



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS  
DEL NOROESTE, S.C.

---

Programa de Estudios de Posgrado

**EFEECTO DEL INJERTO DE MANTO SOBRE LA  
HEMATOPOYESIS Y FISIOLÓGÍA  
REPRODUCTIVA DE LA CONCHA NÁCAR *Pteria*  
*sterna* (Gould, 1851)**

**T E S I S**

Que para obtener el grado de

**Maestro en Ciencias**

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos  
Naturales  
(Orientación en Acuicultura)

p r e s e n t a

**Josafat Jehú Ojeda Ramírez de  
Areyno**

La Paz, B.C.S. Marzo de 2009

## ACTA DE LIBERACION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 10:22 horas del día 13 del Mes de marzo del 2009, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

### "EFECTO DEL INJERTO DE MANTO SOBRE LA RESPUESTA INMUNE (HEMATOPOYESIS) Y FISIOLÓGIA REPRODUCTIVA DE LA CONCHA NÁCAR *Pteria sterna* (Gould, 1851)"

Presentada por el alumno:

Josafat Jehú Ojeda Ramírez de Areyano

Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACION DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACION EN Acuacultura

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

#### LA COMISION REVISORA

  
Pedro E. Saucedo Lastra  
DIRECTOR DE TESIS

  
Angel Campa Cordova  
CO-TUTOR

  
Carlos Cáceres Martínez  
CO-TUTOR

  
DRA. ELISA SÉRRIERE ZARAGOZA,  
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO



## Resumen

La perlicultura es hoy en día una de las actividades acuaculturales más rentables en todo el mundo. En México, esta industria se puede considerar incipiente, pero con alto potencial de crecimiento. A pesar de ello, el manejo de las ostras perleras en lo que respecta a técnicas de implante de perla libre (esférica) está sujeto a altas tasas de mortalidad por manejo (~50%), bajas tasas de aceptación de implantes (~35%) y elevadas tasas de rechazo de éstos (~60%). Ello se debe, en gran medida, a que se desconoce el efecto real que tiene el manto proveniente de una ostra donante sobre la hematopoyesis y fisiología de las ostras receptoras. De junio del 2008 a Enero del 2009, se recolectaron mensualmente 15 organismos de concha nácar *Pteria sterna* con una talla comercial de injerto (50 a 80 mm de altura de la concha), los cuales fueron anestesiados y divididos en tres grupos experimentales para ser injertados con: A) Grupo testigo, sin injertar; B) manto proveniente de un organismo donador; y C) manto proveniente del mismo organismo a injertar. Utilizando las técnicas de injerto originales propuestas por Kokichi Mikimoto, adaptadas en la granja “Perlas del Cortez” para la especie *P. sterna*. La respuesta inmune y la formación del saco perlero se evaluaron a partir de la actividad hemocítica, utilizando el método propuesto por Suzuki y Awaji, utilizando EdU (5-etinil-2-desoxiuridina) y por medio de inmunocitoquímica y microscopía de fluorescencia. El efecto del injerto de manto en el ciclo reproductivo se analizó mediante técnicas histológicas y bioquímicas para determinar el desarrollo de la gónada y composición de proteínas, glucógeno, lípidos y triglicéridos de la gónada y tejidos somáticos. Para ello, se partió del antecedente de que el manto, al ser colocado cerca de la gónada como parte de la técnica rutinaria de injerto, promueve una maduración acelerada de los organismos, mediante un flujo continuo de energía de los tejidos de reserva (músculo aductor y/o glándula digestiva) hacia la gónada. Los resultados de la respuesta inmune de las ostras mostraron diferencias significativas entre los grupos, obteniendo un menor número de hemocitos en el grupo al que se injertó con manto propio. Adicionalmente, la mortalidad fue baja (50%) en dicho grupo. La tasa de aceptación de núcleos fue elevada (35%) en ambos grupos, pero especialmente en el grupo donde se injertó manto de un donador. De igual forma se puede observar una diferencia entre los tratamientos en respuesta al efecto del injerto de manto, en el número de hemocitos, siendo el tratamiento al que se le injertó manto propio el que presenta el menor número en todos los meses de muestreo, es este mismo tratamiento el que presenta una proliferación celular más acelerada y una mejor respuesta y aceptación al injerto de manto. Estos resultados son un indicador de que el origen del manto es determinante en la hematopoyesis, la formación del saco perlero y el desarrollo y composición de tejidos somáticos y germinales.

**Palabras clave:** Ostras perleras, Hematopoyesis, Fisiología reproductiva.

Vo. Bo.



---

Dr. Pedro E. Saucedo Lastra

Director de Tesis

## ABSTRACT

### EFFECT OF SAIBO-GRAFTING ON IMMUNE RESPONSE AND REPRODUCTIVE PHYSIOLOGY IN PACIFIC-WINGED PEARL OYSTER *Pteria sterna*

Raising pearl oysters is one of the leading aquaculture industries worldwide. In Mexico, this industry is currently in an early stage of development, but has high potential in the northwestern area using the Pacific winged-oyster *Pteria sterna*. So far, the technique for inducing round pearl formation generates a relatively high die-off from handling (~50%), low rates of bed retention (~35%), and high rates of bed rejection (~60%). This likely occurs because the real effects of grafting mantle tissue (saibo) from a donor oyster are unknown, particularly on immune response (hematopoiesis) and physiology of the receptor oysters. From June 2008 through January 2009, 15 oysters of commercial size (50–80 cm shell height) were collected monthly, anesthetized, and divided into three experimental groups. The no-saibo was the control group; saibo from a donor oyster was the second group; and saibo from itself was the third group. The techniques for saibo-grafting are similar to those used in pearl oyster culturing worldwide, but were adapted at the commercial venture 'Perlas del Cortez' in Bahía de La Paz for *P. sterna*. The immune response and process of pearl-sac formation were measured with the method of Suzuki & Awaji, but modified to use EdU (5-ethynyl-2-deoxyuridine) as the colorimetric reagent for immuno-cytochemistry and fluorescence microscopy. The effect of saibo-grafting on gonad development and protein, glycogen, total lipid, and triglyceride composition of the gonad and somatic tissues (digestive gland, adductor muscle, and mantle tissue) was measured by conventional histological and biochemical techniques. Both methods are based on the report that oysters placed with a saibo near the gonad were in better reproductive condition (faster gonad development, more postvitellogenic oocytes, higher protein, lipid, and triglyceride contents in the gonad, lower protein and glycogen contents in the adductor muscle) than oysters without a saibo. They show that the immune response of oysters varied significantly between groups; specimens receiving its own saibo produced less hemocytes than those from the other groups. Additionally, mortality was lower (50%) in this group. Bed retention showed a fluctuating trend over time, but was higher (35%) in both groups, but especially among oysters that received saibo from a donor. Similarly a difference between the treatments as answer in order of mantle graft, in the number of hemocytes, was observed, being the treatment of saibo from itself which presents the minor number, in every month of sampling, otherwise this treatment displays an accelerated cellular proliferation and one better answer and acceptance to the mantle graft. These results are an indicator that the origin of the saibo has a key role on immune response, pearl-sac formation, and development and composition of germinal and somatic tissues.

