Se han realizado estudios que abordan diferentes aspectos biológicos del ostión *C. corteziensis*. Dentro de los que destacan algunos relacionados con el efecto de la temperatura en el crecimiento y supervivencia de juveniles (Cáceres-Puig *et al.* 2007), cultivo en condiciones naturales (Chavez-Villalba *et al.* 2005), descripción de la anatomía de las gónadas y ciclo reproductivo (Stuardo y Martínez, 1975; Rodríguez-Jaramillo *et al.* 2008); caracterización de vitelina/vitelogenina (vt/vtg) para la determinación de la maduración gonádica (Arcos *et al.* 2009), eficiencia de dietas microalgales y rutinas de alimentación para la maduración en cautiverio (Mazón-Suástegui *et al.* 2008; Ojeda-Ramires *et al.* 2008; Hurtado *et al.* 2009a); efecto del ácido graso araquidónico (20:4n-6) en la maduración, respuesta inmune y síntesis de prostaglandinas (Hurtado *et al.* 2009b), y el efecto de la temperatura y la salinidad sobre la tasas de filtración (Guzmán-Agüero *et al.* 2013).

Los productores de la región han manifestado un incremento en la susceptibilidad a la mortalidad de este ostión, la cual parece estar asociada a cambios de la salinidad en los sitios donde habita o se cultiva, como consecuencia de la represa de los ríos. Sin embargo, a pesar del esfuerzo por estudio y cultivo de la especie se desconoce el efecto de los cambios bruscos de salinidad sobre la supervivencia y fisiología en *C. corteziensis*.

III. Antecedentes

3.1. Osmosis

La osmosis es un fenómeno físico que implica el flujo de un líquido a través de una membrana semipermeable en función a un gradiente en la concentración de solutos (iones, carbohidratos, aminoácidos, etc.) en ambos extremos de la membrana. En este sentido, el líquido se mueve de la mezcla con menor concentración de solutos hacia aquella que tiene una mayor concentración de solutos, buscando el estado de equilibrio. La presión osmótica es precisamente la presión que ejerce una mezcla de solutos disueltos en solución (i.e. agua), a través de una membrana semipermeable. Mezclas con altas concentraciones de solutos tienen una presión osmótica alta (Choe y Strange, 2009).

Los organismos que habitan en estuarios y lagunas costeras como *C. corteziensis* se encuentran expuestos a constantes cambios de salinidad y por ende se ven forzados a realizar ajustes en la presión osmótica de las células de sus tejidos, por lo que responden fisiológicamente para evitar la descompensación hídrica e iónica a nivel celular. Se conocen dos tipos de respuesta fisiológica al estrés osmótico: osmorregulación y osmoconformación (Deaton, 2009).

Los organismos osmorreguladores mantienen constante la presión osmótica de sus fluidos internos independientemente de los cambios en la presión osmótica del medio externo. Este tipo de organismos cuentan con mecanismos de excreción que les permiten el balance de iones intracelulares a través de complejos sistemas enzimáticos de membrana especializados en el transporte activo de iones tanto inorgánicos como orgánicos (Dawson y Liu, 2009; Deaton, 2009). Son osmorreguladores la mayoría de los vertebrados como los peces (Bentley, 2002) y algunos artrópodos acuáticos como diversas especies de crustáceos (Péqueux, 1995; Charmantier *et al* .2009).

En contraste, en los osmoconformadores la presión osmótica en los fluidos del organismo depende de la presión osmótica externa, y ambas se mantienen isotónicas, es decir mantienen una proporción similar soluto- solvente, regulando con ello el volumen celular (Sidney y Pierce, 1982). En general, se ha descrito que la mayoría de los moluscos bivalvos son osmoconformadores (Shumway, 1977), lo cual ha sido descrito para diferentes especies de ostiones (Tirad *et al.* 1997; Hosoi *et al.* 2003), mejillones (Deaton *et al.* 1984; Gainey, 1987; Neufeld, y Wright, 1996) y almejas (Matozzo *et al.* 2007).

Muchos bivalvos que habitan en ambientes marinos, estuarios y lagunas costeras, como *Mytilus edulis* (Deaton *et al.* 1984; Gainey, 1987; Willmer, 1978; Gainey, 1994), *Mytilus californianus*, *Mytilus trossolus* (Neufeld, y Wright, 1996), *Acanthochitona discrepans* (Gilles, 1972), *Solen cylindraceus* (Villiers y Allanson, 1988), *Geukensia demissa* (Gainey, 1994), *Crassostrea virginica* (Tirad *et al.* 1997) y *Crassostrea gigas* (Hosoi *et al.* 2003) son osmoconformadores, ya que la presión osmótica de su hemolinfa se mantiene isotónica con el medio externo a pesar de las variaciones de la salinidad.

Sin embargo algunas especies de bivalvos de agua dulce (*Lampsilis claibornensis* y *Corbicula manilensis*) y salobre (*Rangia cuneata* y *Polymesoda caroliniana*) se comportan como osmoconformadores en ambientes con más de 100 mOsm/ kg. Pero, al someter a estas mismas especies en ambientes con presión osmótica menor a 100 mOsm/ kg, la concentración de iones Na^+ , Ca^{2+} , K^+ es mayor en la hemolinfa que en el medio externo, por lo que se podría decir que son osmorreguladores parciales, puesto que movilizan ciertos iones inorgánicos principalmente Ca^{2+} (Daeton, 1981).

Se ha descrito que la capacidad y rapidez de la regulación del volumen celular varía entre especies al someterlas a estrés hipo- e hiperosmótico (Gainey, 1987; Gainey, 1994). En el mejillón

Mitylus edulis sometido a estrés hipoosmótico la hemolinfa tarda aproximadamente 24 horas en alcanzar el punto isotónico con el medio; en contraste, este tiempo se reduce a tres horas cuando esta especie es sometida a estrés hiperosmótico (Gainey, 1987).

Por lo contrario, se ha observado que las células de los tejidos de *Crassostrea gigas* regulan el volumen celular en menor tiempo tras ser aclimatados al 100% de agua marina y luego ser transferidos a agua marina al 50% (estrés hipoosmótico), que cuando son aclimatados en agua marina al 50% y posteriormente transferidos a agua marina al 100% (hiperosmótico) (Hosoi *et al.* 2003).

3.2. Osmolitos orgánicos

La concentración de iones de Na^+ y Cl^- en la hemolinfa de algunos bivalvos osmoconformadores es directamente proporcional a la concentración de dichos iones en el medio externo. La variación en la concentración de estos iones es la principal causa de cambios en la presión osmótica de la hemolinfa durante el estrés osmótico (Gilles, 1972; Chandran, 2002).

Sin embargo, el citoplasma celular no soporta por tiempos prolongados cambios drásticos en la concentración de iones de Na^+ y Cl^- . Es por esto que durante el estrés osmótico prolongado muchos invertebrados (i.e. bivalvos), utilizan biomoléculas que funcionen como iones orgánicos reguladores del volumen celular (Sidney y Pierce, 1982).

Los aminoácidos libres son las biomoléculas más importantes para la regulación del volumen celular en bivalvos expuestos a estrés osmótico (Deaton *et al.* 1985; Matsushima *et al.* 1987; Matsushima y Hayashi, 1988; Hawkins y Hilbish. 1992). Se ha encontrado que la concentración de aminoácidos libres es distinta entre poblaciones de la misma especie, estando

directamente relacionada con los cambios en la presión osmótica del ambiente (Sansone *et al.* 1978; Kube *et al.* 2006).

La alanina y glicina son los principales aminoácidos involucrados en la regulación del volumen celular en *Mytilus edulis* (Deaton *et al.* 1985). Mientras que en el ostión *Crassostrea gigas* se ha descrito la importancia de la alanina, glicina, β -alanina, taurina, glutamato, aspartato y arginina (Hosoi *et al.* 2003; Hosoi *et al.* 2007).

Durante el estrés osmótico los aminoácidos libres son transportados en el plasma y a través de las células, lo que implica cierto gasto energético (Neufeld y Wright, 1996). Se ha descrito en *Crassostrea gigas* que el gen AB185408 codifica para una proteína transportadora de leucina, fenilalanina, treonina y valina; asimismo, se describió que la expresión de este gen es mayor durante el estrés hipo- que hiperosmótico (Toyohara *et al.* 2005b). Proteínas transportadoras de taurina también están involucradas en la respuesta fisiológica al estrés hipo e hiperosmótico en *Mytilus edulis* (Toyohara *et al.* 2005a) y *Crassostrea gigas* (Hosoi *et al.* 2007).

La proteólisis de proteínas disponibles en la glándula digestiva, músculo y manto son la fuente principal de aminoácidos libres durante el estrés hiperosmótico en algunas especies de bivalvos (Deaton, 1984; Deaton, 1987; Hawkins y Hilbish, 1992). En este mismo sentido se conoce que los cambios en la concentración de aminoácidos libres en tejidos de *Geukensia demissa* y *Mytilus edulis* durante estrés osmótico, están directamente relacionada con la actividad de enzimas proteolíticas (Deaton, 1987; Hawkins y Hilbish, 1992).

De igual manera se ha observado que en algunas especies de decápodos (*Cancer pagurus*, *Homarus gamarus*, *Carcinus maens*, *Chasmagnatus granulata*), la exposición a bajas salinidades

provoca una modificación negativa en la condición bioquímica, principalmente en las proteínas totales en tejidos (Torres *et al.* 2002).

3.3. Metabolitos del plasma

Las proteínas presentes en el plasma podrían cumplir una función importante en la modificación del pool de aminoácidos libres en respuesta al estrés osmótico. En este sentido se determinó que en los crustáceos *Litopenaeus vannamei* y *Litopenaeus stylirostris* la concentración de proteínas totales en plasma disminuye drásticamente en las primeras 24 horas de exposición a estrés hiperosmótico (50 ups) (Rodríguez, 1981).

Por otro lado, la hemocianina es la proteína más abundante en el plasma de los moluscos bivalvos, esta cumple la función de transportar el oxígeno en la hemolinfa hacia las células (Morse *et al.* 1986). Se ha demostrado que durante estrés hipoosmótico aumenta la síntesis de hemocianina en el cangrejo *Carcinus maenas*, se estipula que esta molécula está implicada en la respuesta fisiológica de esta especie ante estrés osmótico (Boone y Schoffeniels, 1979).

Se han discutido dos hipótesis sobre la participación de la hemocianina en el proceso de respuesta fisiológica al estrés osmótico: (1) exclusivamente como transportador de oxígeno en respuesta a una mayor demanda energética (Gilles, 1977) o (2) como una proteína fuente o receptora de aminoácidos libres (Boone y Schoffeniels, 1979).

Está demostrado que las necesidades energéticas derivadas de la osmorregulación se reflejan en la movilización de glucosa en el plasma de diversas especies de vertebrados (Barros *et al.* 2001; Hoseini y Hosseini. 2010; Jalali *et al.* 2010.). Algunas investigaciones han referido este mismo fenómeno en especies de crustáceos (Spargaren y Hafner, 1987; Nery y Santos, 1993.).

En el camarón *Crangon crangon* aclimatado a diferentes salinidades, se observa una acumulación de glucosa en tejidos, la cual es directamente proporcional a los cambios en la salinidad (Spargaren y Hafner, 1987). En el decápodo *Chasmagnathus granulata* los niveles de glucosa en plasma aumentan a través del tiempo en condiciones hipo- e hiperosmóticas (0 y 40 ups respectivamente) en la temporada de verano, encontrándose resultados opuestos durante el invierno (Nery y Santos, 1993).

En moluscos bivalvos el transporte de aminoácidos libres en respuesta a estrés osmótico (Neufeld y Wright, 1996; Toyohara *et al.* 2005a; Toyohara *et al.* 2005b; Hosoi *et al.* 2007.) puede representar un gasto energético importante, que pudiera reflejarse en los niveles de glucosa del plasma.

