



Immunotoxicidad y daño lisosomal en la ostra *Pinctada imbricata* (Röding) expuesta a lubricantes usados de motores de automóviles

Immunotoxicity and lysosomal damage on *Pinctada imbricata* (Röding) exposed to used automobile crankcase oils

Edgar Zapata-Vívenes^{1*}, Gabriela Sánchez^{2†}, Leida Marcano² y Mariannys Antón²

0000-0003-3720-5416

1. Departamento de Acuicultura, Pesca y Recursos Naturales Renovables, Facultad de Acuicultura y Ciencias del Mar, Universidad Técnica de Manabí, Ecuador. edgar.zapata@utm.edu.ec

2. Laboratorio de Bioquímica y Ecotoxicología, Departamento de Biología, Escuela de Ciencias, Núcleo de Sucre, Universidad de Oriente, Venezuela

* Autor de correspondencia / Corresponding author

RESUMEN

En este estudio se evaluaron los efectos que ocasiona la exposición a fracciones acuosas de lubricantes usados de motores de automóviles (Faluma) sobre parámetros hematológicos, sistema inmune, estabilidad de la membrana lisosomal de hemocitos y niveles peroxidación lipídica y lisozimas en la glándula digestiva de la ostra perla *Pinctada imbricata*. Las ostras fueron expuestas a 0, 1, 10 y 20 % v/v de Faluma durante diferentes períodos: 3, 5 y 7 días, en sistema estático de acuarios bajo condiciones controladas (oxigenación 6 mg/L; 25 ± 1 °C; pH 8.0 y 36 ‰). Durante el período temprano de exposición fue observado un aumento en el número total de hemocitos (NTH) de ostras expuestas a 10 % de Faluma. En ostras expuestas a 20 % al séptimo día se observó un descenso en los parámetros inmunohematológicos, asociados a una elevada desestabilización de la membrana lisosomal y contenido de malondialdehído (MDA). Las ostras mostraron respuestas celulares compensatorias a bajas concentraciones de Faluma, resultando mermaidas durante la exposición aguda. Se evidenciaron efectos inmunomodulatorios inducidos por la mezcla de compuestos xenobióticos contentivos en Faluma. Las respuestas moleculares e inmune-celulares estimadas en *P. imbricata* pueden suministrar información sobre los cambios en la fisiología normal de organismos que habitan ambientes impactados por mezclas complejas de xenobióticos.

PALABRAS CLAVE: hemocito, desestabilidad lisosomal, aceite, inmunología, estrés.

ABSTRACT

The effect of exposure to water-soluble fractions of used automobile crankcase oils (WSF-AUCO) on haematology parameters, immune system, stability of lysosomal membranes of hemocytes and lipid peroxidation in the digestive gland of the pearl oyster *Pinctada imbricata* was evaluated in this study. The oysters were exposed to 0, 1, 10 and 20 % v/v of WSF-AUCO during different periods: 3, 5 and 7 d, in static aquaria under controlled conditions (oxygenation 6 mg/L; 25 ± 1 °C; pH 8.0 and 36 ‰). During the early period (3d) of exposure, an increase in the total count of hemocytes (TCH) was observed to 10 % of WSF-AUCO. In oyster exposed to 20 % during 7 d significant decreases in immuno-hematological parameters associated with high lysosomal destabilization of hemocytes and malondialdehyde (MDA) concentration was observed. The oysters showed compensatory cellular responses to the WSF-AUCO low concentrations, but these decreased during acute exposure. Immuno-modulator effects were induced by complex mixtures of compounds of WSF-AUCO. The molecular and immune-cellular responses estimated in *P. imbricata* offer appropriate information on the change in the normal physiology of organisms that inhabit impacted environments by complex mixtures of xenobiotics.

KEYWORDS: hemocyte, lysosomal destabilization, oil, immunology, stress.

INTRODUCCIÓN

Los lubricantes usados de motores de automóviles contienen compuestos químicos potencialmente tóxicos al ambiente, dentro de los cuales se incluyen hidrocarburos aromáticos policíclicos, compuestos clorados, y metales pesados. Tales xenobióticos son producidos por combustión incompleta en el motor, desgaste y contaminación de sustancias provenientes de los combustibles (Olonisakin *et al.*, 2005; Cvengros *et al.*, 2017). Generalmente después de un recorrido a 5 000 a 8 000 km, los lubricantes de motores son removidos del cárter y posteriormente almacenados; sin embargo, una disposición final inadecuada puede resultar en la dispersión de los xenobióticos orgánicos e inorgánicos en los ecosistemas marinos-costeros, los cuales pueden ser fácilmente absorbidos e incorporados a la biota. Las alteraciones de las respuestas bioquímicas y celulares provocadas por fracciones hidrosolubles de lubricantes usados de motores de automóviles (Faluma) han sido evaluadas previamente en distintos organismos modelos: anélidos (Zapata-Vívenes *et al.*, 2018), bivalvos (Zapata-Vívenes *et al.*, 2022) y peces (Freitas *et al.*, 2020).

La toxicidad de la Faluma suele ser incrementada debido a la formación de especies reactivas del oxígeno (ERO) u otros radicales libres, que ocurre durante el metabolismo redox de sus xenobióticos a nivel celular (Zheng *et al.*, 2020). La sobreproducción de ERO puede perturbar la eficiencia antioxidante celular, lo cual ofrece un preámbulo para cambios oxidativos tales como peroxidación de lípidos, modificaciones en las propiedades estructurales de las membranas biológicas, alteración de su fluidez y reducción de la capacidad para mantener el balance iónico (He *et al.*, 2017; Basria *et al.*, 2019). Las alteraciones en las membranas biológicas pueden comprometer la estabilidad y funcionalidad de los lisosomas, lo cual puede conllevar a procesos degradativos y lisis celular (Trivedi *et al.*, 2020). Los lisosomas presentan un rol fundamental en la metabolización y almacenamiento de xenobióticos, y la desestabilización de sus membranas ha sido usada como un marcador de estrés celular (Aliko *et al.*, 2015; Parisi *et al.*, 2021).

Los biomarcadores que determinan estrés por polución comprenden una gama de respuestas moleculares y celulares, las cuales pueden ser moduladas de manera sensible a la presencia de contaminantes (Zannella *et al.*, 2017). A través del uso de biomarcadores en organismos representativos del medio, particularmente estimados en especies sésiles y filtradoras como los moluscos-bivalvos, se ha hecho factible el monitoreo del estado de salud de ecosistemas marinos-costeros

INTRODUCTION

Used automobile engine lubricants contain chemical compounds that are potentially toxic to the environment, including polycyclic aromatic hydrocarbons, chlorinated compounds, and heavy metals. Such xenobiotics are produced by incomplete combustion in the engine, wear and tear, and contamination by substances from the fuels (Olonisakin *et al.*, 2005; Cvengros *et al.*, 2017). Generally, after traveling 5 000 to 8 000 km, engine lubricants are removed from the sump and subsequently stored. However, improper disposal can result in the dispersion of organic and inorganic xenobiotics in marine-coastal ecosystems, which can be easily absorbed and incorporated into the biota. Alterations in biochemical and cellular responses caused by water-soluble fractions of used automobile engine lubricants (Wsfual) have been previously evaluated in various model organisms: annelids (Zapata-Vívenes *et al.*, 2018), bivalves (Zapata-Vívenes *et al.*, 2022), and fish (Freitas *et al.*, 2020).

Wsfual toxicity often increases due to the formation of reactive oxygen species (ROS) or other free radicals, which occur during the redox metabolism of their xenobiotics at the cellular level (Zheng *et al.*, 2020). The overproduction of ROS can disrupt cellular antioxidant efficiency, which constitutes a prelude to oxidative changes such as lipid peroxidation, alterations in the structural properties of biological membranes, the disruption of their fluidity, and the reduction of the capacity to maintain ionic balance (He *et al.*, 2017; Basria *et al.*, 2019). Changes in biological membranes may compromise the stability and functionality of lysosomes, which can lead to degradative processes and cell lysis (Trivedi *et al.*, 2020). Lysosomes play a fundamental role in the metabolism and storage of xenobiotics, and the destabilization of their membranes has been used as a marker of cellular stress (Aliko *et al.*, 2015; Parisi *et al.*, 2021).

Biomarkers that determine stress by pollution encompass a range of molecular and cellular responses, which can be sensitively modulated by the presence of contaminants (Zannella *et al.*, 2017). By using biomarkers in representative organisms of the environment, particularly estimated in sessile and filter-feeding species such as bivalve mollusks, it has become feasible to monitor the health status of marine-coastal ecosystems (Krishnakumar *et al.*, 2018). Particularly, immunological biomarkers have been frequently used to estimate the effects of environments impacted by xenobiotic mixtures, and, in bivalves, they offer

(Krishnakumar *et al.*, 2018). En particular, los biomarcadores inmunológicos han sido frecuentemente utilizados para estimar los efectos de ambientes impactados por mezclas xenobióticas, y en los bivalvos ofrecen aspectos de interés para su aplicación en estudios de ecotoxicológicos (Balbi *et al.*, 2021). La capacidad inmunitaria en bivalvo está mediada por hemocitos y sustancias bacteriolíticas que constituyen mecanismos de defensa de primera línea eficaces contra microorganismos invasores (Zannella *et al.* 2017), y han sido usadas como señales de alerta para poder identificar áreas impactadas por polución (Renault *et al.* 2015).