**Key words:** Pearl oysters, Haematopoyesis, Reproductive physiology.

## Dedicatoria

*A Nelly, porque me enseñó que no importa que tanto ni que tan bajo caigas, siempre puedes levantarte y seguir adelante.*

*A Lupita, porque sin su amor incondicional, apoyo, enseñanzas y su ejemplo no sabría que tan glorioso es el ser humano.*

*A Jovita, porque gracias a ella, aprendí que no hay nada más importante en esta vida que el amor.*

*A mis Padres, por todo su amor y por enseñarme a tomar mis propias decisiones.*

*A Emma, por su amor, apoyo, porque me ha enseñado como afrontar la vida y los problemas con una sonrisa, además del camino hacia la verdad y sobre todo por que me ha enseñado que puedo ser Ilimitado.*

## Agradecimientos

A mi familia por el apoyo que me han brindado, Mis Abuelas, Padres, Tíos Tías y Primos.

Agradezco a CONACYT por la beca otorgada para la realización de este estudio (Becario No. 206616).

Agradezco a esas hermosas mujeres que trabajan en Posgrado Lety, Osve, Betty, Clau y que siempre se preocupan por nosotros y nos ayudan constantemente.

A mis maestros por la formación que me dieron A mis compañeros de clase.

A todos aquellos que colaboraron en la elaboración de este trabajo: Javier Cortez, Jonhy, Horacio, Mario, Carmen Jaramillo, Carmen Suárez, Arturo Sierra.

Agradezco a todas aquellas personas que confiaron en mí y me apoyaron, pero agradezco aun más a todas las que dudaron de mí y de mis capacidades, a todas aquellas que me dieron la espalda, ya que gracias a ellas he llegado hasta aquí y he aprendido que no hay límites en esta vida.

Al Dr. Pedro E. Saucedo Lastra (Director de esta tesis) por su infinita paciencia, por sus sabios consejos y por su eterna ayuda, Pedro te agradezco pues has sido un gran maestro y una de las personas que más me han ayudado a mi desarrollo personal y espiritual, gracias a ti he aprendido a ser mas paciente y tolerante, me has enseñado que la soberbia no deja nada bueno y perjudica mas de lo que ayuda, he aprendido el significado de la perseverancia (es el mejor habito), pero sobre todo te agradezco por que gracias a ti he alcanzado a ver hasta donde llegan mis limites y más aun, que es en lo que debo de trabajar para seguir creciendo.

Mis asesores Dr. Ángel Campa y Dr. Carlos Cáceres por la paciencia y los consejos que me brindaron.

Finalmente (y no menos importantes) agradezco a mi Hermano Jorge Iván, mi cuñada Lizbeth Mariana y mi sobrina Teresita por toda la ayuda y los consejos que me han brindado, a mis amigos que siempre estuvieron para apoyarme, Masso, Sergio, Omar, Emilie, Isa, Timón y a los que no nombre una disculpa, pero les agradezco eternamente.....

Agradezco a mi “NOVIA” Marxe por ser tan linda conmigo, por ayudarme a terminar con este trabajo y con los últimos muestreos, por soportar las horas mas críticas de este trabajo, mi mal genio y simplemente por estar Te AMO.

Finalmente quiero agradecer a todas esas personas que me han alimentado y ayudado a sobrevivir durante este periodo extra, Liz, Bonjii, Marxe, mi suegra Laura y mi familia.

## Contenido

1. Introducción .....	1
2. Antecedentes .....	5
2.1 Situación actual de la Perlicultura en el Mundo .....	5
2.2 Situación actual de la Perlicultura en México .....	9
2.3 Estudios sobre las funciones e importancia del manto .....	11
3. Justificación .....	14
4. Hipótesis .....	15
5. Objetivos .....	16
5.1 Objetivo General .....	16
5.2 Particulares .....	16
6. Materiales y métodos .....	17
6.1. Obtención de organismos .....	17
6.2. Diseño experimental .....	17
6.3. Análisis ambiental .....	19
6.4. Efecto del injerto de manto sobre la respuesta inmune de los organismos.....	20
6.4.1. Hematopoyesis .....	20
6.4.2 Proliferación celular y formación del saco perlero .....	21
6.5. Efecto del injerto de manto en la composición bioquímica de los organismos	23
6.5.1. Evaluación del desarrollo gonadico .....	23
6.5.2. Determinación de la composición bioquímica .....	23
6.6. Efecto del injerto de manto en las tasas de aceptación/rechazo de implantes y mortalidad de los organismos .....	25
6.7. Análisis Estadístico .....	26
7. Resultados .....	27
7.1. Distribución de los datos .....	27
7.2. Parámetros Ambientales .....	29
7.3 Efecto del injerto de manto en la respuesta inmune .....	31
7.3.1. Hematopoyesis .....	31
7.3.2. Proliferación celular y formación del saco perlero .....	41
7.4 Efecto del injerto de manto en la Fisiología Reproductiva .....	46
7.4.1. Desarrollo de la gónada .....	46

7.4.2. Composición de la gónada y tejidos somáticos .....	52
7.5 Efecto del injerto de manto en la tasa de mortalidad y aceptación/rechazo de implantes.....	61
7.5.1. Mortalidad.....	61
7.5.2. Tasa de aceptación/rechazo .....	64
8. Discusión .....	65
8.1. Efecto del injerto de manto en la respuesta inmune .....	65
8.2. Efecto del injerto de manto en la fisiología reproductiva.....	74
9. Conclusiones.....	82
10. Perspectivas .....	83
11. Referencias bibliográficas.....	84

## Lista de Figuras

- Figura 1.** Distribución de hemocitos, a partir de una prueba t-student, para el grupo testigo, durante los meses comprendidos entre junio a diciembre 2008..... **27**
- Figura 2.** Distribución de hemocitos, a partir de una prueba t-student, para el tratamiento al que se injertó manto de un donador común durante los meses comprendidos entre junio a diciembre 2008..... **28**
- Figura 3.** Distribución de hemocitos, a partir de una prueba t-student, para el tratamiento al que se injertó manto propio, durante los meses comprendidos entre junio a diciembre 2008. .... **28**
- Figura 4.** Variaciones en la temperatura del agua en las instalaciones submarinas de la empresa Perlas del Cortez, durante los meses comprendidos entre junio a diciembre 2008. .... **29**
- Figura 5.** Variaciones en la salinidad del agua en las instalaciones submarinas de la empresa Perlas del Cortez, durante los meses comprendidos entre junio a diciembre 2008. .... **30**
- Figura 6.** Variaciones en la concentración de oxígeno disuelto del agua en las instalaciones submarinas de la empresa Perlas del Cortez, durante los meses comprendidos entre junio a diciembre 2008..... **30**
- Figura 7.** Variaciones en el número de hemocitos de los organismos de concha nácar *Pteria sterna* pertenecientes a los tres tratamientos experimentales. .... **31**
- Figura 8.** Variaciones mensuales en el número de hemocitos de los organismos de concha nácar *Pteria sterna* durante los meses comprendidos entre junio a diciembre 2008. .... **32**
- Figura 9.** Variaciones en el número de hemocitos en los días sucesivos a la realización de los injertos en los organismos de concha nácar *Pteria sterna* durante los meses comprendidos entre junio a diciembre 2008..... **33**
- Figura 10.** Relación de la temperatura del agua con el número de hemocitos presentes en los organismos de concha nácar *Pteria sterna* del grupo control durante los meses comprendidos entre junio a diciembre 2008..... **34**