3.4. Estrés osmótico y respuesta inmune

La respuesta inmune en moluscos bivalvos involucra factores celulares y humorales, los cuales a su vez están íntimamente relacionados. Las células circulantes llamadas hemocitos tienen actividad fagocítica, capacidad oxidativa y en algunos casos pueden agruparse y encapsular partículas de gran tamaño (Roch, 1999). Se han caracterizado básicamente dos tipos de hemocitos en especies del género *Crassostrea*: hialinocitos y granulocitos (Cheng, 1996). En *C. virginica* se han descrito a los granulocitos como células de entre 10 y 20 μm de diámetro, las cuales presentan una gran cantidad de gránulos citoplasmáticos (Cheng, 1996). Mientras que los hialinocitos se caracterizan por ser células más pequeñas, de 8 μm de diámetro aproximadamente y sin gránulos citoplasmáticos (Cheng, 1996).

El incremento de la temperatura, ocasionado por el calentamiento global y cambio climático, puede incrementar los niveles de evaporación del agua de mar, reduciendo o incrementando en algunos lugares los patrones de lluvias, aumentando con ello la salinidad de los

océanos (Matozzo y Marin 2011). Se ha observado que la concentración de granulocitos de *Ruditapes philippinarum*, cambia de manera significativa con los cambios estacionales de salinidad (Flye-Saint-Marie *et al.* 2009). Asimismo, se ha demostrado que la modificación de la salinidad aumenta la susceptibilidad de los bivalvos a enfermedades infecciosas, incrementando con ello la concentración de granulocitos (Hauton *et al.* 2000). Asimismo, la mortalidad in vitro de los hemocitos del ostión *C. gigas* aumenta con la disminución de la salinidad (0 a 6.5 ups, Gagnaire *et al.* 2006). Mientras que en la almeja *R. philippinarum* (Reid *et al.* 2003) y en el mejillón *M. galloprovincialis* (Malagoli *et al.* 2007), el número de hemocitos circulantes incrementó con el aumento de la salinidad. En la almeja *Chamelea gallina* se determinó que el número total de hemocitos disminuye significativamente con el incremento de la salinidad, mientras que la fagocitosis disminuye en las almejas tras someterlas a estrés hipo- e hiperosmótico (Matozzo *et al.* 2007a). Por otro lado, se ha demostrado que la actividad de una de las principales enzimas encargadas de la degradación intracelular, la superóxido dismutasa (SOD), disminuye con el incremento de la salinidad en hemocitos de la almeja *Chamelea gallina* (Matozzo *et al.* 2007b).

En relación a la viabilidad de los hemocitos con los cambios de salinidad, se observó en el ostión *O. edulis* que el tiempo de retención de la tinción rojo neutro es mayor a alta salinidad (32 a 25 ups) que en baja (16 a 19 ups), demostrando una disminución de la estabilidad de las membranas de los hemocitos con la disminución de la salinidad (Hauton *et al.* 1998). Adicionalmente, se ha observado en el ostión *Crassostrea virginica* una disminución cuantitativa y no cualitativa de la síntesis de proteínas en hemocitos con el incremento de la salinidad; mientras que el decremento de la misma, disminuye la síntesis de proteínas cuantitativa y cualitativamente, afectando hasta en un 60% la viabilidad de los hemocitos (Tirad *et al.* 1997).

IV. Planteamiento del problema y justificación

4.1 Planteamiento del problema

Actualmente los productores de la región han manifestado un incremento en la susceptibilidad a la mortalidad del ostión *C. corteziensis*, la cual se asocia a los incrementos en la salinidad de estuarios y lagunas donde habita o se cultiva, probablemente ocasionada por el represamiento de los ríos en algunos de estos sitios. Por lo tanto, el presente proyecto se plantea la siguiente interrogante:

1. - ¿Cuáles son los efectos del estrés hipo- e hiperosmótico en la supervivencia y respuesta fisiológica del ostión *C. corteziensis*?

4.2 Justificación

El ostión *C. corteziensis* es uno de los recursos acuícolas más importantes de la región noroeste de México, el cual se cultiva intensamente en los estados de Sonora, Sinaloa y Nayarit. Los productores de esta región manifiestan un incremento en la susceptibilidad a la mortalidad de este ostión, la cual parece estar asociada a los cambios de la salinidad en los sitios donde habita o se cultiva. Por lo tanto, este proyecto evaluó el efecto del estrés hipo- e hiperosmótico en la supervivencia y fisiología del ostión *C. corteziensis*, el cual no ha sido determinado a pesar de su intenso cultivo y de los avances alcanzados en la investigación de esta especie.

V. Hipótesis

El estrés hipo- e hiperosmótico tienen efectos distintos en la supervivencia, presión osmótica, regulación del volumen celular, movilización de reservas energéticas (i.e. proteínas y glucosa) y algunos metabolitos orgánicos (i.e. aminoácidos).

VI. Objetivos

6.1. Objetivo general

Evaluar el efecto del estrés hipo- e hiperosmótico en la supervivencia y respuesta fisiológica del ostión *C. corteziensis*.

6.2. Objetivos Particulares

- Evaluar el efecto del estrés hipo- e hiperosmótico en la supervivencia del ostión *C. corteziensis*.
- Determinar el efecto del estrés hipo- e hiperosmótico en el ajuste de la presión osmótica de la hemolinfa del ostión *C. corteziensis*.
- Evaluar el efecto del estrés hipo- e hiperosmótico sobre el porcentaje de agua y concentración de proteínas en branquias, músculo y manto del ostión *C. corteziensis*.
- Determinar el efecto del estrés hipo- e hiperosmótico sobre la concentración de proteínas totales, hemocianina y glucosa en el plasma del ostión *C. corteziensis*.
- Evaluar el efecto del estrés hipo- e hiperosmótico sobre el conteo total, diferencial y viabilidad de hemocitos presentes en la hemolinfa del ostión *C. corteziensis*.

VII. Materiales y Métodos

7.1. Origen y muestreo de los ostiones

Doscientos especímenes adultos de la especie *C. corteziensis* con una talla entre 6.5 y 9.8 cm de largo y un ancho entre 5.1 y 6.6 cm, fueron obtenidos de Acuícola Ramaceli S.C. de R.L. de C.V. ubicada en Bahía de Ceuta, Culiacán, Sinaloa. Estos organismos pasaron por un periodo de aclimatación de tres semanas en un estanque con agua de mar filtrada a 35 ups, en el laboratorio de Ecofisiología de Organismos Acuáticos y Cultivos de Apoyo para la Acuicultura de la Facultad de Ciencias del Mar de la Universidad Autónoma de Sinaloa, Mazatlán, Sinaloa. Durante este periodo se les proporciono diariamente como alimento la microalga *Chaetoceros muelleri* al 5% del peso inicial de los ostiones, ambos en peso seco. Durante el periodo de aclimatación se realizaron recambios del 100 % del agua cada 24 horas.

7.1.1. Preparación de los ostiones

Tras la aclimatación, las valvas de los ostiones fueron despostilladas en la parte dorsal a un costado del músculo aductor con la ayuda de unas pinzas de corte, de tal manera que aunque cerraran sus valvas se mantuviera el contacto directo de los tejidos del ostión y el agua. Los ostiones fueron sometidos a 24 horas de ayuno, antes del experimento.

7.2. Diseño experimental

Se tomaron 180 ostiones despostillados y fueron distribuidos bajo un diseño completamente aleatorio en tres tratamientos de salinidad con tres repeticiones por tratamiento como se muestra en la tabla1. Se usaron taras de plástico provistas con un difusor de aire a manera de acuarios.

Tabla 1. Diseño experimental

Tratamiento	Salinidad	Réplicas		
		1	2	3
Hipoosmótico	10 ups	20 ostiones	20 ostiones	20 ostiones
Hiperosmótico	50 ups	20 ostiones	20 ostiones	20 ostiones
Control	35 ups	20 ostiones	20 ostiones	20 ostiones

Fueron muestreados 4 ostiones por tratamiento a la 1, 2, 3, 6, 12, 24 y 48 horas. De cada organismo se determinó la presión osmótica de la hemolinfa, porcentaje de agua en tejidos (branquias, manto y músculo), concentración de proteínas totales en branquias, músculo y manto, concentración de proteínas, glucosa y hemocianina en el plasma, concentración total, diferencial y viabilidad de hemocitos en la hemolinfa. A lo largo del experimento se determinó el porcentaje de supervivencia de los organismos en cada unidad experimental.

7.3. Obtención, separación y preservación de las muestras

De cada ostión muestreado se extrajo el máximo volumen posible de hemolinfa, pinchando el músculo aductor con la ayuda de una jeringa hipodérmica. La hemolinfa fue dividida en cinco sub muestras para determinar la presión osmótica, análisis bioquímicos (proteínas totales y glucosa en plasma), hemocianina en plasma, conteo total y diferencial hemocitos y viabilidad de hemocitos.

Las sub muestras usadas para el análisis bioquímico fueron preservadas a -80°C , para su posterior análisis; mientras que el resto de sub muestras se mantuvieron en hielo para ser analizadas dentro de las primeras 24 horas.

Cada organismo fue disectado con la ayuda de un equipo de disección, para obtener una muestra de manto, branquias y músculo. Cada muestra fue pesada en fresco dentro de un tubo eppendorf de peso conocido, para posteriormente ser almacenada a -80°C .

7.4. Presión osmótica en la hemolinfa

La presión osmótica en la hemolinfa fue determinada inmediatamente después de cada muestreo, usando un micro osmómetro de congelación (μ Omette 5004, Precision Systems Inc., E.U.A.).

7.5. Humedad

A cada sub muestra de tejido (branquias, manto y músculo) se tomó el peso húmedo con la ayuda de una balanza analítica (Denver Instruments, M-220D, E.U.A). Posteriormente estas muestras fueron liofilizadas (Labconco Free Zone 4.5, Kansas City, MO., E.U.A) por 24 horas, para registrar su peso seco. El porcentaje de humedad se calculó con la siguiente fórmula:

$$\text{Humedad (\%)} = \frac{S}{H} \times 100$$

Donde:

S= Peso seco

H= Peso húmedo

7.6. Proteínas totales en tejidos

Las proteínas totales en tejidos se cuantificaron con el método descrito por Bradford (1976). Los tejidos fueron liofilizados por 24 horas y pulverizados con la ayuda de un mortero. Posteriormente, cada tejido fue homogenizado con 1 ml de agua destilada. De cada homogenizado se tomaron 100 μ l y se hizo una dilución 1:10 con NaOH 0.1 N, la cual se dejó reposar por 2 horas. Transcurrido el tiempo, se tomaron 10 μ l y se le agregó 200 μ l de solución reactiva de Bradford (B-6919, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, E.U.A). Posteriormente las muestras se colocaron en una microplaca para determinar su absorbancia a 595 nm con la ayuda de un fotocolorímetro (Imark, Bio-Rad, U.S.A).

Para calcular la concentración de proteínas se realizó una curva estándar a partir de diluciones de albumina sérica bovina (A-2153, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, E.U.A) con las siguientes concentraciones: 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125 y 0.15625 mg × ml⁻¹.

7.7. Proteínas totales en plasma

Las proteínas totales en plasma se cuantificaron con el método descrito por Bradford (1976). Para obtener el plasma, cada muestra de hemolinfa fue centrifugada a 1300 × g por 10 min a 4 °C. Se realizó una dilución 1:5 de plasma con NaOH 0.1 N y se dejó reposar por 2 horas. Transcurrido el tiempo, se tomaron 10 µl y se le agregó 200 µl de solución reactiva de Bradford (B-6919, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, E.U.A). Posteriormente las muestras se colocaron en una microplaca para determinar su absorbancia a 595 nm con la ayuda de un fotocolorímetro (Imark, Bio-Rad, U.S.A).

Para calcular la concentración de proteínas se realizó una curva estándar a partir de diluciones de albumina sérica bovina (A-2153, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, E.U.A) con las siguientes concentraciones: 1, 0.5, 0.25, 0.125 y 0.0625 y 0.03125mg × ml⁻¹.