Pinctada imbricata (Röding) es una ostra perlífera de abundancia relativa y amplia distribución en el océano Atlántico. Se encuentra formando densos bancos en el mar Caribe, particularmente en Colombia y Venezuela, desarrollándose en aguas poco profundas en general en zonas arrecifales y praderas de *Thalassia testudinum* (Vásquez *et al.*, 2015). Esta especie tiene importancia económica dual, ya que su carne es aprovechada como fuente proteínica y adicionalmente su concha es usada por su producción de nácar. El potencial uso de *P. imbricata* en la maricultura ha sido conocido (Lodeiros *et al.*, 2016; Romero-Ferreira *et al.*, 2017), y adicionalmente, ha sido propuesta como modelo biológico en pruebas ecotoxicológicas (Nuseti *et al.*, 2004; Villegas *et al.*, 2015). En tal sentido, esta investigación evaluó los efectos de concentraciones subletales de Faluma, a corto plazo, sobre las respuestas inmune-innatas (celular y humoral) y la estabilidad de las membranas lisosomales en hemocitos del bivalvo *P. imbricata*. Paralelamente, en la glándula digestiva fueron determinados los niveles de malondialdehído y actividad de lisozimas como marcadores de daño oxidativo y defensa humoral, respectivamente. Las concentraciones seleccionadas en el bioensayo de exposición representan posibles escenarios de contaminación por derrame de Faluma en ecosistema marino-costeros.

MATERIALES Y MÉTODOS

Organismos. Ejemplares adultos de la ostra perla *P. imbricata*, sin distinción de sexo, con longitud anteroposterior de 50-60 mm, fueron colectados de manera manual por buceo libre en áreas arrecifales localizadas en la región sur del golfo de Cariaco (10° 26'56" N, 64° 02'00" W), Venezuela, durante la temporada de surgencia costera. Las ostras fueron transportadas en envases isotérmicos hasta el laboratorio, para luego ser mantenidas en acuarios de 40 L de capacidad, con agua de mar filtrada (10 µm) a una temperatura 25 ± 1 °C, salinidad

interesting aspects for application in ecotoxicological studies (Balbi *et al.*, 2021). The immune capacity of bivalves is mediated by hemocytes and bacteriolytic substances that constitute effective first-line defense mechanisms against invasive microorganisms (Zannella *et al.* 2017) and have been used as warning signals to identify areas impacted by pollution (Renault *et al.* 2015).

Pinctada imbricata (Röding 1758) is a pearl oyster with relative abundance and broad distribution in the Atlantic Ocean. It has been found to form dense beds in the Caribbean Sea, particularly in Colombia and Venezuela, and generally develops in shallow waters in reef areas and *Thalassia testudinum* seagrass beds (Vásquez *et al.*, 2015). This species holds dual economic importance, as its meat is utilized as a protein source and its shell is valued for nacre production. The potential use of *P. imbricata* in mariculture has been recognized (Lodeiros *et al.*, 2016; Romero-Ferreira *et al.*, 2017), and it has been proposed as a biological model in ecotoxicological tests (Nuseti *et al.*, 2004; Villegas *et al.*, 2015). In this vein, this research evaluated the short-term effects of sublethal concentrations of Wsfual on the immune-innate responses (cellular and humoral) and the stability of lysosomal membranes in hemocytes of the bivalve *P. imbricata*. Concurrently, in the digestive gland, the levels of malondialdehyde and lysozyme activity were determined as markers of oxidative damage and humoral defense, respectively. The concentrations selected for the exposure bioassay represent possible contamination scenarios caused by Wsfual spills in marine-coastal ecosystems.

MATERIALS AND METHODS

Organisms. Adult specimens of the pearl oyster *P. imbricata*, without sex distinction and an anteroposterior length of 50-60 mm, were manually collected by free diving in reef areas located in the southern region of the Cariaco Gulf (10°26'56" N, 64°02'00" W), Venezuela, during the coastal upwelling season. The oysters were transported in isothermal containers to the laboratory and then maintained in 40 L capacity aquariums with filtered seawater (10 µm) at a temperature of 25 ± 1° C, a salinity of 36, and a pH of 7.8 ± 0.2. They were oxygenated (6.2 mg/L) for one week as an acclimatization period. These physicochemical variables were similar to those found in their environment at the time of collection. The oysters were fed daily *ad libitum* with an isomix of the cultured microalgae (*Chaetoceros araya* and *Tetraselmis chuii*).

36; pH 7.8 ± 0.2 ; y oxigenación de 6.2 mg/L durante una semana como período de aclimatamiento. Estas variables fisicoquímicas fueron similares a las encontradas en su ambiente para el momento de la colecta. Las ostras fueron alimentadas diariamente *ad libitum* con una isomezcla de microalgas cultivadas (*Chaetoceros araya* y *Tetraselmis chunii*).

Fracción acuosa de lubricantes. La fuente de contaminantes consistió una mezcla de lubricantes usados de motores de vehículos obtenidos en una estación de servicio local (gasolinera) y agua de mar filtrada (45 μm), en una relación 1:9 v/v. La mezcla se mantuvo bajo agitación constante durante un período de 24 h, a temperatura ambiente, con una hora de reposo. Para eliminar los remanentes de la fracción no solubles, la mezcla fue separada por sifoneo y posteriormente filtrada bajo un sistema de vacío a través de un papel Whatman # 1. La Faluma colectada fue usada como solución stock (100 % v/v) para realizar las diluciones (Zapata-Vivenes *et al.*, 2020).

Bioensayos de exposición. Veinte organismos por acuario (por triplicado) fueron expuestos a concentraciones ascendentes de 1, 10 y 20 % v/v de la Faluma durante diversos períodos: 3, 5 y 7 días. Las concentraciones subletales fueron seleccionadas partiendo de una concentración letal media estimada previamente ($LC_{50} = 83.10\%$; 96 h). Un grupo de organismos, que sirvió como control, fueron colocados en solo en agua de mar sin contacto con contaminantes. La calidad y parámetros fisicoquímicos del agua de mar fueron mantenidas de manera similar al período de aclimatamiento. Tres cuartas partes del agua de mar fueron cambiadas diariamente, con la finalidad de mantener disponible las concentraciones de la mezcla de contaminantes, remover las pseudoheces y productos de excreción de los organismos. Para determinar los parámetros citológicos e inmunológicos después de cada período de exposición, se le extrajo la hemolinfa a cada ostra. Adicionalmente, la glándula digestiva fue disecada para cuantificar la actividad de lisozima, niveles de lípidos peroxidados y proteínas totales.

Extracción de hemolinfa. Haciendo uso de una jeringa hipodérmica de 1 mL de capacidad, precargada con 0.2 mL de agua de mar-EDTA al 0.01 mmol/L, se procedió a realizar una punción directa sobre seno venoso, localizado cercano a la porción fásica del músculo abductor, ayudado por una separación mecánica de las valvas. Entre 0.5 a 1 mL de hemolinfa fue extraída por cada ejemplar. La hemolinfa fue vertida en tubos de microcentrífuga colocados en hielo (4 °C). La muestra fue lavada y resuspendida en 1 mL de agua de mar filtrada-EDTA 0.01 mmol/L a pH 7.8. Finalmente fue conservada a 8 °C para su posterior análisis.

Water-soluble fraction of lubricants. The source of contaminants consisted of a mix of used vehicle engine lubricants obtained from a local service station (gas station) and filtered seawater (45 μm), at a 1:9 v/v ratio. The mix was kept under constant agitation for a period of 24 hours at room temperature, with one hour of settling time. To eliminate the remnants of the non-soluble fraction, the mixture was separated by siphoning and subsequently filtered under a vacuum system through a Whatman #1 paper. The collected Wsfual was used as a stock solution (100 % v/v) to perform dilutions (Zapata-Vivenes *et al.*, 2020).

Exposure bioassays. 20 organisms per aquarium (in triplicate) were exposed to ascending concentrations of 1, 10, and 20 % v/v of Wsfual for various periods: 3, 5, and 7 days. The sublethal concentrations were selected based on a previously estimated median lethal concentration ($LC_{50} = 83.10\%$; 96 h). A group of organisms, which served as a control, were placed alone in seawater and without contact with contaminants. The quality and physicochemical parameters of the seawater were maintained similarly to the acclimation period. Three quarters of the seawater were changed daily, in order to maintain the available concentrations of the contaminant mix and remove pseudo-feces and excretion products from the organisms. To measure the cytological and immunological parameters after each exposure period, hemolymph was extracted from each oyster. Additionally, the digestive gland was dissected to quantify lysozyme activity and the levels of peroxidized lipids and total proteins.

Hemolymph extraction. Using a 1 mL capacity hypodermic syringe preloaded with 0.2 mL of seawater-EDTA at 0.01 mmol/L, a direct puncture was made into the venous sinus located near the phasic portion of the adductor muscle, aided by a mechanical separation of the valves. 0.5-1 mL of hemolymph was extracted from each specimen. The hemolymph was poured into microcentrifuge tubes placed on ice (4 °C). The sample was washed and resuspended in 1 mL of filtered seawater-EDTA 0.01 mmol/L at pH 7.8. Finally, it was preserved at 8 °C for subsequent analysis.

Cell viability and total hemocyte count. A mixture of 20 μL of the final hemocyte suspension was combined with an equal volume of 0.4 % trypan blue solution (Sigma) (Strober, 2015). Cell viability and the total number of hemocytes (TNH) per mL were determined via light microscopy in a Neubauer chamber at a magnification of 400X. The THC per mL was

Viabilidad celular y conteo total de hemocitos.