<b>Figura 11.</b> Corte transversal de gónada de organismos de concha nácar <i>Pteria sterna</i> del grupo control (de izquierda a derecha 10X, 20X y 100X). Se observa la presencia de numerosos hemocitos inmersos alrededor de la gónada. (Tc= Tejido conectivo; Hm= Hemocitos; Cc= Células cafés).....	<b>35</b>
<b>Figura 12.</b> Relación de la temperatura del agua con el número de hemocitos presentes en los organismos de concha nácar <i>Pteria sterna</i> del tratamiento al que se le injertó manto de un organismo común, durante los meses comprendidos entre junio a diciembre 2008. ....	<b>36</b>
<b>Figura 13.</b> Corte transversal de gónada de los organismos de concha nácar <i>Pteria sterna</i> .del tratamiento al que se injertó manto de un donador común (de izquierda a derecha 10X, 20X y 100X), en donde no hubo diferenciación de sexos (Tc= Tejido conectivo; Hm= Hemocitos).....	<b>36</b>
<b>Figura 14.</b> Relación de la temperatura del agua con el número de hemocitos presentes en los organismos de concha nácar <i>Pteria sterna</i> para el tratamiento al que se le injertó manto propio durante los meses comprendidos entre junio a diciembre 2008. ....	<b>37</b>
<b>Figura 15.</b> Corte transversal de gónada de los organismos de concha nácar <i>Pteria sterna</i> del tratamiento al que se injertó manto propio (de izquierda a derecha 10X, 20X y 100X), donde tampoco hubo diferenciación de sexos (Ad= Adenomero; Tc= Tejido conectivo; Hm= Hemocitos). ....	<b>38</b>
<b>Figura 16.</b> Respuesta de los organismos de concha nácar <i>Pteria sterna</i> , ante el acetato de fluoresceína; el pozo A corresponde al grupo en que se inyectó el colorante en el músculo, el pozo B corresponde al grupo que se inyectó colorante en la gónada. ....	<b>38</b>
<b>Figura 17.</b> Corte transversal de músculo aductor de los organismos de concha nácar <i>Pteria sterna</i> inyectados con acetato de fluoresceína.en músculo aductor. A la derecha corte a 10X en campo claro, y a la izquierda corte a 10X campo fluorescente. (Msc= músculo,).....	<b>39</b>
<b>Figura 18.</b> Corte transversal de de músculo aductor de los organismos de concha nácar <i>Pteria sterna</i> inyectados con acetato de fluoresceína.en gónada. A la derecha corte a 10X en campo claro, y a la izquierda corte a 10X campo fluorescente. (Msc= músculo,).....	<b>39</b>

- Figura 19.** Corte transversal de glándula digestiva de los organismos de concha nácar *Pteria sterna* inyectados con acetato de fluoresceína en músculo aductor. A la derecha corte a 40X en campo claro, y a la izquierda corte a 40X campo fluorescente (Tc= Tejido conectivo, Ad= Adenómero)..... **40**
- Figura 20.** Corte transversal de glándula digestiva de los organismos de concha nácar *Pteria sterna* inyectados con acetato de fluoresceína en gónada. A la derecha corte a 40X en campo claro, y a la izquierda corte a 40X campo fluorescente (Tc= Tejido conectivo, Ad= Adenómero)..... **40**
- Figura 21.** Corte longitudinal a 40X de gónada de organismos de concha nácar *Pteria sterna* injertados con manto propio y teñidos con Edu, campo claro izquierda y la señal fluorescente de las células en proliferación (derecha) (Tc= Tejido conectivo, Tg= Tejido gonádico)..... **41**
- Figura 22.** Corte longitudinal a 40X de manto de organismos de concha nácar *Pteria sterna* injertados con manto de un donador común y teñidos con Edu, campo claro (izquierda) y la señal fluorescente de las células en proliferación (derecha) (Mn= Manto)..... **42**
- Figura 23.** Corte longitudinal a 40X de glándula digestiva de organismos de concha nácar *Pteria sterna* del grupo control y teñidos con Edu, campo claro (izquierda) y la señal fluorescente de las células en proliferación (derecha) (Ad= Adenómero, Tc= Tejido conectivo)..... **42**
- Figura 24.** Corte longitudinal a 40X de manto de los organismos de concha nácar *Pteria sterna* injertados con manto de donador común (izquierda) y para organismos injertados con manto propio (derecha) teñidos con Edu. (Mn= Manto, Tc= Tejido conectivo)..... **43**
- Figura 25.** Corte longitudinal a 20X de manto de los organismos de concha nácar *Pteria sterna* del grupo control, teñido con Edu, (Mn= Manto, Tc= Tejido conectivo)..... **44**
- Figura 26.** Corte longitudinal a 20X de gónada de los organismos de concha nácar *Pteria sterna* injertados con manto de donador común (izquierda) y para organismos injertados con manto propio (derecha) teñidos con Edu. (Tg= Tejido gonádico)..... **44**

<b>Figura 27.</b> Corte longitudinal a 20X de gónada de los organismos de concha nácar <i>Pteria sterna</i> .del grupo control, teñido con Edu, (Tg= Tejido gonádico). .....	<b>45</b>
<b>Figura 28.</b> Proporción de sexos de los organismos de concha nácar <i>Pteria sterna</i> del grupo control durante los meses comprendidos entre junio a diciembre 2008.....	<b>46</b>
<b>Figura 29.</b> Fases de desarrollo gonádico de los organismos de concha nácar <i>Pteria sterna</i> del grupo control durante los meses comprendidos entre junio a diciembre 2008 (MAD= Madurez, POS= Postdesove, IND= Indiferenciados) .....	<b>47</b>
<b>Figura 30.</b> Corte transversal de gónada a 10X de los organismos de concha nácar <i>Pteria sterna</i> del grupo control (MAD= Madurez, POS= Postdesove, IND= Indiferenciados, ac= acino).....	<b>47</b>
<b>Figura 31</b> Proporción de sexos de los organismos de concha nácar <i>Pteria sterna</i> injertados con manto de donador común durante los meses comprendidos entre junio a diciembre 2008. ....	<b>48</b>
<b>Figura 32.</b> Fases de desarrollo gonádico de los organismos de concha nácar <i>Pteria sterna</i> injertados con manto de un donador común, durante los meses comprendidos entre junio a diciembre 2008 (MAD= Madurez, POS= Postdesove, IND= Indiferenciados).....	<b>49</b>
<b>Figura 33.</b> Corte transversal de gónada a 10X de los organismos de concha nácar <i>Pteria sterna</i> del tratamiento al que se injertó manto de un donador común (MAD= Madurez, POS= Postdesove, IND= Indiferenciados, ac= acino cc= Células cafés). .....	<b>50</b>
<b>Figura 34.</b> Proporción de sexos de los organismos de concha nácar <i>Pteria sterna</i> del tratamiento al que se le injertó manto del mismo organismo durante los meses comprendidos entre junio a diciembre 2008.....	<b>50</b>
<b>Figura 35.</b> Fases de desarrollo gonádico de los organismos de concha nácar <i>Pteria sterna</i> del tratamiento al que se le injertó manto propio, durante los meses comprendidos entre junio a diciembre 2008 (MAD= Madurez, POS= Postdesove, IND= Indiferenciados).....	<b>51</b>
<b>Figura 36.</b> Corte transversal de gónada a 20Xde los organismos de concha nácar <i>Pteria sterna</i> del tratamiento al que se le injertó manto propio (MAD= Madurez, POS= Postdesove, IND= Indiferenciados, ac= acino cc= Células cafés). ....	<b>52</b>