7.8. Concentración de hemocianina

La concentración de hemocianina se determinó a partir del plasma que se centrifugó de la hemolinfa a 1300 × g por 10 minutos a 4°C. Se hizo una dilución del plasma con NaCl al 3.5% en una proporción 1:10, posteriormente a partir de una muestra se determinó la absorbancia a 335 nm usando un espectrofotómetro (Jenway 7305, Reino Unido). Para calcular la concentración de hemocianina en función de la absorbancia se aplicó un coeficiente de extinción (E^{1%}) de 2.83 (Hagerman, 1986), usando la siguiente fórmula:

$$\text{Hemocianina} \left(\frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right) = \frac{A}{2.83} \times F$$

Donde:

A= absorbancia

F= factor de dilución del plasma

7.9. Concentración de glucosa en plasma

La concentración de glucosa fue determinada por el método (GOD-PAP, Randox, Reino Unido) usando un kit comercial. Fueron mezclados 20 μ l de plasma y 200 μ l de solución reactiva y se dejaron reaccionar por 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente estas muestras se colocaron en un fotolorímetro (Imark, Bio-Rad, U.S.A) para determinar su absorbancia a una longitud de onda de 490 nm.

Para determinar la concentración de glucosa en base a la absorbancia, se realizó una curva tipo a partir de la solución estándar del kit con 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.5625 y 0.17825 mg/dl de glucosa.

7.10. Conteo total y diferencial de hemocitos

El número total (THC) y diferencial de hemocitos (THD) presentes en la hemolinfa se determinó usando un hematocitómetro y un microscopio compuesto. Las sub poblaciones de granulocitos y hialinocitos fueron identificadas en base a lo descrito por Cheng, 1981.

7.11. Viabilidad de hemocitos

El porcentaje de viabilidad de los hemocitos se estimó agregando 5 μ l de azul de tripano por cada 100 μ l de muestra de hemolinfa. Posteriormente usando un hematocitometro y un microscopio óptico se contó el número de hemocitos totales y teñidos. Este compuesto solo

penetra las células que han perdido integridad de su membrana, coloreando la célula de color azul (Sun *et al.* 2006).

7.12. Análisis estadístico

Los resultados de cada variable de respuesta fueron procesados por un análisis de varianza bifactorial (ANOVA) utilizando como variables independientes tratamiento (10 ups, 35 ups y 50 ups) y tiempo de muestreo (1, 2, 3, 6, 12, 24 y 48 horas); y como variables dependientes la humedad en tejidos, presión osmótica en hemolinfa, proteínas en músculo, branquias y manto, variables metabólicas en plasma (proteínas, glucosa, hemocianina), concentración total y diferencial de hemocitos en hemolinfa. Las variables supervivencia y viabilidad de hemocitos fueron analizadas con la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis. Cuando se encontraron diferencias significativas se realizaron pruebas a posteriori de Tukey para establecer las diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los tratamientos y tiempos de muestreo. Los valores de porcentaje fueron transformados a arcoseno antes de realizar el ANOVA (Zar, 1999), aunque los resultados fueron posteriormente transformados a su valor original. Todos los análisis se realizaron con la ayuda del programa Statistica v. 9 (Statsoft, Tulsa, OK, E.U.A).

VIII. Resultados

8.1. Supervivencia

No se observaron diferencias significativas ($P = 0.953$) en la supervivencia de los ostiones sometidos durante 48 horas a estrés hipo- e hiperosmótico y salinidad control (Tabla 2).

Tabla 2. Supervivencia de los ostiones (%) sometidos a estrés hipo-, hiperosmótico y control (10, 50 y 35 ups respectivamente), durante 48 horas.

	Salinidad (ups)			<i>P</i>
	10	35	50	
Supervivencia (%)	93 ± 7	97 ± 3	97 ± 3	0.953

Los valores son media ± e.e y fueron analizados por la prueba no para métrica Kruskal- Wallis.

8.2. Presión osmótica

Se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$) en la presión osmótica de la hemolinfa de los ostiones sometidos a estrés hipo- e hiperosmótico a lo largo de 48 horas (Fig. 3A). En los ostiones sometidos a estrés hipoosmótico (10 ups) la hemolinfa alcanzó el punto isotónico con respecto al agua del medio a las 48 horas de exposición, con una presión osmótica promedio de 371 ± 3.53 mOsm/kg (Fig. 2A). La hemolinfa en ostiones sometidos a estrés hiperosmótico (50 ups) tardó seis horas de exposición en alcanzar el punto isotónico, con una presión osmótica promedio de 1364 ± 1.19 mOsm/kg (Fig. 3B).

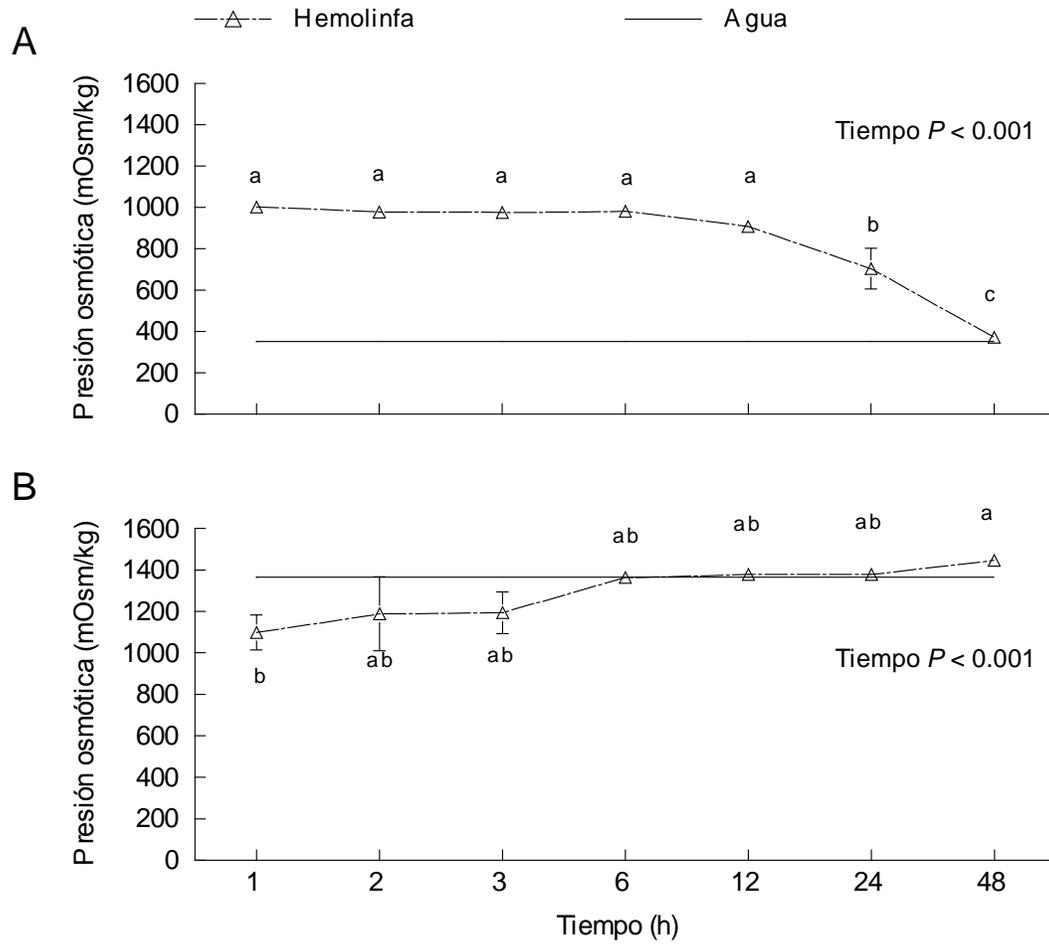


Figura 3. Presión osmótica (mOsm/kg) en la hemolinfa de ostiones sometidos a estrés hipoosmótico (A) e hiperosmótico (B) durante 48 horas. Los valores son medias \pm e.e y fueron analizados por ANOVA de una vía y una prueba a posteriori de comparación múltiples de Tukey para establecer las diferencias significativas. Las medias con letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$).

8.3. Humedad

Se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$) en el porcentaje de humedad del manto entre salinidades (10, 35 y 50 ups), tiempo de exposición (1, 2, 3, 6, 12, 24 y 48 h) e interacción entre salinidad y tiempo (Fig. 4A). En el estrés hipoosmótico (10 ups), la humedad del manto aumentó paulatinamente a lo largo de 48 horas de $74.3 \pm 2.6 \%$ a $80.9 \pm 3.1 \%$, siendo este último valor similar a la media ($79.1 \pm 1.4 \%$) encontrada para la salinidad control (35 ups). A las 2 horas de exposición a estrés hiperosmótico (50 ups), la humedad aumentó significativamente ($81.3 \pm 0.8\%$), para luego disminuir ($69.7 \pm 3.3 \%$ a $66.8 \pm 1.9 \%$) tras 12 horas de exposición, posteriormente aumentó a $73.5 \pm 3.0 \%$ a las 24 horas, alcanzando un valor similar al obtenido con los organismos del tratamiento control ($76.3 \pm 1.1 \%$).

El contenido de humedad en el músculo fue significativamente diferente ($P < 0.05$) entre salinidades (10, 35 y 50 ups), así como en la interacción entre salinidad y tiempo de exposición (Fig. 4B). En ostiones sometidos a estrés hipoosmótico (10 ups) la humedad del músculo aumentó paulatinamente de $76.7 \pm 0.8 \%$ a $85.0 \pm 0.8 \%$ después de 48 horas de exposición, siendo este valor estadísticamente mayor al encontrado en el control ($76.6 \pm 0.4 \%$). Después de 12 horas de exposición a estrés hiperosmótico (50 ups) la humedad en el músculo decreció del $77.3 \pm 1.1 \%$ a $73.1 \pm 0.6 \%$, para aumentar a $77 \pm 2.5 \%$ a las 48 horas de exposición.

Se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$) en la humedad de las branquias entre salinidades (10, 35 y 50 ups) y tiempo de exposición, mas no en la interacción entre salinidad y tiempo ($P = 0.917$) (Fig. 4C). En el estrés hipoosmótico (10 ups) la humedad osciló entre el $77.9 \pm 2.1 \%$ y $85.2 \pm 2.1 \%$, mientras que en el estrés hiperosmótico (50 ups) la humedad varió entre $77.7 \pm 1.2 \%$ y $80.8 \pm 1.6 \%$.