Se mezclaron 20 μL de la suspensión final de hemocitos con un volumen igual de azul tripano (Sigma) al 0.4 % (Strober, 2015). La determinación de viabilidad celular y el número total de hemocitos (NTH) por mL fue realizada en una cámara de Neubauer a una magnificación de 400X por microscopía de luz. El THC por mL se determinó con la media de 4 cuadrantes (X) de la cámara y se calculó según la siguiente fórmula: $\text{THC/mL} = (X/4) \times \text{factor de dilución} \times 10\,000$ (Zapata-Vívenes *et al.*, 2022).

Fagocitosis. Una muestra de hemolinfa ajustada a una concentración de 2×10^6 células/mL fue utilizada en presencia de la levadura *Sacharomyces cereviceaea* (3 mg/mL) inactivada por calor como fuente de antígeno. En un tubo de microcentrífuga se añadió 100 μL de la suspensión de hemocitos, con un volumen igual de levaduras, centrifugándose a $1\,000 \times g$ por 5 min. Las muestras se incubaron por un período de 24 h a 8°C . Al precipitado celular se le añadió 100 μL de azul tripano al 0.4 % y se resuspendió con una pipeta Pasteur. Finalmente se colocaron 10 μL en una cámara de Neubauer para su conteo en un microscopio de luz, a una magnificación de 400X. Se contaron 100-200 células viables por cada muestra, considerándose fagocitos a los hemocitos que contenían al menos una levadura visible en su citoplasma (Nuseti *et al.* 2004). Este proceso se repitió al menos tres veces.

Estabilidad de la membrana lisosomal. La estabilidad de la membrana se parametrizó mediante conteo de células dañadas (Lowe *et al.*, 1992). Se añadieron 40 μL de solución stock de rojo neutro (4 mg/mL disuelto en dimetil sulfóxido) en un mismo volumen de hemolinfa. Se mezcló e incubó en una cámara húmeda y oscura por 15 min. Porcentaje de hemocitos con desestabilización de la membrana lisosomal (DML; %) fue estimado durante 240 min (Méthé *et al.*, 2017).

Lisozima. El protocolo empleado para evaluar la actividad de lisozima en la glándula digestiva de *P. imbricata* estuvo basado en la lisis de la pared celular de *Micrococcus lysodeikticus*, empleando lisoplasmas de agarosa. Los diámetros de los halos de inhibición de la lisis fueron comparados con el estándar de lisozimas de clara de huevo (HEL), utilizando un análisis de regresión lineal (Goven y Kennedy, 1996).

Peroxidación de lípidos y proteínas totales. El nivel de malondialdehído (MDA) en la glándula digestiva fue determinado espectrofotométricamente a 535 nm por el revelado a través del ácido tiobarbitúrico, usando a

determinado usando el promedio de cuatro cuadrantes (X) de la cámara y se calculó usando la siguiente fórmula: $\text{THC/mL} = (X/4) \times \text{dilution factor} \times 10,000$ (Zapata-Vívenes *et al.*, 2022).

Phagocytosis. A hemolymph sample adjusted to a concentration of 2×10^6 cells/mL was used in the presence of heat-inactivated *Sacharomyces cereviceaea* yeast (3 mg/mL) as an antigen source. In a microcentrifuge tube, 100 μL of the hemocyte suspension were added, along with an equal volume of yeast, and centrifuged at $1\,000 \times g$ for 5 min. The samples were incubated for a period of 24 h at 8°C . To the cell precipitate, 100 μL of 0.4 % trypan blue were added and resuspended with a Pasteur pipette. Finally, 10 μL were placed in a Neubauer chamber for counting under a light microscope at a magnification of 400X. A total of 100-200 viable cells were counted for each sample, and hemocytes containing at least one visible yeast in their cytoplasm were considered to be phagocytes (Nuseti *et al.* 2004). This process was repeated at least three times.

Lysosomal membrane stability. Lysosomal membrane stability was parameterized by counting damaged cells (Lowe *et al.*, 1992). A total of 40 μL of neutral red stock solution (4 mg/mL dissolved in dimethyl sulfoxide) were added to an equal volume of hemolymph. Mixing and incubation were performed in a moist and dark chamber for 15 min. The percentage of hemocytes with lysosomal membrane destabilization (LMD; %) was estimated for 240 min (Méthé *et al.*, 2017).

Lysozyme. The protocol used to assess lysozyme activity in the digestive gland of *P. imbricata* was based on the lysis of the cell wall of *Micrococcus lysodeikticus*, using agarose lyso-plates. The diameters of the lysis inhibition halos were compared to the standard of hen egg-white lysozymes (HEL) through linear regression analysis (Goven and Kennedy, 1996).

Lipid peroxidation and total proteins. The malondialdehyde (MDA) level in the digestive gland was determined spectrophotometrically at 535 nm through a thiobarbituric acid reactive substances assay, using 1,1,3,3-tetraethoxypropane as a standard (Ohkawa *et al.* 1979). The values were normalized to the total protein content. Protein quantification was carried out following the methodology proposed by Lowry *et al.* (1951).

1,1,3,3-tetraetoxipropano como estándar (Ohkawa *et al.* 1979). Los valores fueron normalizados con el contenido de proteínas totales. La cuantificación de proteínas se realizó siguiendo la metodología propuesta por Lowry *et al.* (1951).

Análisis estadísticos. Los efectos sobre parámetros inmunológicos y bioquímicos fueron analizados numéricamente por un ANOVA de dos vías (concentraciones y días de exposición) con una prueba *a posteriori* de Dunnet (Sokal y Rohlf, 2012). Previamente se comprobó la distribución normal de los datos y la homogeneidad de las varianzas. Todos los datos se analizaron mediante el software Statgraphics® Plus versión 5.1.

RESULTADOS

Contaje y viabilidad celular. Un aumento del NTH fue observado en las ostras expuestas a 1 % de Faluma durante los tres días de exposición ($F = 4.32$ $p < 0.001$), en contraste con las ostras controles para este período (Figura 1). Durante los días 5 y 7, las ostras expuestas a Faluma mostraron una tendencia a la disminución del NTH en todas las concentraciones de exposición ($F = 15.80$ $p < 0.001$), evidenciándose el mayor efecto a la concentración de 20 %.

Statistical analysis. The effects on immunological and biochemical parameters were numerically analyzed via a two-way ANOVA (concentrations and days of exposure) with a Dunnet *post hoc* test (Sokal and Rohlf, 2012). Prior to analysis, the data were tested for normal distribution and variance homogeneity. All data were analyzed using the Statgraphics Plus version 5.1 software.

RESULTS

Cell count and viability. An increase in the TNH) was observed in oysters exposed to 1 % Wsfual over three days of exposure ($F = 4.32$; $p < 0.001$), in contrast to control oysters for this period (Figure 1). During days 5 and 7, the oysters exposed to Wsfual showed a tendency towards a decrease in the TNH at all exposure concentrations ($F = 15.80$; $p < 0.001$), evidencing the greatest effect at the 20 % concentration.

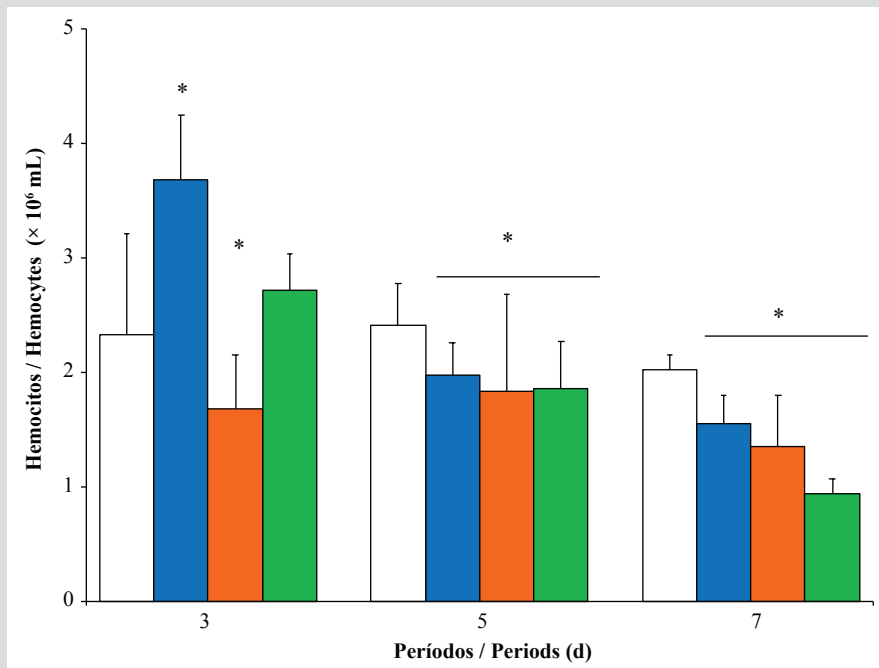


Figura 1. Número total de hemocitos de *Pinctada imbricata* expuesta a concentraciones de 0 % (□), 1 % (■), 10 % (■) y 20 % (■) de una fracción acuosa de lubricantes usados de motores de automóviles (Faluma) durante distintos períodos. Las barras y las líneas de tendencias representan las medias y la desviación estándar respectivamente. (*) indican diferencia $p < 0.05$ con respecto al control (0 %).