<b>Figura 37.</b> Variaciones mensuales en el contenido promedio de carbohidratos, proteínas, lípidos y triglicéridos del manto de organismos de <i>P. sterna</i> para los tres tratamientos experimentales durante el periodo comprendido entre agosto a diciembre 2008 (Don= tratamiento injertado con manto de donador común; Pro= tratamiento injertado con manto propio; Test= grupo control.....	<b>54</b>
<b>Figura 38.</b> Variaciones mensuales en el contenido promedio de carbohidratos, proteínas, lípidos y triglicéridos del músculo de organismos de <i>P. sterna</i> para los tres tratamientos experimentales durante el periodo comprendido entre agosto a diciembre 2008 (Don= tratamiento injertado con manto de donador común; Pro= tratamiento injertado con manto propio; Test= grupo control.....	<b>56</b>
<b>Figura 39.</b> Variaciones mensuales en el contenido promedio de carbohidratos, proteínas, lípidos y triglicéridos del glándula digestiva de organismos de <i>P. sterna</i> para los tres tratamientos experimentales durante el periodo comprendido entre agosto a diciembre 2008 (Don= tratamiento injertado con manto de donador común; Pro= tratamiento injertado con manto propio; Test= grupo control.....	<b>58</b>
<b>Figura 40.</b> Variaciones mensuales en el contenido promedio de carbohidratos, proteínas, lípidos y triglicéridos de la gónada de organismos de <i>P. sterna</i> para los tres tratamientos experimentales durante el periodo comprendido entre agosto a diciembre 2008 (Don= tratamiento injertado con manto de donador común; Pro= tratamiento injertado con manto propio; Test= grupo control.....	<b>60</b>
<b>Figura 41.</b> Variaciones en la tasa de mortalidad de organismos de <i>P. sterna</i> de los tres tratamientos experimentales durante el periodo comprendido entre agosto a diciembre 2008. ....	<b>61</b>
<b>Figura 42.</b> Variaciones en la tasa de mortalidad de los tres tratamientos experimentales durante los días del mes de diciembre 2008. ....	<b>63</b>
<b>Figura 43.</b> Variaciones en las tasas de aceptación/rechazo de los dos tratamientos a los que se injertó manto, durante el periodo comprendido entre agosto a diciembre 2008. ....	<b>64</b>

## Lista de Tablas

<b>Tabla I.</b> Comparación entre las dos empresas dedicadas al cultivo de perlas y ostras perleras en México.....	<b>10</b>
<b>Tabla II.</b> Análisis de Tukey para identificación de grupos homogéneos y heterogéneos de medias para el conteo de hemocitos en los diferentes tratamientos experimentales de injerto de concha nácar <i>P. sterna</i> .....	<b>31</b>
<b>Tabla III.</b> Análisis de Tukey para identificación de grupos homogéneos y heterogéneos de medias pertenecientes al conteo de hemocitos para los meses en que se realizó el estudio. ....	<b>32</b>
<b>Tabla IV.</b> Análisis de Tukey para identificación de grupos homogéneos y heterogéneos de medias pertenecientes al conteo de hemocitos, para todos los días en que se extrajeron dichos hemocitos. ....	<b>34</b>
<b>Tabla V.</b> Análisis de Tukey para identificación de grupos homogéneos y heterogéneos de medias pertenecientes al contenido total de proteínas de la glándula digestiva de los tres tratamientos experimentales. ....	<b>58</b>

## 1. Introducción

El cultivo de ostras perleras (nacaricultura) y perlas (perlicultura) representan hoy en día dos de las actividades acuícolas más rentables en todo el mundo, ya que la práctica de estas actividades genera una gran entrada de divisas a países como Indonesia, Filipinas, India, Tailandia, Japón, Polinesia Francesa y Australia (Southgate, 2008). En muchos de estos países, la industria perlera se encuentra muy arraigada y bien establecida, gracias a los trabajos que se han realizado con especies como *Pinctada margaritifera* (Mediterráneo y Océano Pacífico Sur), *P. maxima* (Australia y Océano Índico) y *P. fucata martensii* (Japón) (Monteforte, 1996; Southgate, 2008; Gómez-Robles y Saucedo, 2009). Muchos de estos trabajos han permitido conocer el ciclo de vida completo de las especies, así como sus necesidades y requerimientos particulares para el cultivo en campo y laboratorio, con el fin de obtener una producción constante de organismos para apoyar la producción continua de perlas (Fassler, 1995).

Por otro lado, en lo que respecta a la producción perlera del Pacífico americano, donde la industria perlera no está tan arraigada ni establecida, su desarrollo promete tener gran impacto, debido a que en estos lugares se encuentran dos especies de ostras perleras *P. mazatlanica* (comúnmente llamada madreperla) y *Pteria sterna* (o concha nácar). Estas especies se distribuyen desde el alto Golfo de California, México hasta Perú (Sevilla, 1969; Keen, 1979; Gervis y Sims, 1992). Sin embargo, las ostras perleras son un recurso que se ha sobreexplotado en el Golfo de California por más de 400 años (Cariño y Monteforte, 1995; Cariño y Alameda, 1998), provocando que ambas especies se encontraran cerca de los años 1940's en la categoría de especies "En Peligro de Extinción" (Diario Oficial de la Federación, 1939), aunque hoy en día han ascendido a

la categoría de especies bajo “Protección Especial” (Diario Oficial de la Federación, 1994).