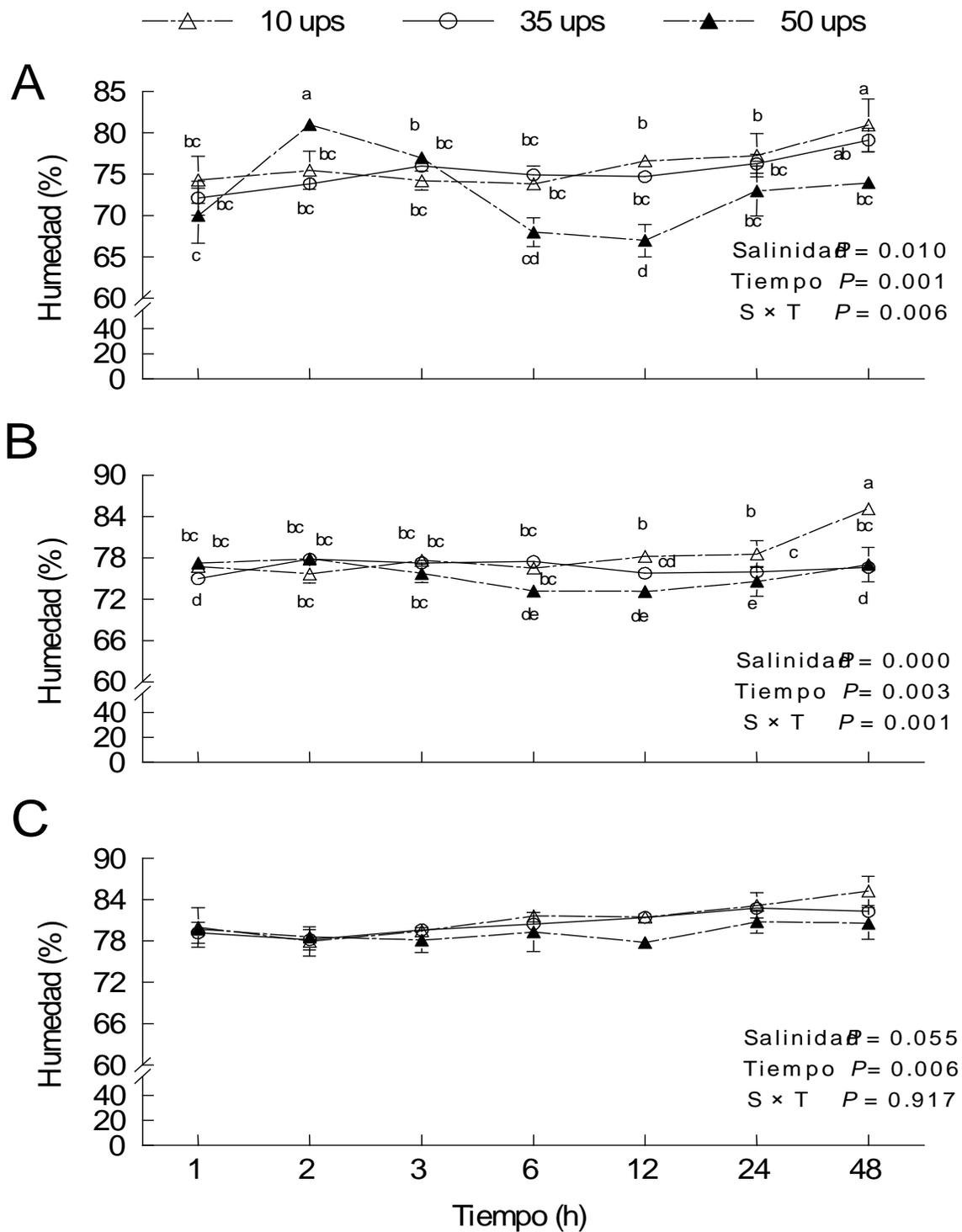


Figura 4. Humedad (%) en manto (A), músculo (B) y branquias (C) en ostiones sometidos a estrés hipo-, hiperosmótico y control (10, 50 y 35 ups respectivamente), durante 48 horas. Los valores son medias \pm e.e. Ver Tabla 2 para análisis estadístico.

8.4. Proteínas totales en tejidos

No se encontraron diferencias significativas en la concentración de proteínas totales en manto entre salinidades ($P = 0.892$), tiempo de exposición ($P = 0.367$) e interacción entre salinidad y tiempo ($P = 0.545$) (Fig. 5A). Sin embargo, en el estrés hipoosmótico (10 ups) la concentración de proteínas tendió a disminuir de 152.3 ± 15.2 a 115.0 ± 17.6 mg/g en las primeras 3 horas de exposición, mientras que entre las 6 y 48 horas se mantuvo entre 121.0 ± 28.0 y 82.2 ± 31.6 mg/g. En el estrés hiperosmótico (50 ups) se observó una tendencia similar, en la cual la concentración de proteínas disminuyó en las primeras 6 horas de 182.2 ± 43.3 a 92.7 ± 14.2 mg/g, para bajar hasta 69.2 ± 17.5 mg/g a las 48 horas.

La concentración de proteínas totales en músculo no presentó diferencias estadísticamente significativas entre salinidades ($P = 0.181$), tiempo de exposición ($P = 0.118$) e interacción entre salinidad y tiempo ($P = 0.177$) (fig. 5B). Aunque no hay diferencias significativas, en las primeras dos horas de exposición a estrés hipoosmótico (10 ups) la concentración de proteínas disminuyó de 201.6 ± 4.3 a 119.9 ± 19.6 mg/g, para después aumentar paulatinamente hasta los 178.2 ± 24.8 mg/g a las 48 horas. Mientras que en los ostiones expuestos a estrés hiperosmótico (50 ups) la concentración de proteínas totales disminuyó en las primeras tres horas de 205.8 ± 31.9 a 135 ± 15.8 mg/g, para después oscilar entre los 163.7 ± 6.3 y 255.1 ± 46.7 mg/g.

No se observaron diferencias significativas en la concentración de proteínas totales en las branquias en relación a la salinidad ($P = 0.833$), tiempo de exposición ($P = 0.142$) e interacción entre salinidad y tiempo ($P = 0.292$) (Fig. 5C). Independientemente de la salinidad y el tiempo de exposición, la concentración de proteínas totales osciló entre los 73.9 ± 8.0 y 136.5 ± 24.3 mg/g.

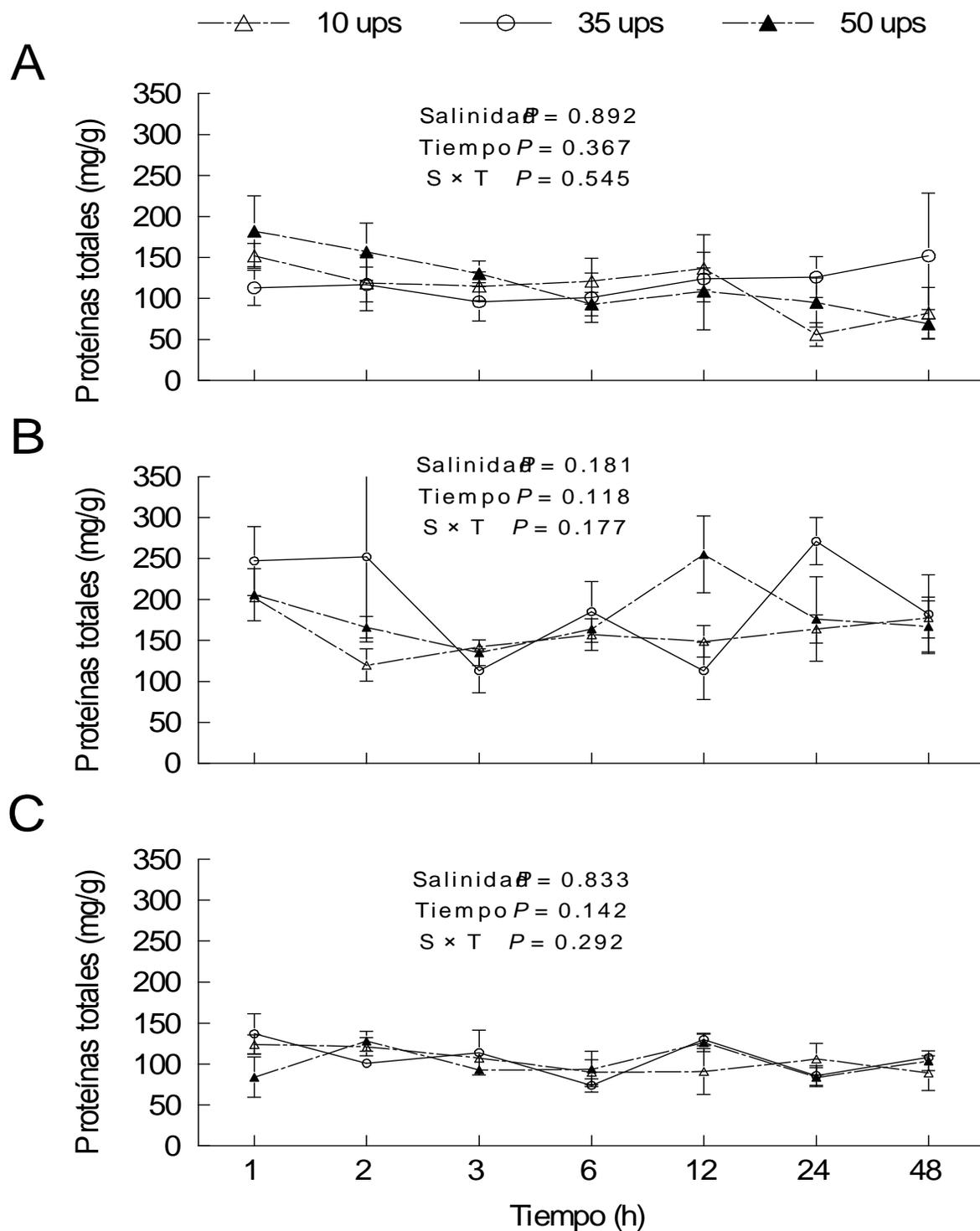


Figura 5. Proteínas totales (mg/g) en manto (A), músculo (B) y branquias (C) en ostiones sometidos a estrés hipo-, hiperosmótico y control (10, 50 y 35 ups respectivamente), durante 48 horas. Los valores son medias \pm e.e. Ver figura 3 para análisis estadístico.

8.5. Variables metabólicas del plasma

8.5.1. Proteínas totales

No se encontraron diferencias significativas en la concentración de proteínas totales en plasma entre salinidades ($P = 0.920$), tiempo de exposición ($P = 0.851$), ni en la interacción entre salinidad y tiempo ($P = 0.497$) (Tabla 3.). Independientemente de la salinidad y el tiempo de exposición, esta se encontró entre los 0.85 ± 0.10 y 0.57 ± 0.11 mg/ml.

8.5.2. Hemocianina

Se encontraron diferencias significativas en la concentración de hemocianina en plasma entre salinidades ($P = 0.001$), tiempo de exposición ($P = 0.000$) e interacción entre salinidad y tiempo ($P = 0.000$) (Fig. 6 y 7). Encontrándose la máxima concentración de hemocianina en la primera hora de exposición a la salinidad de 10 ups (1.26 ± 0.33 mg/ml); mientras que la concentración más baja se encontró en la salinidad de 50 ups a las tres horas de exposición (0.16 ± 0.04 mg/ml). Independientemente del tiempo de exposición la concentración promedio de hemocianina fue mayor en los organismos expuestos a estrés hipoosmótico (0.41 ± 0.07 mg/ml), seguidos del control (0.32 ± 0.04 mg/ml) y el tratamiento hiperosmótico (0.23 ± 0.02 mg/ml) (Fig. 7).

Tabla 3. Proteínas totales (mg/ml) en plasma de ostiones sometidos a estrés hipo-, hiperosmótico y control (10, 50 y 35 ups respectivamente).

Salinidad (ups)	Tiempo (horas)						
	1	2	3	6	12	24	48
10	0.57 ± 0.11	0.69 ± 0.11	0.64 ± 0.03	0.77 ± 0.06	0.63 ± 0.04	0.84 ± 0.13	0.77 ± 0.11
35	0.76 ± 0.10	0.62 ± 0.06	0.73 ± 0.07	0.64 ± 0.04	0.75 ± 0.02	0.71 ± 0.11	0.63 ± 0.02
50	0.85 ± 0.10	0.65 ± 0.08	0.67 ± 0.003	0.69 ± 0.05	0.69 ± 0.05	0.70 ± 0.12	0.72 ± 0.07

Los valores son medias \pm e.e, ver figura 2 para análisis estadísticos.

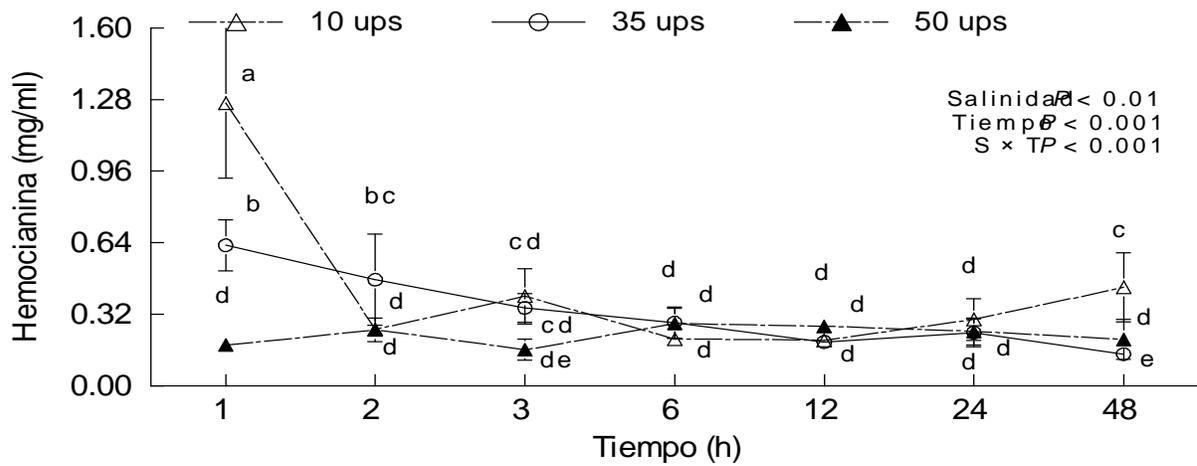


Figura 6. Concentración de hemocianina en plasma (mg/ml) de ostiones sometidos a estrés hipo- e hiperosmótico y control (10, 50 y 35 ups respectivamente), durante 48 horas. Los valores son medias \pm e.e. Ver figura 3 para análisis estadístico.