Figure 1. Total hemocyte count of *Pinctada imbricata* exposed to concentrations *i.e.*, 0 % (□), 1 % (■), 10 % (■), and 20 % (■) of a water-soluble fraction of used automobile engine lubricants (Wsfual) over different periods. The bars and trend lines represent the means and standard deviation, respectively. (*) indicates a difference of $p < 0.05$ with respect to the control (0 %).

La viabilidad de los hemocitos las ostras expuestas a la Faluma y no expuestas varió significativamente, tanto a las distintas concentraciones como durante los períodos de exposición ($F = 25.86$ $p < 0.001$ y $F = 4.28$ $p < 0.001$, respectivamente) (Figura 2). Durante el día 3 de exposición, las ostras no presentaron variación en la viabilidad de hemocitos cuando se contrastó con los controles. Sin embargo, después del quinto día de exposición se observó una reducción evidente en este parámetro en todas las concentraciones de exposición. A los siete días, las ostras expuestas a la más alta concentración de Faluma mostraron una reducción en el porcentaje de células viables (~ 66 %).

The viability of hemocytes in oysters exposed to Wsfual and those unexposed varied significantly, both at different concentrations and during the exposure periods ($F = 25.86$, $p < 0.001$ and $F = 4.28$, $p < 0.001$, respectively) (Figure 2). During day 3 of exposure, there was no variation in the oysters' hemocyte viability when contrasted with the controls. However, after the fifth day of exposure, a clear reduction in this parameter was observed at all exposure concentrations. After seven days, the oysters exposed to the highest concentration of Wsfual showed a reduction in the percentage of viable cells (~ 66 %).

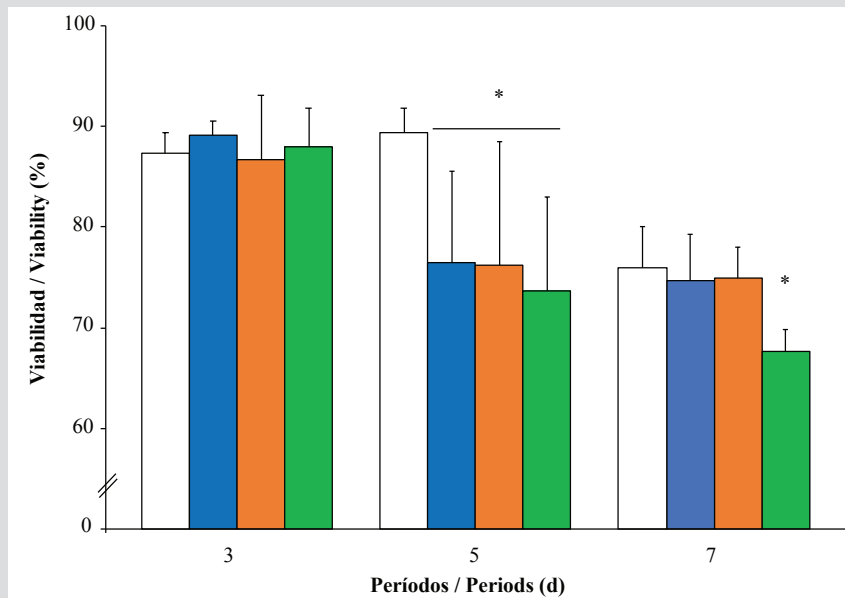


Figura 2. Viabilidad de hemocitos en *Pinctada imbricata* expuesta a distintas concentraciones de 0 % (□), 1 % (■), 10 % (■) y 20 % (■) una fracción acuosa de lubricantes usados de motores de automóviles (Faluma) durante distintos períodos. Las barras y las líneas de tendencias representan las medias y la desviación estándar respectivamente. (*) indican diferencia $p < 0.05$ con respecto al control (0 %).

Figure 2. Hemocyte viability in *Pinctada imbricata* exposed to various concentrations *i.e.*, 0 % (□), 1 % (■), 10 % (■), and 20 % (■) of a water-soluble fraction of used automobile engine lubricants (Wsfual) over different periods. The bars and trend lines represent the means and standard deviation, respectively. (*) indicates a difference of $p < 0.05$ with respect to the control (0 %).

Fagocitosis y lisozima. El número de fagocitos (NF) mostró un incremento significativo durante el primer período de exposición, especialmente a las concentraciones de 10 y 20 %. Sin embargo, durante el séptimo día se experimentó un decrecimiento en esta respuesta, siendo el efecto más pronunciado en ostras expuestas a las concentraciones más elevadas de Faluma (Figura 3). La actividad de lisozima en la glándula digestiva mostró diferencias altamente significativas entre las concentraciones ($F = 4.83$; $p < 0.001$) entre los organismos sometidos a la Faluma; sin embargo, no mostró similar tendencia entre los días de exposición ($F = 0.60$; $p > 0.05$). Un descenso notorio fue observado en la actividad

Phagocytosis and lysozyme. The number of phagocytes (NP) showed a significant increase during the first period of exposure, especially at concentrations of 10 and 20 %. However, during the seventh day, there was a decrease in this response, with the most pronounced effect taking place on oysters exposed to higher concentrations of Wsfual (Figure 3). Lysozyme activity in the digestive gland showed highly significant differences between concentrations ($F = 4.83$; $p < 0.001$) among the organisms subjected to Wsfual, but it did not show a similar trend over the days of exposure ($F = 0.60$; $p > 0.05$). A noticeable decrease in lysozyme activity was observed at the highest

de la lisozima a la mayor concentración (20 %) durante los primeros tres días de exposición (Figura 4); contrariamente, un incremento de la actividad de esta enzima bacteriolítica fue observado durante los siete días de exposición en las ostras expuestas a la concentración de 10 % de Faluma ($F = 14.22$; $p < 0.001$).

concentration (20 %) during the first three days of exposure (Figure 4). Conversely, an increase in the activity of this bacteriolytic enzyme was observed over the seven days of exposure in oysters exposed to the 10 % concentration of Wsfual ($F = 14.22$; $p < 0.001$).

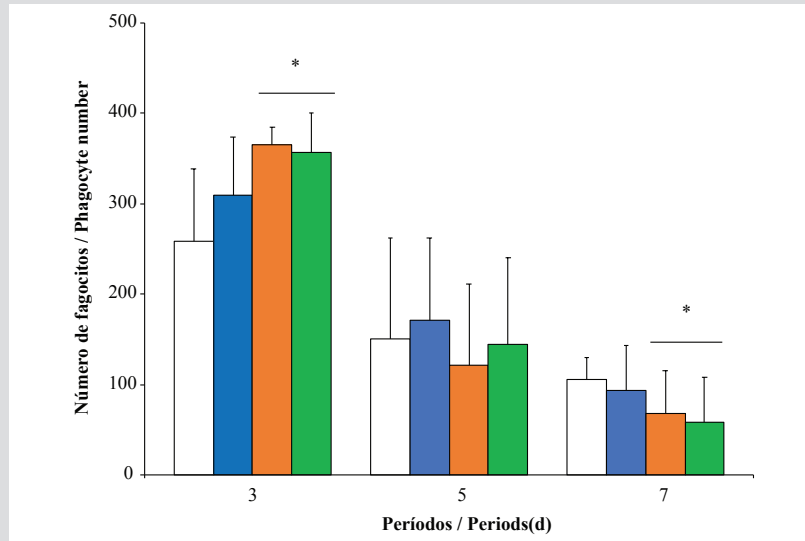


Figura 3. Número de fagocitos en la hemolinfa de *Pinctada imbricata* expuesta a distintas concentraciones de 0 % (□), 1 % (■), 10 % (■) y 20 % (■) una fracción acuosa de lubricantes usados de motores de automóviles (Faluma) durante distintos periodos. Las barras y las líneas de tendencias representan las medias y la desviación estándar respectivamente. (*) indican diferencia $p < 0.05$ con respecto al control (0 %).

Figure 3. Number of phagocytes in the hemolymph of *Pinctada imbricata* exposed to various concentrations *i.e.*, 0 % (□), 1 % (■), 10 % (■), and 20 % (■) of a water-soluble fraction of used automobile engine lubricants (Wsfual) over different periods. The bars and trend lines represent the means and the standard deviation, respectively. (*) indicates a difference of $p < 0.05$ with respect to the control (0 %).

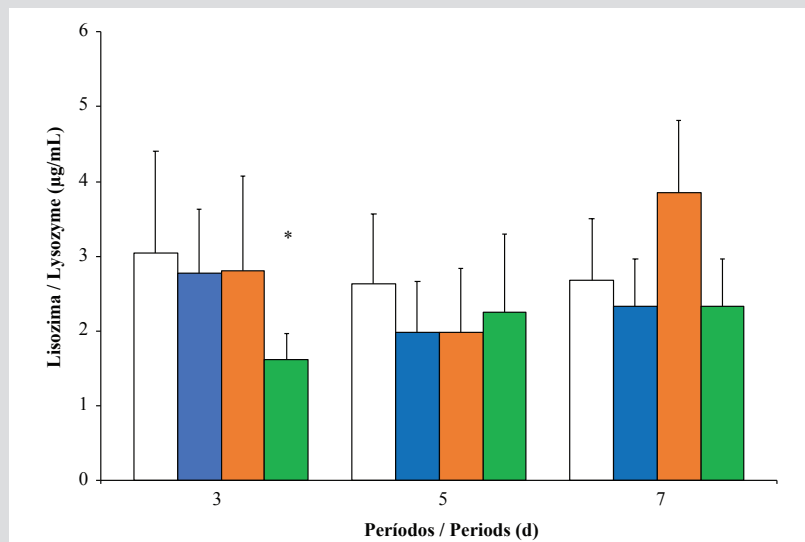


Figura 4. Actividad de lisozima ($\mu\text{g/mL}$) en la glándula digestiva de *Pinctada imbricata* expuesta a concentraciones de 0 % (□), 1 % (■), 10 % (■) y 20 % (■) una fracción acuosa de lubricantes usados de motores de automóviles (Faluma) durante distintos periodos. Las barras y las líneas de tendencias representan las medias y la desviación estándar respectivamente. (*) indican diferencia $p < 0.05$ con respecto al control (0 %).