Posterior a este decreto, se intentó retomar la actividad de producción de perlas, a partir del desarrollo de proyectos prioritarios, en los cuales el objetivo principal se centró en la aplicación de técnicas y tecnologías extranjeras para el cultivo de madreperla (*P. mazatlanica*) y concha nácar (*P. sterna*) (Martínez-Quñonez y Gueorguiev-Nikolov, 2001; Cáceres-Puig *et al.*, 2009). Sin embargo, el desconocimiento de la biología de las especies nativas, aunado a la falta de aplicación de programas de índole conservacionista y desarrollo sustentable provocó el fracaso de estos proyectos (Dr. Felix Pico, com. pers.). Sin embargo, todo esto promovió a su vez que las principales instituciones de educación superior e investigación del Golfo de California, como el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), la Universidad Autónoma de Baja California Sur (UABCS) y el Instituto Tecnológico de Estudios Superiores de Monterrey (ITESM), comenzaran a invertir esfuerzos y recursos para el desarrollo de la tecnología para el cultivo de ostras perleras y la producción de perlas a nivel piloto (Monteforte, 1990, 1991; Cáceres-Martínez *et al.*, 1992; Gaytán-Mondragón *et al.*, 1993; Monteforte y García-Gasca, 1994; Rangel- Dávalos y Chávez-Villalba, 1994; Monteforte *et al.*, 1995; Monteforte, 1996; McLaurin-Moreno *et al.*, 1997, 1998; Saucedo, 2001).

Es gracias a este tipo de trabajos que existe a la fecha un gran adelanto científico y tecnológico en materia de colecta de semilla del medio (Cáceres *et al.*, 1992; Monteforte y García-Gasca, 1994; Monteforte *et al.*, 1995), preengorda temprana de juveniles (Aldana-Avilés, 1998; Monteforte y Morales-Mulia, 2000), cultivo tardío de adultos hasta talla comercial (Gaytán-Mondragón *et al.*, 1993; Monteforte *et al.*, 2005),

producción de medias perlas a nivel piloto (Monteforte *et al.*, 1994; Monteforte *et al.*, 1996; Rangel-Dávalos y Cáceres-Martínez, 1994), así como de otros aspectos de la ecología de la colecta y el cultivo (Wright-López, 1997; Bervera-León, 2002). Aunque el desarrollo de tecnología para el cultivo en laboratorio de las ostras perleras ha sido de naturaleza más escasa y discontinua (Araya-Núñez *et al.*, 1991, 1995; McAnally-Salas y Valenzuela-Domínguez, 1990; Serrano-Salinas y Guzmán, 1993), en fechas recientes se ha avanzado más en la optimización de dicha tecnología, tanto en la UABCS (Martínez-Fernández *et al.*, 2004), como en el CIBNOR (Saucedo 2006; Saucedo *et al.*, 2005; Saucedo *et al.*, 2007).

Actualmente, en el Noroeste de México existen dos compañías comerciales productoras de perlas, la más grande y antigua localizada en Guaymas, Sonora (antes Perlas del Mar del Cortés S.A de C.V. ahora Perlas Únicas S.A. de C.V.) y la mas reciente y pequeña en la Bahía de La Paz, B.C.S. (Perlas del Cortez S. de R.L. MI.). Ambas cultivan la concha nácar *P. sterna* a escala comercial y la madreperla *P. mazatlanica* a escala piloto y obtienen perlas de alta calidad y reconocimiento internacional a partir de ambas especies (Kiefert *et al.* 2004).

La industria perlera en esta región aún se puede considerar incipiente, pero con alto potencial de crecimiento (Gervis y Sims, 1992; Fassler, 1995; Kiefert *et al.*, 2004). A la fecha, el manejo de las especies en lo que respecta a técnicas de implante de perla libre (esférica) está sujeto a altas tasas de mortalidad por manejo (~50%), bajas tasas de aceptación del implantes (~35%) y elevadas tasas de rechazo de éstos (~60%). Lo anterior representa un gran problema para la perlicultura comercial, debido a los altos costos asociados al manejo. En la Bahía de la Paz, las técnicas de implante utilizadas con la especie de mayor importancia (*P. sterna*, Gould, 1851) no han sido aún

estandarizadas y se requiere realizar mayor investigación científica que permita lograr lo anterior, considerando las diferencias en anatomía que posee esta especie con respecto a la madreperla (Saucedo y Southgate, 2008). Al respecto, se sabe que existen variables que determinan la aceptación y/o rechazo del implante, así como la formación del saco perlero, y por ende de la perla. Muchas de las características que determinarán la calidad de la perla incluyen la talla del organismo a recibir el implante, su edad y estadio reproductivo, la época del año, la calidad del manto implantado, respuesta hematopoyética, el tamaño del núcleo y además la capacidad del implantador para disminuir el daño producido por la operación (Ellis y Haws, 1999; Southgate, 2008).

Con base en lo anterior, la generación de información científica en la que se tomen en cuenta aspectos de la anatomía, fisiología reproductiva y ecología de la especie en cuestión (*P. sterna*) redundara en beneficios al disminuir las tasas de mortalidad y rechazo de implantes durante el proceso de formación del saco perlero, permitiendo así implementar un plan de manejo adecuado para la producción de perlas en la Bahía de La Paz.

## 2. Antecedentes

### 2.1 Situación actual de la Perlicultura en el Mundo

En general, la perlicultura se considera una de las industrias más rentables del mundo, debido a que presenta características muy particulares, como el hecho que el aprovechamiento de las especies que se utilizan es integral. Por ejemplo, se puede comercializar el músculo aductor que representa una fuente de alimento (aunque este no es el fin último de las ostras perleras), considerado un producto “gourmet” en el mercado extranjero asiático (Gruet, 1992; Matlins, 1995). Aunado a esto, la concha se puede utilizar como objeto de ornato (concha pulida y esmerilada) o bien destinarse a la fabricación de molduras, para trabajos de joyería fina con engarzados en oro, plata y con incrustaciones de piedras preciosas (Monteforte, 1990, 1991). El nácar, por su parte es utilizado en la industria cosmética para la elaboración de cremas de belleza de todo tipo. Incluso, en los últimos años el nácar ha comenzado a aprovecharse en la industria biomédica europea para elaborar polvo de nácar que favorece la reconstrucción de huesos rotos, el arreglo de defectos óseos diversos y la regeneración de la médula espinal, entre otras cosas (Atlan *et al.*, 1997; Lamghari *et al.*, 1999; Pereira-Mouries *et al.*, 2002; Ojeda-Ramírez, 2007).

Por sí sola, una perla es una de las gemas más finas que existe en la naturaleza y es producida de manera natural por los moluscos, particularmente los bivalvos. Sin embargo, solo unas cuantas familias producen perlas de valor comercial, entre las cuales los miembros de la familia Pteriidae revisten especial importancia. De estos, los géneros *Pinctada* y *Pteria* son los más importantes productores a nivel mundial (Fassler, 1991, 1995; Monteforte, 1991, 1996; Saucedo, 1995; Saucedo, 2001; Landman *et al.*, 2001; Haws, 2002; Cáceres-Puig *et al.*, 2009).

De las diversas especies pertenecientes a la familia Pteriidae que existen en todo el mundo, actualmente se utilizan 7 especies para la producción de perlas: 5 del género *Pinctada* y 2 del género *Pteria* (Fassler 1991, 1994, 1995; Shirai 1994). De todas, las tres más importantes son:

*P. fucata martensi*: Productora de las Akoya Pearls en Japón (comercial a gran escala) y China (comercial a gran escala y alto rendimiento). Su comercialización inundó el mercado perlero entre los años 1950 y 1980 actualmente producen el 95 % de las perlas que se cultivan en el mundo (Pearl Oyster Information Bulletin, 2008).