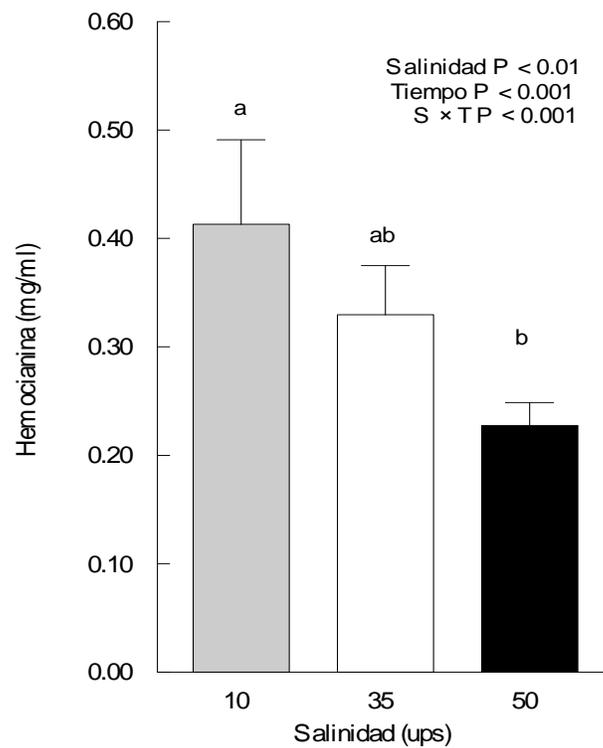


Figura 7. Concentración de Hemocianina en plasma (medias globales, mg/ml) de ostiones sometidos a estrés hipo- e hiperosmótico y control (10, 50 y 35 ups respectivamente), durante 48 horas. Los valores son medias \pm e.e. Ver figura 3 para análisis estadístico.

8.5.6. Glucosa

Se observaron diferencias significativas en la concentración de glucosa en plasma entre salinidades ($P = 0.016$), mas no en el tiempo de exposición ($P = 0.152$) ni en la interacción entre salinidad y tiempo ($P = 0.153$) (Fig. 8 y 9).

En el estrés hipoosmótico (10 ups) la concentración de glucosa aumentó ligeramente entre la primera y la segunda hora de exposición, de 1.19 ± 0.32 a 2.58 ± 0.74 mg/dl, para después disminuir y mantenerse relativamente constante en el tiempo, con concentraciones entre 1.71 y 1.18 mg/dl.

La concentración de glucosa aumentó paulatinamente de 1.52 ± 0.27 a 4.72 ± 0.80 mg/dl entre la segunda y la doceava hora de exposición a estrés hiperosmótico (50 ups), para después descender gradualmente hasta un valor de 1.85 ± 0.26 mg/dl a las 48 horas. La concentración de glucosa también varió en el control, aumentando gradualmente de 1.82 ± 0.21 a 3.168 ± 1.21 mg/dl entre la segunda y sexta hora, para posteriormente descender hasta un valor de 0.91 ± 0.17 mg/dl.

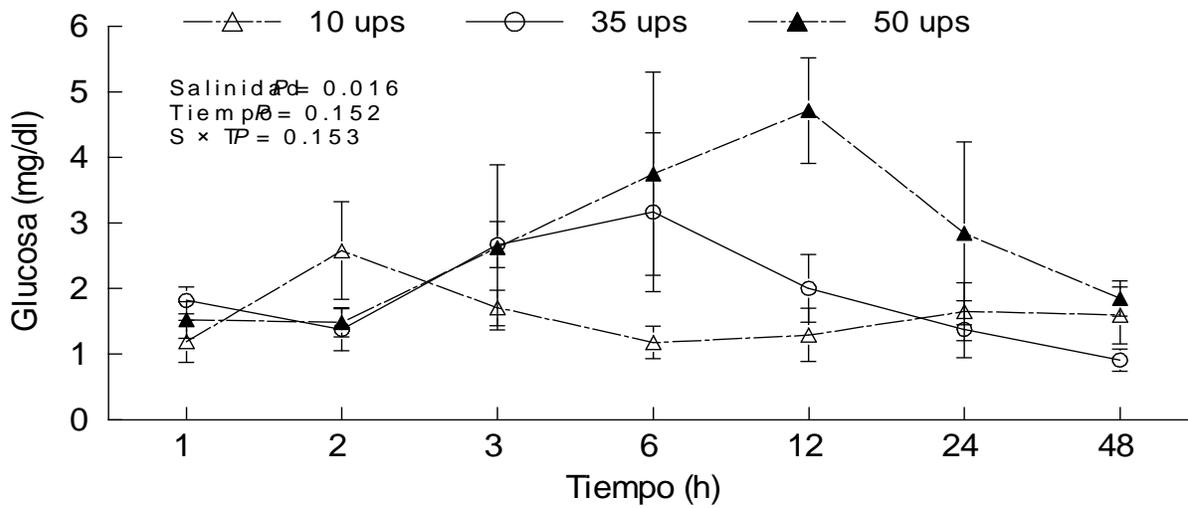


Figura 8. Concentración de glucosa en plasma (mg/dl) de ostiones sometidos a estrés hipo- e hiperosmótico y control (10, 50 y 35 ups respectivamente), durante 48 horas. Los valores son medias \pm e.e. Ver figura 3 para análisis estadístico.

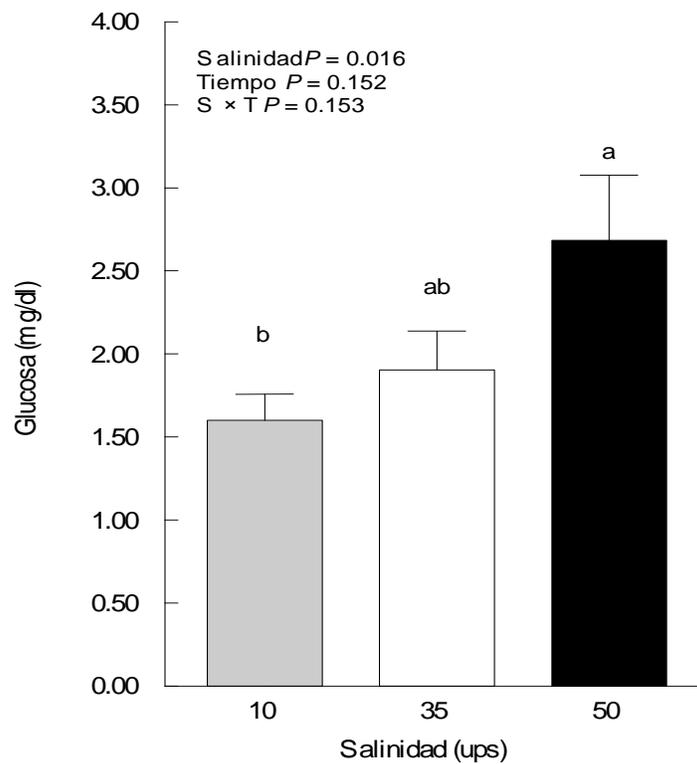


Figura 9. Concentración de glucosa en plasma (medias globales, mg/dl) de ostiones sometidos a estrés hipo- e hiperosmótico y control (10, 50 y 35 ups respectivamente), durante 48 horas. Los valores son medias \pm e.e. Ver figura 3 para análisis estadístico.

8.6. Variables inmunológicas

8.6.1. Número total y diferencial de hemocitos

Se encontraron diferencias significativas en la concentración total de hemocitos (THC) entre las diferentes salinidades ($P = 0.026$), mas no en el tiempo de exposición ($P = 0.468$) ni en la interacción entre salinidad y tiempo ($P = 0.401$) (Fig. 10A). Independientemente del tiempo la salinidad control presento el valor promedio más alto con $1.71 \times 10^6 \pm 0.17$ células/ml, mientras que en el estrés hiperosmótico se observó la concentración promedio más baja ($1.20 \times 10^6 \pm 0.10$ células/ ml).

La población de hialinocitos se comportó de forma muy similar a los hemocitos totales, donde se observaron diferencias significativas entre salinidades ($P = 0.031$), mas no en el tiempo de exposición ($P = 0.374$) ni en la interacción entre salinidad y tiempo ($P = 0.449$) (Fig. 10B). La concentración menor de hialinocitos se observó en ostiones sometidos a estrés hiperosmótico con un valor promedio de $1.07 \times 10^6 \pm 0.10$ células/ml, mientras que el tratamiento control presentó la concentración promedio más alta de $1.57 \times 10^6 \pm 0.16$ células/ ml.

Se observaron diferencias significativas en la concentración de granulocitos entre salinidades ($P = 0.040$), mas no en el tiempo de exposición ($P = 0.369$) ni en la interacción entre salinidad y tiempo ($P = 0.235$)(Fig. 10C). En ostiones sometidos a condiciones hipoosmóticas la población de granulocitos fue mayor que la observada en el estrés hiperosmótico y en el control, con un valor promedio de $142 \times 10^3 \pm 8.90$ células/ml. La menor concentración de granulocitos se observó en ostiones sometidos a estrés hiperosmótico con una media global de $112 \times 10^3 \pm 9.11$ células/ml.

8.6.2. Viabilidad de hemocitos

La mortalidad de hemocitos en el experimento se mantuvo entre 0.59 ± 0.12 y 0.43 ± 0.07 % (Tabla 4) sin encontrarse diferencias estadísticamente significativas entre las tres salinidades ($P = 0.7461$).

Tabla 4. Mortalidad de hemocitos (%) en ostiones sometidos a estrés hipo-, hiperosmótico y control (10, 50 y 35 ups respectivamente).