Figure 4. Lysozyme activity ($\mu\text{g/mL}$) in the digestive gland of *Pinctada imbricata* exposed to concentrations *i.e.*, 0 % (□), 1 % (■), 10 % (■), and 20 % (■) of a water-soluble fraction of used automobile engine lubricants (Wsfual) over different periods. The bars and trend lines represent the means and the standard deviation, respectively. (*) indicates a difference of $p < 0.05$ with respect to the control (0 %).

Estabilidad lisosomal. Las ostras expuestas a las crecientes concentraciones de Faluma presentaron una población de hemocitos con reducida capacidad para la retención del rojo neutro durante 240 min. Este parámetro mostró diferencias altamente significativas entre las ostras expuestas a las concentraciones experimentales ($F = 22.54$; $p < 0.001$) y entre los tres períodos de exposición a Faluma ($F = 17.17$; $p < 0.001$), observándose un incremento de daño lisosomal relacionado concomitantemente con las concentraciones de exposición. El máximo porcentaje de células dañadas fue evidenciado en las ostras expuestas a 20 % durante los siete días (Figura 5).

Lysosomal stability. Oysters exposed to increasing concentrations of Wsfual exhibited a population of hemocytes with a reduced capacity for retaining neutral red over 240 min. This parameter showed highly significant differences between the oysters exposed to the experimental concentrations ($F = 22.54$; $p < 0.001$) and across the three periods of exposure to Wsfual ($F = 17.17$; $p < 0.001$), with an observed increase in lysosomal damage concomitantly associated with exposure concentrations. The highest percentage of damaged cells was evidenced in oysters exposed to 20 % for seven days (Figure 5).

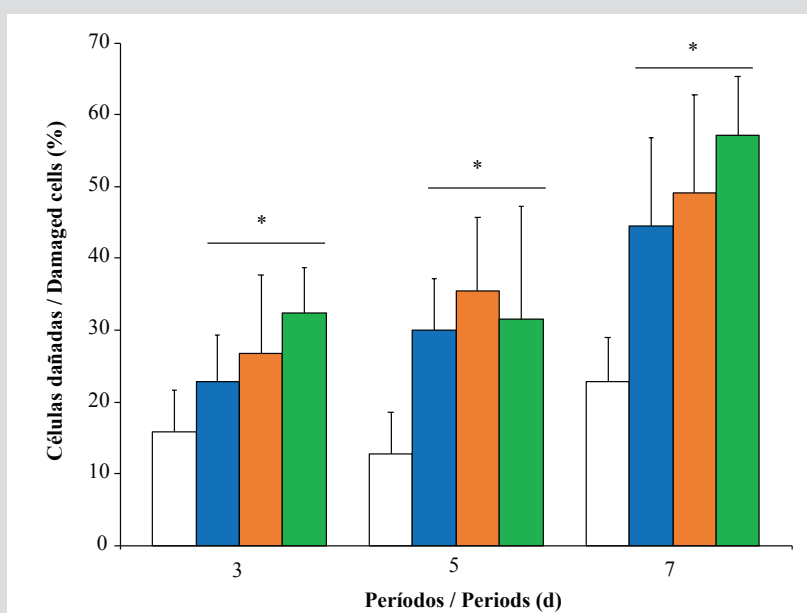


Figura 5. Porcentaje de células con daños en la membrana de *Pinctada imbricata* (durante 240 min de incubación) expuesta a de 0 % (□), 1 % (■), 10 % (■) y 20 % (■) una fracción acuosa de lubricantes usados de motores de automóviles (Faluma) durante distintos períodos. Las barras y las líneas de tendencias representan las medias y la desviación estándar respectivamente. (*) indican diferencia $p < 0.05$ con respecto al control (0 %).

Figure 5. Percentage of cells with membrane damage in *Pinctada imbricata* (during 240 minutes of incubation) exposed to *i.e.*, 0 % (□), 1 % (■), 10 % (■), and 20 % (■) of a water-soluble fraction of used automobile engine lubricants (Wsfual) over different periods. The bars and trend lines represent the means and the standard deviation, respectively. (*) indicates a difference of $p < 0.05$ with respect to the control (0 %).

Peroxidación de lípidos. Los niveles de MDA en la glándula digestiva de las ostras expuestas durante los tres períodos presentaron contenidos similares ($F = 1.90$; $p > 0.05$). No obstante, se observaron diferencias altamente significativas entre las concentraciones experimentales ($F = 6.17$; $p < 0.05$). Se evidenció un ligero incremento en las concentraciones de MDA en las ostras expuestas a la concentración más alta, durante los tres y cinco días de exposición (Figura 6).

Lipid peroxidation. The levels of MDA in the digestive gland of oysters exposed during the three periods showed similar contents ($F = 1.90$; $p > 0.05$). However, highly significant differences were observed between the experimental concentrations ($F = 6.17$; $p < 0.05$). A slight increase in the MDA concentrations was evidenced in oysters exposed to the highest concentration during three and five days of exposure (Figure 6).

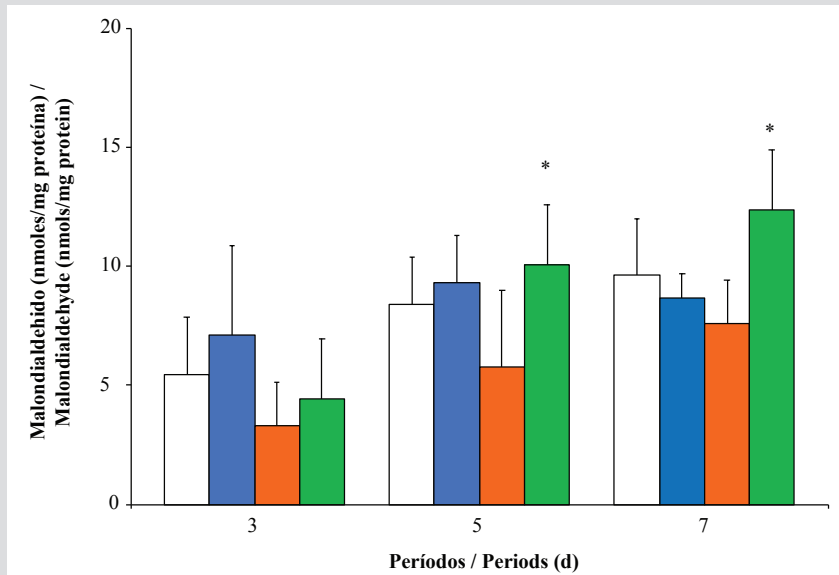


Figura 6. Niveles de malondialdehído (MDA) en la glándula digestiva de *Pinctada imbricata* expuesta a de 0 % (□), 1 % (■), 10 % (■) y 20 % (■) una fracción acuosa de lubricantes usados de motores de automóviles (Faluma) durante distintos períodos. Las barras y las líneas de tendencias representan las medias y la desviación estándar respectivamente. (*) indican diferencia $p < 0.05$ con respecto al control (0 %).

Figure 6. Levels of malondialdehyde (MDA) in the digestive gland of *Pinctada imbricata* exposed to i.e., 0 % (□), 1 % (■), 10 % (■), and 20 % (■) of a water-soluble fraction of used automobile engine lubricants (Wsfual) over different periods. The bars and trend lines represent the means and the standard deviation, respectively. (*) indicates a difference of $p < 0.05$ with respect to the control (0 %).