*P. margaritifera cumingi*: Productora de las Black-Pearls en Polinesia Francesa (comercial de alto rendimiento), Islas Cook (comercial moderado) y algunas islas del Pacífico Central (iniciando). Este tipo de perlas comenzaron a introducirse en el mercado perlero entre los años 1980 y 1990.

*P. maxima*: Productora de las South-Sea Pearls en el Norte y noroeste de Australia (comercial de alto rendimiento), Indonesia (comercial moderado), Malasia (comercial moderado en inicio), Myanmar (comercial moderado) y Filipinas (comercial de alto rendimiento). Son las de más reciente incorporación a los mercados internacionales alrededor de los años 1990 en adelante.

Otras especies de ostras perleras de menor importancia, pero que también producen perlas de buena calidad a escala piloto incluyen:

*P. fucata*: Costa de Tamil-Nadu en India (comercial moderado).

*P. mazatlanica*: Produce perlas de 11–13 mm de diámetro en colores uniformes grisáceos, verdosos, rosáceos, etc. en México (comercial moderado).

*P. penguin*: Produce perlas pero principalmente mabes generalmente de talla grande (entre 13 y 18 mm de diámetro, a veces hasta 20 mm) y pueden implantarse, en

función del tamaño del núcleo y el del individuo que reciba los implantes, hasta 5 núcleos por Ostra, en Japón y Tailandia (comercial moderado, exclusivamente Mabé).

*P. sterna*: Produce perlas, aunque principalmente se utilizan para la producción de mabes las cuales son generalmente de talla grande (entre 13 y 18 mm de diámetro, a veces hasta 20 mm), en México (comercial iniciando).

Las perlas que se producen por las especies arriba descritas varían en función de las siguientes características:

Las “Akoya” de *P. fucata martensii*: Especie pequeña del Japón de 6 a 8 cm de altura de la concha). Son perlas pequeñas (7 mm de diámetro como máximo), esféricas, de color blanco o teñidas, generalmente de baja calidad (capa de nácar raramente sobrepasa 0.8 mm de espesor). Su precio de venta oscila entre 6 y 12 USD por pieza en lote. Japón retiene el monopolio de esta producción, y reporta beneficios anuales producto de exportación por más de 500 millones de U.S.D (Fassler, 2004; Pearl Oyster Information Bulletin, 2008).

Las “Black South Sea Pearls” de *P. margaritifera* (principalmente de la variedad *cumingi*), especie que mide hasta 22–25 cm de altura de la concha. Se producen en cantidad moderada en Polinesia Francesa y en las Islas Cook y Marshall. Son grandes (entre 12 y 16 mm de diámetro, con una capa de nácar de hasta 3 mm de espesor), principalmente de color gris a gris oscuro en ocasiones tornasol. Esféricas, sub-esféricas o barrocas, de alta calidad. Con un precio de 100 USD por pieza en 1993, y se ha reportado la venta de algunas gemas hasta en 4,000 USD por pieza. Polinesia Francesa sostiene una producción de exportación de perlas por más de 150 millones de USD anuales (Gruet, 1992; Monteforte, 2003; Fassler, 2004).

Las “Golden South Sea Pearls” de *P. maxima*, especie que puede alcanzar hasta 30 cm de altura de la concha). Se producen moderadamente en el norte y noroeste de Australia, en algunas islas de Filipinas, y en algunas granjas del Archipiélago Malayo. Son perlas de gran tamaño (entre 14 y 18 mm de diámetro o mayores, con más de 2.5 mm de espesor). El color dominante es blanco nacarado y plateado brillante, con tonos secundarios en dorado (muy cotizados), son de forma esférica a semi-barroca, y de alta calidad. Su precio de venta promedio alcanzó los 250 USD por pieza en 1994, con precios individuales (gemas) mayores de 5,000 USD Únicamente las granjas perleras del noroeste de Australia reportan producciones superiores a 85 millones de USD anuales (Doumenge, 1992; Gruet, 1992; Pearl Oyster Information Bulletin, 2008).

Las “ Biwa” o perlas de río, también llamadas “perlas de arroz”, producto de algunos bivalvos de la familia Unionidae (almejas de agua dulce de hasta 18 cm de altura), las cuales producen perlas en grandes cantidades, principalmente en China y Estados Unidos y un poco menos en Japón. Son perlas muy pequeñas (10 mm), de color blanco o teñido, con formas barrocas, y generalmente de baja calidad. Se venden por peso a precios entre 85 y 150 USD/kg (Gruet, 1992; Monteforte, 2003; Fassler, 2004).

Las “Keshi”, también conocidas como perlas sin núcleo, se producen principalmente en Polinesia Francesa con *P. margaritifera cumingi* y en menor grado en Australia con *P. maxima*. Se forman a partir del tejido de injerto, cuando se rechaza el núcleo del injerto, aunque también puede inducirse *ex profeso* insertando varios trozos de manto. Son de tamaño variable (raramente mayores 10–12 mm) y formas muy barrocas, su color es muy similar al de las perlas libres que produce cada especie. Ocupan un mercado secundario y su precio es relativamente menor, ya que para una Keshi de calidad promedio (aprox. 7–8 mm de diámetro) es de 30 a 40 USD siendo su

valor promedio de 10 a 15 USD (Doumenge, 1992; Monteforte, 2003; Pearl Oyster Information Bulletin, 2008)).

Las “Mabé” o medias-perlas se producen en Australia con *P. maxima*, en Polinesia Francesa con *P. margaritifera cumingi* y en Japón y Tailandia con *P. penguin*. Son generalmente de gran tamaño (13 y 18 mm de diámetro, a veces hasta 20 mm) y su forma depende de la forma del núcleo (medias esferas,  $\frac{3}{4}$  de esfera, óvalos, estrellas, letras, etc.). El precio de venta varía entre 35 y 75 USD por pieza trabajada, aunque es común encontrar piezas de especial calidad por precios mayores de 200 USD (Doumenge, 1992; Gruet, 1992; Monteforte, 2003).

## **2.2 Situación actual de la Perlicultura en México**

Al igual que en otras partes del mundo, como Japón, el desarrollo de la perlicultura en México, particularmente en la región Noroeste y la zona de la Bahía de la Paz, se ha enfrentado al problema de la sobreexplotación de los bancos naturales y disminución de la abundancia en éstos debido a la ausencia de programas de desarrollo sustentables y de índole conservacionista (Monteforte, 1996; Saucedo, 2001), así como a la utilización de técnicas de injerto importadas de otras especies y no adaptadas a las especies nativas mexicanas, de acuerdo a su anatomía particular (Monteforte, 1990, 1991, 1996; Saucedo, 2001). Por ello, uno de los principales objetivos de los estudios relacionados con nacaricultura y perlicultura se centran en el reestablecimiento de estas actividades, así como en la recuperación gradual de las poblaciones naturales (Saucedo, 2001).