	Salinidad (ups)			<i>P</i>
	10	35	50	
Mortalidad (%)	0.50 ± 0.07	0.43 ± 0.07	0.59 ± 0.12	0.746

Los valores son medias \pm e.e. Ver Tabla 2 para análisis estadístico

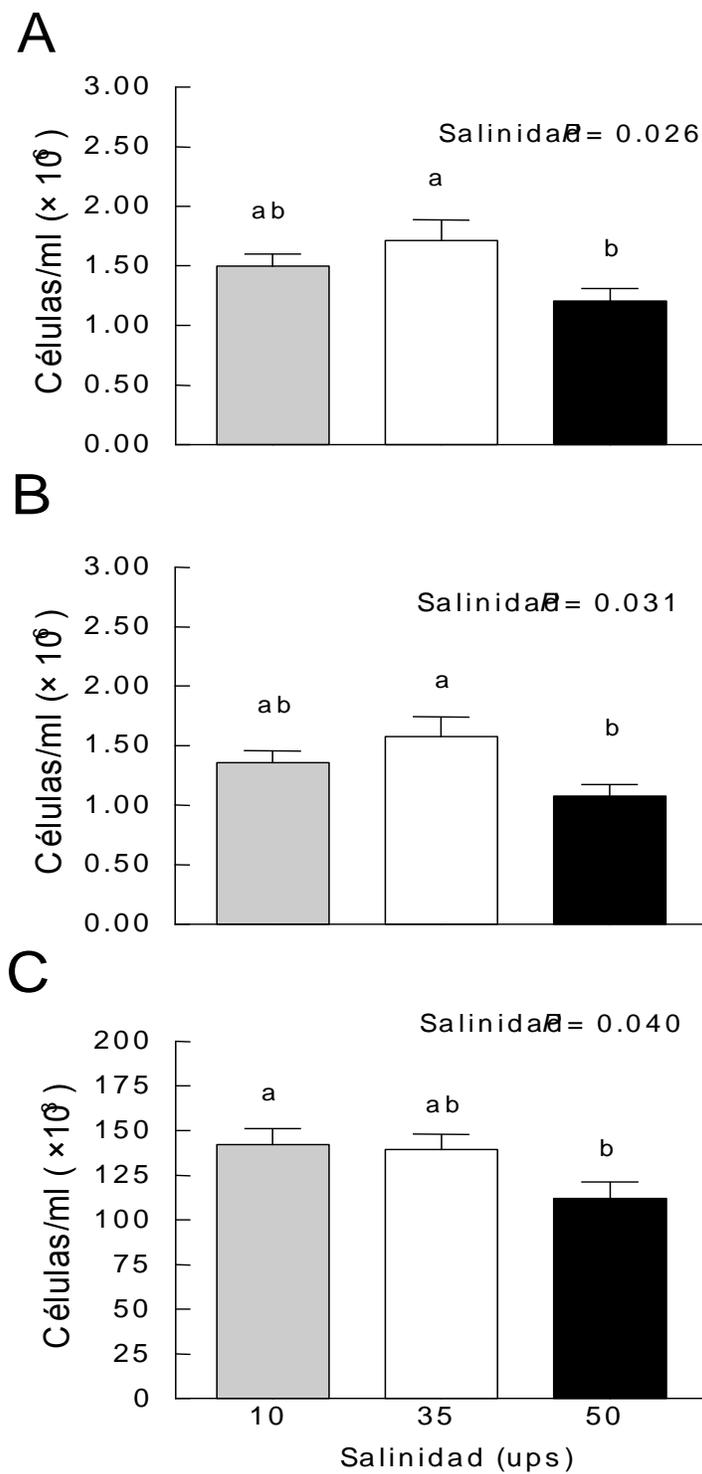


Figura 10. Hemocitos totales (células/ml) (A), Hialinocitos (B) y Granulocitos (C) de ostiones sometidos a estrés hipo- e hiperosmótico y control (10, 50 y 35 ups respectivamente), durante 48 horas. Los valores son medias \pm e.e. Ver figura 3 para análisis estadístico.

VIII. Discusión

La exposición del ostión *C. corteziensis* a condiciones hipo- e hiperosmóticas, afectó de manera significativa la presión osmótica, el contenido de humedad en tejidos, algunas variables metabólicas, así como inmunológicas.

El ajuste de la presión osmótica de la hemolinfa en relación a la salinidad a que fueron expuestos, demuestra que *C. corteziensis* es osmoconformador como la gran mayoría de los moluscos bivalvos (Shumway, 1977). La tasa de cambio en la presión osmótica de los ostiones sometidos a estrés hipoosmótico fue de 10 mOsm/hr durante las primeras 3 hrs, para luego disminuir un poco a las 6 hrs. e incrementarse paulatinamente a partir de las 12 hrs. y alcanzar una tasa máxima de 13 mOsm/hr a las 48 hrs. En contraste, la tasa de cambio de la presión osmótica de los ostiones sometidos a estrés hiperosmótico mostró un patrón inverso, incrementándose rápidamente (44 mOsm/hr) durante las primeras 6 hrs., para luego disminuir (7 mOsm/hr) a las 48 hrs. hasta alcanzar el punto isosmótico. Es importante resaltar que el punto isotónico fue alcanzado en menor tiempo en la salinidad de 50 ups (6 horas) que en la de 10 ups (48 horas). Una respuesta similar fue observada en el mejillón *Mitylus edulis*, el cual tardó 24 horas en alcanzar el punto isotónico al someterlo a estrés hipoosmótico, mientras que sólo tres horas a estrés hiperosmótico (Gainey, 1987). Por el contrario, en *C. gigas* el ajuste de la presión osmótica ocurre al mismo tiempo de manera independiente a las condiciones de estrés salino (hipo- e hiperosmótico) a las que son sometidos los ostiones (Hosoi *et al.* 2003).

Fisiológicamente, las diferencias entre los tiempos del ajuste de la presión osmótica pudieran explicarse al menos de dos maneras. La primera, pudiera estar relacionada con la capacidad en el ajuste de la permeabilidad de los tejidos tras someter a los organismos a estrés hipo- e hiperosmótico, puesto que se ha demostrado en bivalvos marinos osmoconformadores,

que durante las primeras horas del estrés osmótico se reduce la permeabilidad de los tejidos al agua y iones, disminuyendo la ganancia o pérdida de los mismos, permitiendo con ello un mayor tiempo para el ajuste de la presión osmótica (Deaton, 2009). La segunda posibilidad pudiera estar relacionada con el efecto del estrés osmótico en las tasas de filtración, puesto que se ha demostrado que las tasas de bombeo de las branquias y la actividad ciliar del epitelio branquial disminuyen en el ostión *C. virginica* y *C. gigas* sometidos a salinidades de 10 ups (Galtsoff, 1964) y por arriba de 56 ups (Hopkins, 1936), respectivamente.

Adicionalmente, la diferencia en la respuesta para alcanzar el punto isotónico entre el estrés hipo- e hiperosmótico pudiera también estar relacionado con el hábitat y la salinidad a la que regularmente son expuestos los organismos. En general, los moluscos bivalvos habitan en la zona costera intermareal, estuarios y lagunas, donde por lo regular la salinidad disminuye por los escurrimientos de los ríos y la estacionalidad de las lluvias. Y aunque el calentamiento global pudiera incrementar las tasas de evaporación del agua incrementando la salinidad de los océanos (Matozzo y Marin, 2011), es poco probable que se alcancen salinidades tan altas como las experimentadas en este trabajo. Por lo tanto, es de esperarse que los organismos reaccionen ajustando su presión osmótica más rápido con el incremento, que con la disminución de la salinidad (Fig. 3); esto para evitar la deshidratación de los tejidos, respectivamente.

El ajuste de la presión de osmótica, conllevó modificaciones en la humedad de los tejidos, encontrándose mayores variaciones en el manto y músculo que en las branquias (Fig. 4). Quizá esto se deba tanto a la función, así como a la extensión y ubicación de cada órgano, puesto que el manto es el órgano más grande en los bivalvos al recubrir por completo al animal; mientras que las branquias es el órgano de alimentación y respiración que se encuentra más expuesto al medio externo, por lo que se espera que sean muy rápidos los cambios; contrario a lo que sucede con el

músculo, que se encuentra más hacia la parte media de la masa visceral de los ostiones (Galtsoff, 1964).

Adicional a las diferencias que se observaron entre órganos, los ajustes del porcentaje de humedad fueron diferentes entre el estrés hipo- e hiperosmótico a lo largo del tiempo de exposición. Lo cual demuestra que los ajustes de la presión osmótica y humedad es diferencial entre tejidos y condición de estrés salino. Esto fue evidente en las variaciones del contenido de humedad del manto en el estrés hipoosmótico, las cuales incrementaron paulatina- y significativamente hasta las 48 horas de exposición; mientras que en el estrés hiperosmótico, las variaciones fueron más abruptas y rápidas, primero incrementándose a las 2 h, para disminuir significativamente a las 6 h y luego alcanzar valores similares a los iniciales tras 24 h de exposición. En el músculo se observan variaciones similares a las encontradas en el manto; mientras que en branquias fueron similares pero más sutiles (Fig. 4).

En contraste, en el ostión *C. gigas* la regulación del volumen celular fue más rápida en el estrés hipoosmótico, con una marcada hiper hidratación a las 8 horas de exposición y posterior recuperación entre las 24 y 72 horas; mientras que en el estrés hiperosmótico se observó deshidratación después de 8 horas, sin recuperación hídrica significativa al menos en las primeras 72 horas (Hosoi *et al.* 2003). Estos resultados difieren de los encontrados en el presente estudio, el cual demuestran que *C. corteziensis* tiene mayor capacidad que *C. gigas* para aclimatarse a los cambios bruscos de salinidad, particularmente en condiciones hiperosmóticas.

En diversas especies de moluscos bivalvos se ha reportado que la regulación del balance hídrico o volumen celular durante estrés osmótico crónico está directamente relacionado con la concentración de osmolitos orgánicos, principalmente aminoácidos libres (Deaton *et al.* 1985; Matsushima *et al.* 1987; Matsushima y Hayashi, 1988; Hawkins y Hilbish. 1992). Se ha observado

que con el incremento de la presión osmótica (estrés hiperosmótico), la concentración de aminoácidos libres aumenta en las células, para que el citoplasma tenga la misma presión osmótica que los fluidos extracelulares, manteniéndose con esto el volumen celular y un balance hídrico- iónico adecuado. Por el contrario, al disminuir la presión osmótica (estrés hipoosmótico), disminuye la concentración de aminoácidos libres intracelulares, los cuales son vertidos en la hemolinfa para su aprovechamiento probablemente como energía o en la síntesis de otras proteínas plasmáticas. El transporte de aminoácidos está regulado por la concentración de iones inorgánicos, principalmente Ca^{2+} ; así durante el influjo de calcio a través canales específicos en la membrana en conjunto con una proteína reguladora presente en la célula llamada calmodulina forman un complejo que activa una proteína quinasa (enzima) que a su vez provee de energía (fosforilación) a canales no selectivos de aminoácidos (Deaton, 2009) o proteínas transportadoras específicas de aminoácidos, como los que han sido descritos para la taurina en el ostión *C. gigas* al someterlo a estrés hipo- e hiperosmótico (Hosoi *et al.* 2007) y en el mejillón *Mytilus galloprovincialis*, tras someterlo a estrés hipoosmótico (Toyohara *et al.* 2005). Son pocos los aminoácidos (alanina, glicina, prolina, glutamato y taurina) que participan en el proceso de regulación iónica en bivalvos sometidos a estrés osmótico; sin embargo, la taurina es el principal, contabilizando el 80% del total de los osmolitos orgánicos que participan durante la regulación iónica en el ostión *C. gigas* (Hosoi *et al.* 2003).

La glucosa presente en el plasma es la fuente primaria de energía en la mayoría de los animales, es por esto que la variación en este parámetro puede ser tomada como un indicador de la demanda energética (Barros *et al.* 2001; Hoseini y Hosseini, 2010; Jalali *et al.* 2010). Dado que la regulación de aminoácidos es activa (transportadores), es probable que su regulación y el estrés osmótico en general haya sido mayor durante el estrés hiperosmótico que en el hipoosmótico, puesto que la concentración de glucosa en plasma fue mayor en el estrés hiperosmótico con

respecto al hipoosmótico (Fig. 9). En estudios previos con el crustáceo *Chasmagnathus granulata* se reportó que los niveles de glucosa en plasma aumentan a través del tiempo tanto en estrés hipo- como hiperosmótico (0 y 40 ups respectivamente) (Nery y Santos, 1993). En contraste, en el camarón *Crangon crangon* se encontraron resultados similares a los nuestros, ya que la concentración de glucosa se correlacionó positivamente con los cambios de salinidad (Spargaren y Hafner, 1987). Asimismo, aunque las diferencias en la concentración de glucosa en este trabajo pudieran estar ligadas al estrés osmótico, no se descarta la posibilidad de que estas se deban también al periodo de inanición en el que permanecieron los organismos durante el experimento.