DISCUSIÓN

En este estudio se evidencia alteraciones en las respuestas hematológicas e inmunológicas innatas en la ostra *P. imbricata*, particularmente en las defensas mediadas por hemocitos y la activación de mecanismos de protección humoral en presencia de concentraciones subletales de Faluma. Estas indicaciones están fundamentadas en el incremento del NTH y NF en ostras contaminadas con Faluma durante el período más temprano de exposición. Al parecer, el aumento en la población de hemocitos en las ostras expuestas forma parte de las respuestas inespecíficas ante un estrés químico. Existen evidencias que sugieren que las funciones inmunes en los bivalvos pueden ser moduladas en presencia de mezclas de xenobióticos, lo cual está estrechamente relacionado con las concentraciones de exposición (Burgos-Aceves y Faggio, 2017; Zapata-Vívenes *et al.*, 2022). En contraste, a concentraciones bajas de Faluma se encontró correspondencia entre NTH, PV y el incremento del NF, lo cual podría estar coligado a una posible estimulación hematopoyética de las ostras por acción directa de los xenobióticos, similar como suele ocurrir de manera inespecífica ante la invasión de microorganismos oportunistas (Allam y Raftos, 2015; Bachère *et al.*, 2015). Similarmente se ha observado un incremento del daño celular provocado por oxiradicales sobre la viabilidad de hemocitos y las defensas

DISCUSSION

This study shows evidence of alterations in the hematological and innate immunological responses of the oyster *P. imbricata*, particularly in defenses mediated by hemocytes and the activation of humoral protection mechanisms in the presence of sublethal concentrations of Wsfual. These indications are based on the increase in TNH and NP in oysters contaminated with Wsfual during the earliest period of exposure. It appears that the increase in the hemocyte population in exposed oysters is part of the unspecific responses to chemical stress. There is evidence to suggest that immune functions in bivalves can be modulated in the presence of xenobiotic mixtures, which is closely related to exposure concentrations (Burgos-Aceves and Faggio, 2017; Zapata-Vívenes *et al.*, 2022). In contrast, at low concentrations of Wsfual, there was a correspondence between TNH, PV, and the increase in NP, which could be linked to possible hematopoietic stimulation of oysters by the direct action of xenobiotics, similar to what often unspecifically occurs facing the invasion of opportunistic microorganisms (Allam and Raftos, 2015; Bachère *et al.*, 2015). Similarly, an increase in cell damage caused by oxyradicals on hemocyte viability and immune defenses, such as the production of superoxide anions, TNH, and phagocytic activity, has been observed in the mussel *Mytilus*

inmunes, tales como la producción de anión superóxido, NTH y actividad fagocitaria en el mejillón *Mytilus edulis* colectado en zonas impactadas por derrames petroleros (Auguste *et al.*, 2020; Balbi *et al.*, 2021) y en *Tegillarca granosa* asociado al ingreso de microplásticos (Sun *et al.*, 2020). Se considera que la producción de hemocitos y el incremento de la actividad fagocítica son procesos energéticamente costosos, y que en presencia de mezclas complejas de contaminantes pueden ser afectados por la desviación de la energía hacia los procesos fisiológicos de defensa molecular, a través del metabolismo redox, contra los xenobióticos recientemente incorporados (López-Landavery *et al.*, 2022).

En los períodos cinco y siete días, NTH y PF mostraron un descenso significativo, lo cual permite estimar el tiempo y la concentración mínima necesaria para que la Faluma cause un efecto perjudicial en las respuestas celulares. Los efectos supresores consecuencia de exposición a contaminantes han sido una respuesta notoria en bivalvos y en otros organismos de diferentes filas, especialmente cuando los mecanismos de defensas contra xenobióticos son sobrepasados a causa de su acumulación, metabolismo, sobreproducción de radicales libres o formación de sustancias con elevados niveles de toxicidad en contraste a la molécula originaria (Balbi *et al.*, 2021; López-Landavery *et al.*, 2022). La reducción en las respuestas de tipo celular durante la exposición más prologada es una señal fisiológica de su limitado desempeño y sensibilidad en ostras *P. imbricata* químicamente estresadas. Se supone que algunas funciones preponderantes de los hemocitos tales como fagocitosis, digestión, transporte de metabolitos, almacenamiento de nutrientes, cicatrización y reparación de la concha, mineralización y excreción, quimiotaxis, reconocimiento de patógenos, y síntesis de antimicrobianos podrían estar verse alteradas por la presencia de mezclas de tóxicos (Song *et al.*, 2010). Las respuestas inmunológicas pueden variar dependiendo del tipo de contaminante; por ejemplo, en ambientes impactados se ha registrado que algunas respuestas tales como actividad de fenoloxidasas es inhibida en almejas, en cambio la actividad de las lisozimas y esterases, junto a NTH, se incrementa en individuos colectados en sitios de alta contaminación (Mansour *et al.*, 2020), lo que conlleva a aumentar el riesgo de infección microbiana por la supresión de la actividad fagocítica de los hemocitos.

La actividad de lisozima en la glándula digestiva fue modulada en las distintas concentraciones de exposición. Inicialmente fue registrado un descenso débil de la actividad durante los primeros tres días de exposición a 20 %. Por

edulis collected in areas impacted by oil spills (Auguste *et al.*, 2020; Balbi *et al.*, 2021), as well as in *Tegillarca granosa*, which is associated with the intake of microplastics (Sun *et al.*, 2020). It is considered that the production of hemocytes and the increase in phagocytic activity are energetically costly processes, and that, in the presence of complex mixtures of contaminants, they can be affected by the diversion of energy towards physiological processes of molecular defense, through redox metabolism, against the newly incorporated xenobiotics (López-Landavery *et al.*, 2022).

In the five- and seven-day periods, TNH and PF showed a significant decrease, thus allowing to estimate the time and minimum concentration necessary for the Wsfual to cause a detrimental effect on cellular responses. The suppressive effects resulting from exposure to contaminants have been a notable response in bivalves and other organisms from different phyla, especially when defense mechanisms against xenobiotics are overwhelmed due to accumulation, metabolism, the overproduction of free radicals, or the formation of substances with higher levels of toxicity in comparison with the original molecule (Balbi *et al.*, 2021; López-Landavery *et al.*, 2022). The reduction in cellular-type responses during prolonged exposure is a physiological signal of their limited performance and sensitivity in chemically stressed *P. imbricata* oysters. Some predominant functions of hemocytes, such as phagocytosis, digestion, metabolite transport, nutrient storage, wound healing and shell repair, mineralization and excretion, chemotaxis, pathogen recognition, and antimicrobial synthesis might be altered by the presence of toxic mixtures (Song *et al.*, 2010). Immunological responses can vary depending on the type of contaminant. For example, in impacted environments, it has been recorded that some responses such as phenol oxidase activity are inhibited in clams, whereas lysozyme and esterase activities, along with TNH, are increased in individuals collected from highly polluted sites (Mansour *et al.*, 2020), which leads to an increased risk of microbial infection due to the suppression of the phagocytic activity of hemocytes.

Lysozyme activity in the digestive gland was modulated at different exposure concentrations. Initially, a slight decrease in activity was recorded during the first three days of exposure at 20 %. On the contrary, during the seven days of exposure, the oysters maintained at 10 % Wsfual showed an increase in the activity of this enzyme. The action of lysozyme demonstrates a reciprocal

el contrario, durante los siete días de exposición las ostras mantenidas a 10 % de Faluma mostraron un incremento de la actividad de esta enzima. La acción de la lisozima manifiesta un efecto recíproco con relación con las defensas inmunológicas mediada por hemocitos y el incremento de la actividad de lisozima en la glándula digestiva de *P. imbricata* expuesta a corto plazo a Faluma, muestra que esta respuesta forma parte del mecanismo de homeostasis humoral, la cual permite incrementar las defensas bioquímicas frente a una situación de estrés químico. El mecanismo de protección ha sido descrito en otros invertebrados marinos, particularmente cuando algunos parámetros inmune-celulares se encuentran suprimidos en invertebrados (Zapata-Vivenes *et al.*, 2022). La lisozima es una enzima antimicrobiana la cual actúa sobre las uniones de los peptidoglicanos de la pared de ciertas bacterias y hongos, como un componente innato que protege al organismo de bacterias en el ambiente y controla la flora simbiótica natural (Wei *et al.*, 2017; Liao *et al.* 2020). Otros estudios, usando a *P. imbricata* como modelo mostraron que básicamente la capacidad fagocítica de los hemocitos y la actividad lítica microbiana de la lisozima no fueron adversamente alteradas durante el proceso de contaminación subletal por fracciones acuosas de una formulación de petróleo pesado (Nusetti *et al.*, 2004). Probablemente, la condición de estrés manifestado en el organismo durante la exposición aguda a Faluma no tuvo mayores implicaciones en la capacidad de respuestas inmunológicas asociadas con el potencial fagocítico de los hemocitos y la actividad bacteriolítica de la lisozima, a pesar que el organismo desarrolló un estado de estrés oxidativo que en ciertos casos se corresponde con efectos inmunotóxicos.

Las ostras expuestas a Faluma presentaron poblaciones de hemocitos con elevados porcentajes de desestabilización lisosomal, mostrando una relación paralela entre dosis usadas y la respuesta obtenida. El máximo porcentaje de células dañadas fue evidenciado en ostras expuestas a la más alta concentración durante los siete días de exposición; este daño puede influenciar la reducción de la viabilidad celular. Similarmente, Hwang *et al.* (2014) registraron 50 % de las células desestabilizadas en presencia de hidrocarburos aromáticos policíclicos totales en la ostra *Crassostrea virginica*, afectando directamente las funciones inmunológicas. La disfunción de los procesos lisosomales ha sido relacionada con muchos aspectos de patologías asociadas a la toxicidad química y procesos degenerativos (Martínez-Gómez *et al.*, 2008). Se conoce que los lisosomas en bivalvos son los organelos con mayor capacidad de acumulación y homeostasis de xenobióticos, incluyendo metales pesados (Zha

effect in relation to immunological defenses mediated by hemocytes, and the increase in lysozyme activity in the digestive gland of *P. imbricata* exposed in the short term to Wsfual indicates that this response is part of the humoral homeostasis mechanism, which increases biochemical defenses against a chemical stress situation. This protection mechanism has been described in other marine invertebrates, particularly when some immune-cellular parameters are suppressed in invertebrates (Zapata-Vivenes *et al.*, 2022). Lysozyme is an antimicrobial enzyme that acts on the bonds of peptidoglycans in the walls of certain bacteria and fungi, as an innate component that protects the organism from environmental bacteria and controls the natural symbiotic flora (Wei *et al.*, 2017; Liao *et al.*, 2020). Other studies, using *P. imbricata* as a model, basically showed that the phagocytic capacity of hemocytes and the microbial lytic activity of lysozyme were not adversely altered during the process of sublethal contamination by aqueous fractions of a heavy oil formulation (Nusetti *et al.*, 2004). Likely, the stress conditions manifested in the organism during acute exposure to Wsfual did not have major implications in the capacity of immunological responses associated with the phagocytic potential of hemocytes and the bacteriolytic activity of lysozyme, even though the organism developed a state of oxidative stress that, in certain cases, corresponds with immunotoxic effects.