Como se menciono anteriormente en México existen dos granjas comerciales que se dedican al cultivo de las ostras perleras mexicanas y por ende al cultivo de perlas

y medias perlas: Perlas Únicas S.A. de C.V. en Guaymas, Sonora y Perlas del Cortez S. de R.L. MI. en la Bahía de La Paz. Sin embargo, ambas reportan producciones anuales muy inferiores comparadas con las producciones de otros países, como Indonesia, Filipinas, India, Tailandia, Japón, Polinesia Francesa y Australia. Por ejemplo, Perlas Únicas reporta una producción total anual de 5,000 mabes y 5,000 perlas (Monteforte, 2003; Kiefert *et al.* 2004), mientras que por su parte Perlas del Cortez, reporta una producción anual de 3,167 mabes (Comité de Sanidad Acuícola de Baja California Sur A.C., 2008). Siendo estas algunas de las principales características entre ellas;

Tabla I. Comparación entre las dos empresas dedicadas al cultivo de perlas y ostras perleras en México

<b>Empresa</b>	Perlas del Cortez S. de RL. MI.	Perlas del Mar de Cortez (Perlas Únicas SA. de CV)
<b>Fundación</b>	Fundada por un grupo de Biólogos Marinos expertos en el cultivo de moluscos bivalvos.	Surgió como un proyecto científico apoyado por el Tecnológico de Monterrey, Campus Guaymas con una inversión inicial de USD \$550,000
<b>Nivel de Producción</b>	Opera todavía a nivel más experimental que comercial por lo que sus niveles de producción son bajos produciendo 3,167 mabes anualmente.	Tienen una alta capacidad productiva comercial que les permite manejar 5,000 perlas esféricas y 5,000 mabes anualmente.
<b>Productos</b>	Mayormente medias perlas (mabes), comenzando a tener las primeras cosechas de perla esférica en ambas especies la concha nácar <i>Pteria sterna</i> y la madreperla <i>Pinctada mazatlanica</i> .	Enfocados a la comercialización de perlas esféricas y medias perlas en la concha nácar <i>Pteria sterna</i> (no se comercializa la concha o el nácar ni trabajan con la madreperla <i>Pinctada mazatlanica</i> ).
	Perlas de tipo A y B (muy buena y buena calidad), respectivamente montadas en metales finos como oro y plata. Además producen jabones y cremas.	Sus perlas son diseñadas exclusivamente por dos artistas mexicanos de Taxco, Guerrero.
<b>Mercado</b>	Principalmente los turistas nacionales y extranjeros que visitan La Paz y Los Cabos.	Tienen canales de distribución establecidos en Estados Unidos y Chile.

(Dr. Pedro E. Saucedo Lastra, com. pers.).

### **2.3 Estudios sobre las funciones e importancia del manto**

No existen trabajos dirigidos a conocer la importancia y la influencia que tiene el manto utilizado para los injertos de perla libre en las dos especies de ostras perleras mexicanas. Sin embargo, existen estudios sobre los efectos que tiene dicho manto en la formación del saco perlero en otras de las especies productoras, los cuales han permitido implementar planes de manejo para dichas especies. Por ejemplo, Suzuki (1991) analizó la función de los hemocitos durante el proceso de injerto y cicatrización de la herida en la ostra perlera *P. fucata*. Se determinó que los hemocitos tienen una habilidad fagocítica y que forman grandes agregados celulares, siendo responsables del proceso de cicatrización.

Jabbour-Zahab *et al.*(1992) analizaron los aspectos de histología, histoquímica y ultraestructura del manto de la ostra perlera *P. margaritifera* posterior al injerto de manto en la masa visceral. Los autores determinaron que la formación de la concha puede ser descrita en términos de dos fases mayores: 1) procesos celulares de transporte de iones, síntesis y secreción de proteínas y 2) procesos fisicoquímicos en los cuales los cristales de carbonato de calcio son nucleados, orientados y crecen en una asociación íntima con la matriz orgánica.

García-Gasca *et al.* (1994) analizaron la anatomía microscópica del manto de la ostra perlera *P. mazatlanica*, describiendo las diferencias morfológicas y químicas entre el epitelio y las células secretoras de las diferentes zonas del manto. Los autores determinaron que las características morfológicas e histoquímicas del epitelio exterior del manto, mayormente de la zona paleal, sugieren una fuerte y continua deposición de nácar, por lo que este epitelio puede ser el más propicio para el implante de tejido en la perlicultura.

Suzuki y Awaji (1995) observaron la respuesta hematopoyética en los tejidos conectivos del canal digestivo en la ostra perlera *P. fucata martensii* posterior al injerto. Con este estudio se demostró que el tejido conectivo del estomago e intestino es probablemente el sitio donde se lleva a cabo la hematopoyesis en las ostras perleras. Igualmente, se sugirió que la hematopoyesis es un proceso poco activo y es activado por el sistema nervioso como respuesta al estrés provocado por la herida.

Awaji y Suzuki (1995) estudiaron el patrón de proliferación celular durante el proceso de formación del saco perlero en la ostra perlera *P. fucata*. Se encontró que la velocidad de formación del saco perlero depende, en gran parte, de la temperatura del agua, la cual a su vez puede tener un efecto potenciador de la actividad mitótica de las células epiteliales del saco perlero.

Saucedo *et al.* (2001) analizaron el efecto del injerto de manto en el desarrollo y composición de la gónada en adultos de *P. mazatlanica*. Comparando organismos injertados vs. no injertados en meses fuera de temporada reproductiva (marzo y abril), los autores observaron que los organismos injertados experimentaron un desarrollo más acelerado de la gónada y presentaron una concentración más alta de proteínas, lípidos totales y triglicéridos en la gónada, así como un menor contenido de proteínas y carbohidratos en el músculo, en comparación con los organismos que no recibieron injerto de manto. Se sugirió que el manto injertado favorecía un flujo continuo de energía desde los tejidos de reserva (músculo principalmente) hacia la gónada.

Acosta-Salmón y Southgate (2005) analizaron el proceso de regeneración del manto en dos especies de ostras perleras *P. fucata* y *P. margaritifera*. Los autores observaron que la regeneración del tejido era visible a partir del día 6 y la regeneración completa del tejido del manto a su extensión original ocurría al día 60. Se determinó

que la regeneración del manto es un proceso energéticamente costoso para las ostras y está estrechamente relacionado con los patrones estacionales de almacenamiento de nutrientes.

Acosta-Salmón y Southgate (2006) estudiaron el proceso de cicatrización posterior a la extracción de un trozo de manto de la ostra perlera *P. fucata*. En este estudio se determinó que las ostras perleras son capaces de sobrevivir después de la extirpación de una parte considerable del manto (<40%), con una reducida tasa de mortalidad.

Arnaud-Haond *et al.* (2006) analizaron el proceso del injerto durante todo el proceso de mineralización de la concha. En este caso, se encontró que el saco perlero está compuesto por una capa simple de células epiteliales, encontrando un 65% de diferencia entre los genotipos del músculo y el saco perlero. Estos resultados demuestran que existe una supervivencia sistemática de las células del manto del donador durante todo el proceso de formación de la perla, así como en su participación durante la constitución del saco perlero.