Algunos autores han sugerido que a través de la síntesis e hidrólisis de proteínas en diversos órganos (p. ej. manto, músculo y glándula digestiva) de los moluscos bivalvos logran variar la concentración de aminoácidos libres en respuesta a los cambios de presión osmótica (Deaton, 1984; Deaton, 1987; Hawkins y Hilbish, 1992). En crustáceos decápodos (*Cancer pagurus*, *Homarus gamarus*, *Carcinus maens*, *Chasmagnathus granulata*) se ha observado la disminución de proteínas totales en tejidos tras la exposición a bajas salinidades (Torres *et al.* 2002). Sin embargo, en el presente estudio no se observaron diferencias significativas en la concentración de proteínas totales en tejidos (i.e. manto, músculo y branquias, Fig. 5) ni en plasma (Tabla 3) de los ostiones sometidos a estrés hipo- e hiperosmótico a lo largo de 48 h. Probablemente, al analizar las muestras pendientes de aminoácidos se pueda inferir el órgano o tejido de donde se utilizaron las proteínas para la regulación osmótica. La falta de un efecto directo sobre las proteínas totales en tejidos y plasma, quizá pueda deberse a las diferencias en la condición fisiológica de los ostiones utilizados en el experimento, así como a las condiciones de inanición a la que fueron sometidos por 24 h previo a los cambios de salinidad. Asimismo, como a la gran diversidad de proteínas que se encuentran en los tejidos y que eventualmente pueden mobilizarse en el plasma a través del sistema circulatorio de los ostiones.

La hemocianina es una proteína extracelular de gran tamaño que se encuentra en la hemolinfa de artrópodos y moluscos, la cual es responsable del transporte de oxígeno. En ambos filos, el sitio de fijación del oxígeno involucra un par de átomos de cobre, los cuales están en la forma Cu I cuando están desoxigenados, pero se transforman en Cu II cuando se une con átomos de oxígeno, otorgándole a la hemocianina el característico color azul-verdoso. Estudios más o menos recientes han demostrado que la hemocianina puede servir como fuente de péptidos antimicrobianos, además de que esta proteína puede activarse y transformarse en fenoloxidasas, enzima encargada de la melanización, mecanismo clave en el inicio de la respuesta inmune en invertebrados (Decker y Jaenicke, 2004).

La cantidad de hemocianina en el presente estudio fluctuó entre un 33 y un 40% de las proteínas totales contenidas en el plasma. La variación en la concentración de hemocianina no se debió a un efecto de dilución o concentración por cambios en el volumen extracelular de agua con el cambio de salinidad, puesto que se observó el efecto contrario; es decir, la concentración de hemocianina aumentó en el estrés hipoosmótico y disminuyó en el hiperosmótico, ambos en relación a los organismos sometidos a la salinidad control (Fig. 7). Este efecto fue particularmente notable durante la primera hora de exposición, para luego recuperarse en las siguientes horas (Fig.6). Se ha demostrado en crustáceos que el aumento de la afinidad de la hemocianina por el oxígeno está directamente relacionado con el incremento de la concentración de algunos iones como el Ca^{++} , Mg^{++} y Cl^- (Mangun, 1986; Bridges, 2001); por lo tanto, es probable que el aumento de la síntesis de hemocianina se deba a una disminución de la afinidad por el oxígeno durante el estrés hipoosmótico, tras la disminución de la salinidad, incluyendo los iones arriba mencionados. Adicionalmente, los aminoácidos libres que se hidrolizan a partir de las proteínas durante el estrés hipoosmótico, pudieran ser incorporados para la síntesis de hemocianina, incrementando su concentración; tal y como se ha descrito en el cangrejo *Carcinus means* sometido a estrés

hiposmótico (Boone y Schoffeniels, 1979). Por el contrario, la disminución de la hemocianina en el estrés hiperosmótico pudiera deberse a una hidrólisis de la misma a aminoácidos libres para incrementar la presión osmótica celular con el incremento de la presión osmótica del medio externo.

En trabajos previos se ha descrito que los cambios en la salinidad pueden tener efectos en las células circulantes o hemocitos en la hemolinfa. Así se ha descrito que la concentración de hemocitos en la almeja *R. philippinarum* está relacionada con los cambios estacionales de la salinidad (Flye-Saint-Marie *et al.* 2009). Mientras que esta afecta de manera indirecta la susceptibilidad de los bivalvos a enfermedades infecciosas, incrementando con ello el número de granulocitos (Hauton *et al.* 2000). Por otro lado, se ha demostrado en la almeja *R. philippinarum* (Reid *et al.* 2003) y en el mejillón *M. galloprovincialis* (Malagoli *et al.* 2007), que el número de hemocitos circulantes incrementó con el aumento de la salinidad. En contraste, en el presente trabajo, se observó que tanto el THC, como la concentración de hemocitos hialinos y granulares disminuyeron en el estrés hipo- e hiperosmótico, aunque sólo la concentración de granulares de manera significativa (Fig. 10). Esto concuerda con los resultados observados en la almeja *Chamelea gallina*, en la cual el número total de hemocitos disminuyó significativamente con el incremento de la salinidad (Matozzo *et al.* 2007a).

Por otro lado, se ha descrito que la variación de la salinidad tiene efectos negativos en la viabilidad de los hemocitos, incrementando su mortalidad con la disminución de la salinidad (0 a 6.5 ups) en un experimento in vitro en el ostión *C. gigas* (Gagnaire *et al.* 2006). En contraste, en el presente trabajo no se observó en efecto en los hemocitos de *C. corteziensis* en relación al estrés hipo- e hiperosmótico. Sin embargo, a pesar de esto, si tuvo en efecto en la concentración de

hemocitos, particularmente en el estrés hiperosmótico, lo cual podría aumentar la susceptibilidad a patógenos en esta especie de ostión durante el incremento de la salinidad.

IX. Conclusiones

- El ostión *Crassostrea corteziensis* es osmoconformador, puesto que su presión osmótica se ajustó a la del medio externo, aunque logró el punto isotónico más rápido en el estrés hiperosmótico que en el hipoosmótico. Esto puede ser atribuido a diferencias en la permeabilidad de sus tejidos, a adaptaciones fisiológicas (i.e. tasas de bombeo, movilidad de cilios branquiales, etc.) o ambientales (i.e. frecuencia e intensidad de los cambios en la salinidad).
- El ajuste del volumen celular(humedad) fue más evidente en el manto y músculo que en las branquias. Es probable en ésta última ocurra rápidamente al estar más expuestas que en los otros órganos y tejidos.
- No se pudo determinar a través de la concentración de proteínas totales, la movilización de aminoácidos de los tejidos para la regulación osmótica.
- La cantidad de hemocianina en el presente estudio fluctuó entre un 33 y un 40% de las proteínas totales contenidas en el plasma. El incremento de la concentración de hemocianina en el estrés hipoosmótico quizá se debió a una disminución de la afinidad por el oxígeno, así como una mayor síntesis de la misma al incorporar los aminoácidos movilizados durante la disminución de la presión osmótica celular. Por el contrario, la disminución de la hemocianina en el estrés hiperosmótico pudiera deberse a una hidrólisis de la misma a aminoácidos libres para incrementar la presión osmótica celular con el incremento de la presión osmótica del medio externo.

- Las variaciones en la concentración de glucosa en plasma sugieren que la regulación iónica e hídrica, y el estrés osmótico en general, fue mayor durante el estrés hiperosmótico que en el hipoosmótico.
- Los cambios de salinidad no afectaron la viabilidad de los hemocitos, pero sí su concentración total y diferencial (i.e. hialinos y granulares), particularmente en el estrés hiperosmótico. Esto podría aumentar la susceptibilidad a patógenos en esta especie de ostión.

XI. Literatura Citada

- Barros, L.F., Barnes, K., Ingram, J.C., Castro, J., Porrás O.H. y Baldwin, S.A. (2001). Hyperosmotic shock induces both activation and translocation of glucose transporters in mammalian cells. *Eur J Physiol.* 442, 614-621.
- Bentley, P. J. (2002). *Endocrines and osmoregulation, a comparative account in vertebrates*, second edition. Springer, Germany.
- Bishop, S. H., Greenwalt, D. E., Kapper, M. A., Paynter, K. T. y Ellis, L. L. (1994). Metabolic regulation of proline, glycine and alanine, accumulation as intracellular osmolytes in ribbed mussel gill tissue. *J. Exp. Zool.* 268, 151-16.
- Boone, W.E. y Schoffeniels, E. (1979). Hemocyanin synthesis during hypo-osmotic stress in the shore crab *Carcinus maenas* (L.). *Comp. Biochem. Physiol* 63 (2), 207-214.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-253.
- Cáceres-Puig, J. I., Abasolo-Pacheco, F., Mazón-Suástegui, J., Maeda-Martínez, A. N. y Saucedo, P. E. (2007). Effect of temperature on growth and survival of *Crassostrea corteziensis* spat during late-nursery culturing at the hatchery. *Aquaculture.* 272, 417-422.
- Castillo-Durán, A., Chávez-Villalba, J., Arreola-Lizárraga, A. y Barraza-Guardado, R. (2010). Comparative growth, condition, and survival of juvenile *Crassostrea gigas* and *C. corteziensis* oysters cultivated in summer and winter. *Ciencias Marinas* 36, 29-39.
- Charmantier G., Charmantier-Daures M. y Towle D. (2009). Osmotic and ionic regulation in aquatic arthropods. En: Evens H.D. (Ed.) *Osmotic and ionic regulation, cells and animals*. CRC Press, Taylor y Francis Group. 165-129.
- Chávez-Villalba, J., López-Tapia, M., Mazón-Suástegui, J. y Robles-Mungaray, M. (2005). Growth of the oyster *Crassostrea corteziensis* (Hertlein, 1951) in Sonora, Mexico. *Aquaculture. Res.* 36, 1337-1344.
- Cheng, T.C. (1996). Hemocytes: Forms and Functions. En: Kennedy, V.S.; Newell, R.I.E. y Eble, A.F. (Eds.). *The eastern Oyster: Crassostrea virginica*, Maryland Sea Grant College, Maryland, U.S.A., 19-73.
- Choe, K. y Strange K. (2009). Volume regulation and osmosensing in animal cells. En: Evens H.D. (Ed.) *Osmotic and ionic regulation, cells and animals*. CRC Press, Taylor y Francis Group, 37-67.
- CONAPESCA. (2010). Anuario estadístico de acuicultura y pesca. (En línea) <http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx/wb/cona/anuario2010>. (04/02/ 2012).

- Dawson, C. y LuiX. (2009). Osmoregulation: Some principles of water and transport. En: Evans H.D. (Ed.) Osmotic and ionic regulation, cells and animals. CRC Press, Taylor y Francis Group. 1 - 35.
- Deaton, L. E. (1987). Hyperosmotic cellular volume regulation in the ribbed mussel *Geukensiademissa*: Inhibition by lysosomal and proteinase inhibitors. *J. Exp. Zool.* 244, 375-382.
- Deaton, L. E. (2009). Osmotic and ionic regulation in molluscs. En: Evens H.D. (Ed.) Osmotic and ionic regulation, cells and animals. CRC Press, Taylor y Francis Group. 107-134
- Deaton, L. E., Hilbish, T. J. y Kehn, R. K. (1984). Protein as a source of amino nitrogen during hyperosmotic volume regulation in the mussel *Mytilusedulis*. *Physiol. Zool.* 57, 609-619.
- Deaton, L. E., Hilbish, T. J. y Koehn, R. K. (1985). Hyperosmotic volume regulation in the tissue of the mussel *Mytilusedulis*. *Comp. Biochem. Physiol.* 80A, 571-574.
- Deaton, L.E. (1981). Ion regulation in freshwater and brackish water bivalve mollusks. *Physiological Zoology* 54:109-121.
- Decker, H. y Jeanicke, E. (2004). Recent findings on phenoloxidase activity and antimicrobial activity of hemocyanins. *Developmental and Comparative Immunology* 28, 673-687.
- Dietz, T. H., Wilcox, S., Byrne, R. A., Lynn, J. W. y Silverman, H. (1996). Osmotic and Ionic Regulation of North American Zebra Mussels (*Dreissenapolyomorpha*). *Amer. Zool.* 36, 264-372.
- Dietz, T. H., Wilcox, S., Silverman, H. y Byrne, R. A. (1997). Effects of hyperosmotic challenge on the freshwater bivalve *Dreissenapolyomorpha*: importance of K⁺. *Can. J. Zool.* 75, 697-705.
- Dunn, C.W., Hejnal A., Matus D.Q., Pang K., Browne W.E., Smith S.A. (2008) Broad phylogenomic sampling improves resolution of the animal tree of life. *Nature*. 452, 745-749.
- FAO. (2010). Fisheries and Aquaculture Information and Statistics Service (En línea) http://www.fao.org/figis/servlet/SQServlet?file=/usr/local/tomcat/FI/5.5.23/figis/webapps/figis/temp/hqp_26819.xml&outtype=html. (08/03/2012).
- Flye-Saint-Marie, J., Soudant, P., Lambert, C., Le Goïc, N., Goncalvez, M., Travers, M-A., Paillard, C. y Jean, F. Variability of the hemocyte parameters of *Ruditapesphilippinarum* in the field during an annual cycle. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 377, 1-11.
- Gagnaire, B., 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 Immunol.* 20, 536-547.
- Gainey, L. F. (1987). The effect of osmotic hysteresis on volume regulation in *Mytilusedulis*. *Comp. Biochem. Physiol.* 87A, 151-156.
- Gainey, L. F. (1994). Volume regulation in three species of marine mussels. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 181, 201-211.