The oysters exposed to Wsfual exhibited populations of hemocytes with elevated percentages of lysosomal destabilization, showing a parallel relationship between the doses used and the response obtained. The highest percentage of damaged cells was observed in oysters exposed to the highest concentration over seven days of exposure – this damage could influence the reduction of cell viability. Similarly, Hwang *et al.* (2014) recorded 50 % destabilized cells in the presence of total polycyclic aromatic hydrocarbons in the oyster *Crassostrea virginica*, directly affecting immunological functions. The dysfunction of lysosomal processes has been linked to many aspects of pathologies associated with chemical toxicity and degenerative processes (Martínez-Gómez *et al.*, 2008). It is known that, in bivalves, lysosomes are the organelles with the greatest capacity for accumulation and homeostasis of xenobiotics, including heavy metals (Zha *et al.*, 2019) and hydrocarbons (Xie *et al.*, 2017). The modulation of the immune system by contaminant agents has been described in a variety of aquatic invertebrates, including bivalve mollusks. Generally, chronic exposure

et al., 2019) e hidrocarburos (Xie *et al.*, 2017). La modulación del sistema inmunológico por agentes contaminantes ha sido descrita en una variedad de invertebrados acuáticos, incluyendo moluscos bivalvos. Por lo general, la exposición crónica a sustancias orgánicas (hidrocarburos aromáticos, pesticidas, bifenilos policlorados, entre otros) ejercen efectos negativos sobre la actividad fagocítica de los hemocitos (Fournier *et al.*, 2000; Jian *et al.*, 2017); sin embargo, esta tendencia de disfunción inmunológica no es una constante en condiciones agudas.

Los niveles de MDA en las ostras expuestas a Faluma durante el último período demuestra el daño oxidativo sobre los lípidos sobrevenido por el metabolismo de xenobióticos. De manera similar, Nusetti *et al.* (2004) registraron que la exposición a fracciones acuosas de Combustóleo n°6 puede provocar el aumento de las actividades de las enzimas antioxidantes y metabolizadoras de xenobióticos en la glándula digestiva en *P. imbricata*, producto de la exacerbada producción de radicales libres. La peroxidación de lípidos puede perturbar las propiedades estructurales y funcionales de las membranas de los organelos citoplasmáticos. En este contexto, las alteraciones en las membranas biológicas pueden comprometer la funcionabilidad de los componentes lisosomales, generando procesos degradativos que pueden traer como consecuencia la autólisis celular (Domouhtsidou *et al.*, 2004).

CONCLUSIONES

Los componentes químicos presentes Faluma alteran el normal funcionamiento del sistema de defensa inmune de la ostra *P. imbricata*, fundamentado en efectos moduladores sobre la inmunidad innata y alteración a la estabilidad de los lisosomas de sus hemocitos. Además, la exposición a Faluma conlleva daños oxidativos en la glándula digestiva, pudiendo perturbar sus funciones de tipo inmunológicas-humoral. Las respuestas moleculares e inmuno-celulares evaluadas muestran ser biomarcadores ideales para evaluar alteraciones por contaminantes, las cuales pueden ser implementadas como análisis de rutina en los monitoreos ambientales y sistemas de cultivos, usando como organismo modelo a *P. imbricata*.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Consejo de Investigación de la Universidad de Oriente y al Instituto Oceanográfico de Venezuela.

to organic substances (aromatic hydrocarbons, pesticides, polychlorinated biphenyls, among others) has negative effects on the phagocytic activity of hemocytes (Fournier *et al.*, 2000; Jian *et al.*, 2017), this trend of immunological dysfunction is not a constant under acute conditions.

The levels of MDA in oysters exposed to Wsfual during the last period demonstrate oxidative damage to lipids caused by the metabolism of xenobiotics. Similarly, Nusetti *et al.* (2004) recorded that exposure to aqueous fractions of Fuel Oil No. 6 can cause an increase in the activities of antioxidant enzymes and xenobiotic-metabolizing enzymes in the digestive gland of *P. imbricata*, as a result of the exacerbated production of free radicals. Lipid peroxidation can disturb the structural and functional properties of the membranes of cytoplasmic organelles. In this context, alterations in biological membranes can compromise the functionality of lysosomal components, entailing degradative processes that can lead to cellular autolysis (Domouhtsidou *et al.*, 2004).

CONCLUSIONS

The chemical components present in Wsfual alter the normal functioning of the immune defense system of the oyster *P. imbricata*, which is based on modulatory effects on innate immunity and the disruption of the stability of lysosomes in their hemocytes. Furthermore, exposure to Wsfual leads to oxidative damage in the digestive gland, potentially disturbing its immunological-humoral functions. The molecular and immune-cellular responses evaluated prove to be ideal biomarkers for assessing alterations caused by contaminants, which can be implemented as routine analyses in environmental monitoring and aquaculture systems, using *P. imbricata* as a model organism.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank the Research Council of Universidad de Oriente and the Oceanographic Institute of Venezuela.

BIBLIOGRAFÍA / LITERATURE CITED

- Aliko, V., G. Hajdaraj, A. Caci and C. Faggio. 2015. Copper induced lysosomal membrane destabilisation in haemolymph cells of mediterranean green crab (*Carcinus aestuarii*, Nardo, 1847) from the Narta Lagoon (Albania). *Braz. Arch. Biol. Technol.* 58(5):750–756. <https://doi.org/10.1590/s1516-89132015050244>
- Allam, B. and D. Raftos. 2015. Immune responses to infectious diseases in bivalves. *J. Invert. Pathol.*, 131: 121–136. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.05.005>
- Auguste, M., Balbi, T., Ciacci, C., Canonico, B., Papa, S., Borello, A., Vezzulli, L., Canesi, L. 2020. Shift in immune parameters after repeated exposure to nanoplastics in the marine bivalve *Mytilus*. *Front Immunol.* 15: 11:426. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00426>
- Auguste, M., T. Balbi, C. Ciacci, B. Canonico, S. Papa, A. Borello, L. Vezzulli, L. Canesi, L. 2020. Shift in immune parameters after repeated exposure to nanoplastics in the marine bivalve *Mytilus*. *Front Immunol.* 15: 11:426. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00426>
- Bachère, E., R.D. Rosa, P.M. Schmitt, A. Poirier and N. Merou. 2015. The new insights into the oyster antimicrobial defense: cellular, molecular and genetic view. *Fish and Shellfish Immunology*, 2015, 46 (1), pp.50-64. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.02.040>
- Balbi, T., M. Auguste, C. Ciacci and L. Canesi. 2021. Immunological Responses of Marine Bivalves to Contaminant Exposure: Contribution of the -Omics Approach. *Front Immunol.* 12: 618726. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.618726>
- Basria, S.M.N., R.I. Mydin and S. Okekpa. 2019. Reactive oxygen species, cellular redox homeostasis and cancer. homeostasis—an integrated vision. In: Lasacosvitsch F, S. Dos Anjos Games (Eds) *BiotechOpen*, London. <https://doi.org/10.5772/intechopen.76096>
- Burgos-Aceves, M. A. and C. Faggio. 2017. An approach to the study of the immunity functions of bivalve haemocytes: Physiology and molecular aspects. *Fish & Shellfish Immunology*, 67, 513–517. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.06.042>
- Cvengros, J., T. Liptaj and N. Pónayová. 2017. Study of polyaromatic hydrocarbons in current used motor oils, *Int. J. Petrochem. Sci. Eng.*, 2(7) 219-226. <https://doi.org/10.15406/ipcse.2017.02.00060>
- Freitas, J.S., T.S. Boscolo-Pereira, C.N. Pereira-Boscolo, M. Navarro-García, C.A. de Oliveira-Rivero and E.A. De Almeida. 2020. Oxidative stress, biotransformation enzymes and histopathological alterations in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to new and used automotive lubricant oil. *Comp. Physiol.*, 234: 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2020.108770>
- Goven, A. and J. Kennedy. 1996. Environmental pollution and toxicity in invertebrates: An earthworm model for immunotoxicology. *Adv. Comp. Environ. Physiol.*, 24: 170-211. https://doi.org/10.1007/978-3-642-79847-4_7
- He, L., T. He, S. Farrar, L. Ji, T. Liu and X. Ma. 2017. Antioxidants maintain cellular redox homeostasis by elimination of reactive oxygen species. *Cell Physiol. Biochem.*, 44: 532-553. <https://doi.org/10.1159/000485089>
- Hwang, H.M., B. Stanton, T. McBride and M. Anderson. 2014. Polycyclic aromatic hydrocarbon body residues and lysosomal membrane destabilization in mussels exposed to the Dubai Star bunker fuel oil (intermediate fuel oil 380) spill in San Francisco Bay. *Environ. Toxicol. Chem.*, 33: 1117–1121. <https://doi.org/10.1002/etc.2518>
- Jiang Y, Tang X, Sun T, Wang and Y. BDE-47 Exposure Changed the Immune Function of Haemocytes in *Mytilus edulis*: An Explanation Based on ROS-Mediated Pathway. *Aquat Toxicol* (2017) 182:58–66. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.11.010>
- Liao, Y., C. Cai, C. Yang, Z. Zheng, Q. Wang, X. Du and Y. Deng. 2020. Effect of protein sources in formulated diets on the growth, immune response, and intestinal microflora of pearl oyster *Pinctada fucata martensii*. *Aquac. Rep.*, 16: 100253. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2019.100253>
- Lodeiros, C.J., L. Freitas, A. Márquez, M.E. Glem, M. Guevara and P.E. Saucedo. 2016. Comparative growth and survival of spat of the Caribbean pearl oyster, *Pinctada imbricata* cultivated indoor with microalgae diets and outdoor with natural diet. *Aquacul. Nutr.*, 23(3): 511–522. <https://doi.org/10.1111/anu.12419>
- López-Landavery, E.A., G. Amador-Cano, M.A. Tripp-Valdez, N. Ramírez-Álvarez, F. Cicala, R.J.E. Gómez-Reyes, F. Díaz, A.D. Re-Araujo and C.E. Galindo-Sánchez. 2022. Hydrocarbon exposure effect on energetic metabolism and immune response in *Crassostrea virginica*. *Marine Pollution Bulletin.* 180:113738. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2022.113738>
- Lowe, D., M. Moore and B. Evans. 1992. Contaminant impact of interactions of molecular probes with lysosomes in living hepatocytes from dab *Limanda limanda*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 91 (1): 135-140. <https://doi.org/10.3354/meps091135>
- Lowry, O., N. Rosebrough, A. Farr and R. Randall. 1951. Protein measurement with the folin reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275.
- Mansour, C., F.B. Taheur and R. Omrani. 2020. Immune biomarker and hydrocarbon concentrations in carpet shell clams (*Ruditapes decussatus*) collected from a Mediterranean coastal lagoon. *Euro-Mediterr J. Environ. Integr.*, 5: 11. <https://doi.org/10.1007/s41207-020-0147-4>