- Galtsoff, P.S. (1964). The American Oyster *Crassostrea virginica*. Fish. Bull. Fish. Wildlife Service 64: 456 p.
- Gilles, R. (1972). Osmoregulation in three molluscs: *Acanthochitonadiscrepans* (brown), *Glycymerisglycymeris* (L.) and *Mytilusedulis*(L.). *Biol.Bull.*142, 25-35.
- Gilles, R.(1977). Effects of osmotic stresses on the proteins concentration and pattern of *Eriocheirsinensis* blood.*Comp. Biochem. Physiol.* 56A, 109 114.
- Guzmán-Agüero, J. E., Nieves S. M., Hurtado M. A., Piña V. P. y Garza-Aguirre M. de C. 2013 Feeding physiology and scope for growth of the oyster *Crassostrea corteziensis* (Hertlein, 1951) acclimated to different conditions of temperature and salinity. *Aquacult.Int.*21, 283-297.
- Hauton, C. Hawkins, L.E. y Hutchinson, S. (2000). The effects of salinity on the interaction between a pathogen (*Listonellaan guillarum*) and components of a host (*Ostreaedulis*) immune system. *Comp. Biochem. Physiol.* 127B, 203-212.
- Hauton, C., Hawkins, L.E. y Hutchinson, S. (1998). The use of the neutral red retention assay to examine the effects of temperature and salinity on haemocytes of the European flat oyster *Ostreaedulis* (L). *Comp. Biochem. Physiol.* 119B, 619-623.
- Hawkins, A. J. S. y Hilbish, T. J. (1992). The costs of cell volume regulation: protein metabolism during hyperosmotic adjustment. *J. Mar. Biol. Assoc. UK.*72, 569-578.
- Hopkins, A.E. (1936). Adaptation of the feeding mechanism of the oyster (*Ostrea gigas*) to changes in salinity. Bureau of Fisheries, Bulletin No. 21, vol. 48, 345–364.
- Hoseini, S.M. y S.A. Hosseini.(2010). Effect of dietary L- tryptophan on osmotic stress tolerance in common carp, *Cyprinuscarpio*, Juveniles.*Fish. Physiol. Biochem.* 36, 1061-1067.
- Hosoi, M., Kubota, S., Toyohara, M., Toyohara, H. y Hayashi, I. (2003). Effect of salinity change on free amino acid content in Pacific oyster.*Fisheries Sci.*69, 395-600.
- Hosoi, M., Shinzato, C., Takagi, M., Hosoi-Tanabe, S., Sawada, H., Terasawa, E. y Toyohara, H. (2007). Taurine transporter from the giant Pacific oyster *Crassostrea gigas*: function and expression in response to hyper- and hypo-osmotic stress. *Fisheries Sci.*73, 385-394.
- Hurtado, M. A., Racotta I.S., Civera R., Ibarra L., Hernández-Rodríguez M. y Palacios E. (2007). Effect of hypo- and hypersaline conditions on osmolality and Na⁺/K⁺-ATPase activity in juvenile shrimp (*Litopenaeusvannamei*) fed low- and high-HUFA diets.*Comp. Biochem. Physiol.* 147A, 703-710.
- Hurtado, M. A., Ramírez, J. L., Rodríguez-Jaramillo, C., Tovar, D., Ibarra, A. M., Soudant, P. y Palacios, P. (2009a). Comparison of continuous and batch feeding systems on maturation, biochemical composition and immune variables of the oyster *Crassostrea corteziensis* (Hertlein 1951).*Aquac. Res.*40, 464-472.

- Jalali, M.A., Hosseini, S.A., y Imanpour, M.R.(2010). Physiological characteristics and stress resistance of great sturgeon (*Husohuso*) juveniles fed with vitamins C, E, and HUFA-enriched *Artemiaurmianana* nauplii. *Fish. Physiol. Biochem.* 36, 555-564.
- Keen, A.M. (1971). Sea shells of tropical west American marine mollusks from Baja 461 California to Peru. Stanford University, Stanford, 1064.
- Kube, S., Geber, A. y Jansen, J. M. (2006). Patterns of organic osmolytes in two marine bivalves, *Macomabalthica*, and *Mystiques spp.*, along their European distribution. *Mar. Biol.* 149, 1387-1396.
- Malagoli, D., Casarini, L., Sacchi, S. y Ottaviani, E. (2007). Stress and immune response in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Fish. Shellfish. Immunol.* 23, 171-177.
- Matozzo, V. y Marin M.G. (2011). Bivalve immune responses and climate changes: is there a relationship? *ISJ* 8, 70-77.
- Matozzo, V. y Marin, M. G. (2010). First evidence of gender-related differences in immune parameters of the clam *Ruditapes philippinarum* (Mollusca, Bivalvia). *Mar. Biol.* 157, 1181-1189.
- Matozzo, V., Monari, M., Foschi, J., Serrazanetti, G. P., Cattani, O. y Marin, M. G. (2007). Effects of salinity on the clam *Chameleagallina*. Part I: alterations in immune responses. *Mar. Biol.* 151, 1051-1058.
- Matsushima, O. (1988). Accumulation and conservation of free amino acids in isolated bivalve foot muscle exposed to hyperosmotic conditions. *Comp. Biochem. Physiol.* 90A, 349-353.
- Matsushima, O. y Hayashi, Y. S. (1988). Uptake and accumulation of amino acids in the brackish-water bivalve *Corbicula japonica* Prime during high salinity acclimation. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 123, 201-210.
- Matsushima, O., Katayama, H. y Yamada, K. (1987). The capacity for intracellular osmoregulation mediated by free amino acids in three bivalve molluscs. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 109, 93-99.
- Mazón-Suástegui, J., Parres-Haro, A., Ruíz-Ruíz, K. M., Rodríguez-Jaramillo, C. y Saucedo, P. E. (2009). Influence of hatchery diets on early grow-out of the Cortez oyster *Crassostrea corteziensis* in Sinaloa, Mexico. *Aquac. Res.* 40, 1908-1914.
- Mazón-Suástegui, J., Ruíz-Ruíz, K. M., Parres-Haro, A. y Saucedo, P. E. (2008). Combined effects of diet and stocking density on growth and biochemical composition of spat of the Cortez oyster *Crassostrea corteziensis* at the hatchery. *Aquaculture.* 284, 98-105.
- Monari, M., Serrazanetti, G. P., Foschi, J., Matozzo, V., Marin, M. G. y Cattani, O. (2007). Effects of salinity on the clam *Chameleagallina* haemocytes. Part II: Superoxide dismutase response. *Mar. Biol.* 151, 1059-1068.
- Neufeld, D. S. y Wright, S. (1996). Response of cell volume in *Mytilus* gill to acute salinity change. *J. Exp. Biol.* 199, 473-484.

- Neufeld, D. S. y Wright, S. (1996). Salinity change and cell volume: the response of tissues from the estuarine mussel *Geukensiademissa*. *J. Exp. Biol.* 199, 1619-1630.
- Paniagua, R., Nistal, M., Sesma, P., Álvarez-Uría, M., Fraile, B., Anadón, R. y José Sáez, F. (2002). *Citología e histología vegetal y animal*. McGraw-Hill Interamericana de España, S.A.U.
- Reid, H.I., Soudant, P., Lambert, C., Paillard, C. y Birkbeck, T.H. (2003). Salinity effects on immune parameters of *Ruditapes philippinarum* challenged with *Vibrio tapetis*. *Dis. Aquat. Org.* 56, 249-258.
- Roch, P. (1999) Defense mechanisms and disease prevention in farmed marine invertebrates. *Aquaculture*. 172, 125-145.
- Rodríguez, G.A. 1981. Osmoregulation and total serum protein of two species of penaeidean shrimps from the Pacific coast of Mexico. *Journal of Crustacean Biology*. 3, 392-400.
- Rodríguez-Jaramillo, C., Hurtado, M. A., Romero-Vivas, E., Ramírez, J. L., Manzo, M. y Palacios, E. (2008). Gonadal development and histochemistry of the tropical oyster, *Crassostrea corteziensis* (Hertlein, 1951) during an annual reproductive cycle. *J. Shellfish Res.* 27, 1129-1141.
- Sansone, G., Biondi, A. y Noviello, L. (1978). Free amino acids in fluids and tissues of *Mytilus galloprovincialis* in relation to the environment. Their behavior as an index of normality of metabolism. *Comp. Biochem. Physiol.* 61A, 133-139.
- Santos, E. A. y Nery L. E. M. (1987). Blood glucose regulation in an estuarine crab, *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851), exposed to different salinities. *Comp. Biochem. Physiol.* 87 A, 1033-1035.
- Shumway, S. E. (1977). Effect of salinity fluctuation on the osmotic pressure and Na^+ , Ca^{2+} and Mg^{2+} ion concentration in the hemolymph of bivalve molluscs. *Mar. Biol.* 41, 153-177.
- Sidney, K. y Pierce. (1982). Invertebrate cell volume control mechanisms: a coordinated use of intracellular amino acids and inorganic ions as osmotic solute. *Biol. Bull.*, 163 (3), 405-419.
- Somero, G.N. y Bowlus R.D. (1983). Osmolyte and metabolic end products of molluscs: the design of compatible solute systems. In: Hochachka PW (Ed). *Mollusca*. Academic Press, New York. 2, 77-100.
- Spaargaren D. H. y Hafner P. A. (1987). The effect of environmental osmotic conditions on blood and tissue glucose levels in the brown shrimp, *Crangon crangon* (L.). *Comp. Biochem. Physiol.* 87 A, 1045-1050.
- Stuardo J. y Martínez A. (1975) Relaciones entre algunos factores ecológicos y la biología de poblaciones de *Crassostrea corteziensis* Hertlein 1951, de San Blas, Nayarit, México. *An. Inst. Cienc. del Mar y Limno. Univ. Nac. Auto* 2, 1-51

- Sun J., Wu x. Zhang W. (2006). Morphological, structural and functional characteristics of the hemocytes of the oyster, *Crassostrea ariakensis*. *Journal of Shellfish Research*, 25(1), 55-64.
- Tirard, C. T., Grossfel, R. M., Levine, J. M. y Kennedy-Stoskopf, S. (1997). Effect of osmotic shock on protein synthesis of oyster hemocytes *In Vitro*. *Comp. Biochem. Physiol.* 116A, 43-49.
- Torres, G., Giménez, L. y Anger, K. (2002). Effects of reduced salinity on biochemical composition (lipid, protein) of zoea 1 decapod crustacean larvae. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 277, 43-60.
- Toyohara, H., Ikeda, M., Goto, C., Sawada, H., Hosoi, M., Takeuchi, K., Hyashi, I., Imamura, S., y Yamashita, M. (2005). Osmo-responsive expression of oyster amino acid transporter gene and analysis of the regulatory region involved. *Fisheries Sci.* 71, 465-470.
- Toyohara, H., Yoshida, M., Hosoi, M., y Hayashi, I. (2005). Expression of taurine transporter in response to hypo-osmotic stress in the mantle of Mediterranean blue mussel. *Fisheries Sci.* 71, 356-360.
- Willmer, P. G. (1978). Volume regulation and solute balance in the nervous tissue of an osmoconforming bivalve (*Mytilusedulis*). *J. Exp. Biol.* 77, 157-179.