- Martínez-Gómez, C., J. Benedicto, J.A. Campillo and M. Moore. 2008. Application and evaluation of the neutral red retention (NRR) assay for lysosomal stability in mussel populations along the Iberian Mediterranean coast. *J. Environ. Monit.*, 10(4): 490. <https://doi.org/10.1039/b800441m>
- Matozzo, V., M. Giacomazzo, L. Finos, M.G. Marin, L. Bargelloni and M. Milan. 2013. Can ecological history influence immunomarker responses and antioxidant enzyme activities in bivalves that have been experimentally exposed to contaminants? A new subject for discussion in “eco-immunology” studies. *Fish Shell. Immunol.*, 35(1): 126–135. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.04.013>
- Méthé, D., L.A. Comeau, H. Stryhn, J.F. Burka, T. Landry and J. Davidson. 2017. Haemolymph fluid osmolality influences the neutral-red retention assay in the eastern oyster *Crassostrea virginica*. *J. Molluscan Stud.* 83: 229–234. <https://doi.org/10.1093/mollus/eyw050>
- Nusetti, O., L. Marcano, E. Zapata, M. Escalpés, S. Nusetti y C. Lodeiros. 2004. Respuestas inmunológicas y de enzimas antioxidantes en la ostra perla *Pinctada imbricata* (Mollusca: Pteriidae) expuesta a niveles subletales de fuel oil N°6. *Interciencia*, 29(6): 324-328. http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442004000600008&lng=es&synrm=iso
- Ohkawa, H., N. Ohishi and K. Yagi. 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction, *Rev. Anal. Biochem.* 95: 351–358. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(79\)90738](https://doi.org/10.1016/0003-2697(79)90738)
- Olonisakin, A., A. Adebayo and M.O. Aremu. 2005. Metal concentrations of fresh, used and treated crankcase oil. *Biosci. Biotech. Res. Asia*; 3: 187-191. Available from: <http://www.biotech-asia.org/?p=4361>
- Parisi, M.G., J. Pirrera, C.M. La Corte, D. Dara, M. Parrinello and Cammarata. 2021. Effects of organic mercury on *Mytilus galloprovincialis* hemocyte function and morphology. *J. Comp. Physiol. B*; 191: 143–158. <https://doi.org/10.1007/s00360-020-01306-0>
- Renault, T. 2015. Immunotoxicological effects of environmental contaminants on marine bivalves. *Fish Shellfish Immunol.*, 46(1): 88–93. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.04.011>
- Romero-Ferreira, P., D. Arrieche, V. Acosta, L. Pérez and C. Lodeiros. 2017. Gametogenic cycle of the oyster, *Pinctada imbricata*, in suspended culture in the Gulf of Cariaco, Venezuela. *Lat. Am. J. Aquat. Res.*;45(1): 139-148. <https://doi.org/10.3856/vol45-issue1-fulltext-13>
- Sun, S., W. Shi, Y. Tang, Y. Han, X. Du, W. Zhou, Y. Hu, C. Zhou and G. Liu. 2020. Immunotoxicity of petroleum hydrocarbons and microplastics alone or in combination to a bivalve species: Synergic impacts and potential toxication mechanisms. *Sci. Total Environ.*, 728: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138852>
- Strober, W. 2015. Trypan blue exclusion test of cell viability. *Curr. Protoc. Im.* 2 111, <https://doi.org/10.1002/0471142735.ima03bs111>
- Sokal, R. and F. Rohlf. 2012. *Biometry*. 4th Ed. W.H. Freeman. New York.
- Trivedi, P.C., J.J. Bartlett and T. Pulinilkunnil. 2020. Lysosomal biology and function: Modern view of cellular debris bin. *Cells*, 9(5): 1131. <https://doi.org/10.3390/cells9051131>
- Vásquez, G., R. Crescini, W. Villalba, J. Mogollón y L. Troccoli. 2015. Aspectos biológicos básicos de *Pinctada imbricata* (Bivalvia: Pteriidae) en la laguna de La Restinga, isla de Margarita, Venezuela. *Rev. Cienc. Mar. Cost.*;7: 117-132. <https://doi.org/10.15359/revmar.7.8>
- Villegas, L., C. Lodeiros, K. Malavé, J. Revilla y M. Lemus. 2015. Efecto subletal del cadmio en la ostra perla del Caribe *Pinctada imbricata* (Pterioida: Pteriidae) Röding, 1798. *Saber*; 27 (1): 39-45
- Week, J., V. Sharp and T. Williams. 1997. Contaminant-induced lysosomal membrane damage in blood cells of green mussel *Perna viridis* (Mytilidae): a field transplant study. Technical Report WC/97/64. DFID-TDR Project R6191. Land-derived contaminant influx to Jakarta Bay, Indonesia; 2: 1-30.
- Wei J., B Liu, S Fan, B Zhang, J Su and D. Yu. 2017. Serum immune response of pearl oyster *Pinctada fucata* to xenografts and allografts. *Fish Shellfish Immunol.*, 62: 303-310. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.01.039>
- Xie, J., C. Zhao, Q. Han, H. Zhou, Q. Li and X. Diao. 2017. Effects of pyrene exposure on immune response and oxidative stress in the pearl oyster, *Pinctada martensii*. *Fish Shellfish Immunol.*, 63: 237–244. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.02.032>
- Zha, S., J. Rong, X. Guan, Y. Tang, Y. Han and G. Liu. 2019. Immunotoxicity of four nanoparticles to a marine bivalve species, *Tegillarca granosa*. *J. Hazard Mater* 377:237–48. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.05.071>
- Zannella, C., F. Mosca, F. Mariani, G. Franci, V. Folliero, M. Galdiero, P.G. Tiscar and M. Galdiero. 2017. Microbial diseases of bivalve mollusks: infections, immunology and antimicrobial defense. *Mar. Drugs*; 15(6):182. <https://doi.org/10.3390/md15060182>
- Zapata-Vívenes, E., L. Marcano y V. Acosta 2018. Respuestas inmunológicas, estabilidad lisosomal y frecuencia de micronúcleos en *Eurythoe complanata* (Polychaeta:Amphinomidae) expuestos a una fracción acuosa de lubricantes usados de motores de automóviles. *Rev. Intern. Contam. Amb.*, 34 (2): 297-305. <https://doi.org/10.20937/RICA.2018.34.02.10>

- Zapata-Vívenes, E., O. Nusetti, L. Marcano, G. Sánchez and H. Guderley. 2020. Antioxidant defenses of flame scallop *Ctenoides scaber* (Born, 1778) exposed to the water-soluble fraction of used vehicle crankcase oils. *Toxicol. Rep.*, 7:1597–1606. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2020.11.009>
- Zapata Vívenes, E., G. Sánchez, O. Nusetti and L. Marcano. 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>
- Zhao, C., L. Xiaoxu, L. Shibin and Y. Chang. 2011. Assessments of lysosomal membrane responses to stresses with neutral red retention assay and its potential application in the improvement of bivalve aquaculture. *Afr. J. Biotechnol.*, 10 (64): 13968- 3973. <https://doi.org/10.5897/AJB10.2283>
- Zheng, F., F. Marques Gonçalves, Y. Abiko, H. Li, Y. Kumagai and M. Aschner. 2020. Redox toxicology of environmental chemicals causing oxidative stress. *Redox Biol.*, 34: <https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101475>

RECIBIDO / RECEIVED: 14/01/2022

ACEPTADO / ACCEPTED: 14/04/2023