Kripa *et al.* (2007) analizaron el proceso de formación de perlas en las costas del Sureste de la India, en la ostra perlera *P. fucata*. Se observó que las tasas de mortalidad eran menores a las observadas en organismos de la costa Este de la India, con lo cual se concluyó que éstas eran consecuencia de factores como el cuidado pre y post-operatorio, además de que se observaron pérdidas de sangre de casi un tercio del volumen, debido al proceso de implante siendo cerca del 20% de la mortalidad debida al proceso quirúrgico.

### 3. Justificación

La nacaricultura y perlicultura han promovido un fuerte desarrollo social y económico en muchas regiones del mundo donde estas actividades están bien arraigadas y asentadas, y en donde trabajan familias enteras y/o grupos comunitarios grandes. En México, sin embargo, la falta de estandarización de las técnicas de injerto de acuerdo a las necesidades específicas de las especies de ostras perleras nativas (talla, anatomía), ha impuesto un fuerte obstáculo para el escalamiento de la producción perlera en las granjas perleras de la región y ha impedido que ésta sea continua y suficiente para apoyar el desarrollo social y económico de muchas zonas rurales y marginadas, mismas que se dedican al cultivo ribereño y artesanal de otras especies de importancia para la acuicultura que se aprovechan con fines comestibles (camarón, peces, pulpo, otras especies de bivalvos, etc.). Como se mencionó en la introducción, estos problemas con la perlicultura son consecuencia directa de las altas tasas de rechazo de los injertos y altas tasas de mortalidad de las ostras injertadas. De igual forma, la carencia de estudios referentes a la biología de las especies, particularmente aquellos que pudieran analizar el efecto del injerto sobre aspectos críticos como la respuesta inmune de éstas, particularmente durante el proceso de cicatrización y formación del saco perlero, agravan el problema. Por ello, la información generada de este estudio servirá de base para el diseño y optimización de los protocolos de injerto de la empresa Perlas del Cortez, ubicada en Bahía de la Paz, B.C.S.

Por otro lado, el presente estudio se realiza en el marco de un convenio vigente entre el CIBNOR y la empresa, dirigido a resolver problemas operativos del perlicultivo comercial, así como a promover el desarrollo de investigación científica e innovación tecnológica de interés para ambas partes.

#### **4. Hipótesis**

Dada la importancia del manto injertado en el proceso de formación del saco perlero, la respuesta hematopoyética y el desarrollo de la gónada, entonces el origen del manto (propio o donado) y la época de injerto generarán un menor número de hemocitos, una cicatrización más rápida, mayores tasas de aceptación de injertos y un desarrollo más acelerado de la gónada en los organismos injertados con manto propio y en los meses fríos de invierno.

## 5. Objetivos

### 5.1. Objetivo General

Evaluar el efecto del injerto de manto en la hematopoyesis y fisiología reproductiva de la concha nácar *P. sterna*, analizando como variables principales de respuesta el origen del manto y la época del año y estableciendo una relación de estos aspectos con la dinámica ambiental.

### 5.2. Particulares

- Evaluar la relación de la hematopoyesis y fisiología de los organismos con las variaciones en la temperatura, salinidad y concentración de oxígeno disuelto del agua de mar durante los meses de junio a diciembre de 2008.
- Cuantificar la cantidad de hemocitos de la zona del injerto de manto y su relación con la formación del saco perlero en organismos injertados con manto propio y donado en dos épocas del año
- Evaluar el proceso de proliferación celular de la zona del injerto de manto en organismos injertados con manto propio y donado en dos épocas del año.
- Evaluar las variaciones en el desarrollo de la gónada y composición de carbohidratos, proteínas, lípidos y triglicéridos de la misma y los tejidos somáticos (músculo aductor, glándula digestiva y manto) que podrían tener influencia en la regulación de la gametogénesis de organismos injertados con manto propio y donado en dos épocas del año.
- Evaluar la tasa de aceptación/rechazo y mortalidad de los organismos injertados con manto propio y donado en dos épocas del año.

## **6. Materiales y métodos**

### **6.1. Obtención de organismos**

Los organismos utilizados para el presente estudio fueron recolectados de la Granja Experimental Submarina del CIBNOR, localizada en la Bahía de La Paz, B.C.S. (24°16'N; 110°19'O) durante verano 2007. Posteriormente, éstos fueron transportados en húmedo al laboratorio de implantes de la empresa Perlas del Cortez, también en la Bahía de La Paz (24°17'N; 110°20'O), donde fueron enjuagados con agua corriente y se les retiró la fauna epifita de acompañamiento de las conchas. Posteriormente, se agruparon en tres grupos experimentales definidos por la forma de realizar los injertos y los muestreos correspondientes (ver sección 6.2 para detalles). Una vez agrupados, los organismos se colocaron en canastas de malla plástica de piso avícola a una densidad de siembra de 20 organismos/canasta y se trasladaron al campo, donde permanecieron durante el desarrollo de todo el experimento bajo condiciones de cultivo a media agua (3–4 m de profundidad), de acuerdo a los protocolos estandarizados por la empresa (Biol. Javier Cortez, Gerente de Operaciones, com. pers.).

### **6.2. Diseño experimental**

Mensualmente durante el periodo de junio del 2008 a enero del 2009 se recolectaron 12 organismos de cada uno de los tres lotes experimentales para realizar los injertos de manto para formación de perla libre de la siguiente manera: A) organismos injertados con manto proveniente de un donador común; y B) organismos injertados con manto propio y C) organismos sin injertar (grupo control).

Para su procesamiento, los organismos se colocaron en charolas de plástico de 10 L y se anestesiaron con una solución de benzocaina al 2.5% por un periodo de 40–60 min. aproximadamente. Una vez que se encontraban sedados (con las valvas abiertas y sin responder a estímulos táctiles), se colocaron en bases para implante de perla libre y se procedió a la inserción de manto y núcleo de acuerdo al método propuesto por Kokichi Mikimoto (1908), el cual consiste en introducir un trozo de manto (aprox. 2 mm<sup>2</sup>) dentro de la cavidad gonadal, a partir de una pequeña incisión y a través de un canal, con el fin de colocar el trozo de manto en contacto con un núcleo que servirá de base para la formación de la perla. Las características de cada grupo se resumen a continuación:

Grupo A (manto de un donador común): Se seleccionó un organismo con características sobresalientes en lo que respecta a salud física visible y color y calidad de nácar del borde interno de la concha. Posteriormente, éste se sacrificó, se separó el manto del resto del organismo y se seccionó en trozos de aproximadamente 2 mm<sup>2</sup>.

Grupo B (manto propio): A cada uno de los organismos a injertar se les extrajo con tijeras de disección un trozo de aproximadamente 2 mm<sup>2</sup> de su propio manto, sin la necesidad de recurrir al sacrificio. Esto tomando en cuenta reportes previos que confirman que las ostras perleras son capaces de regenerar casi un 50% del manto cuando éste es extraído (Acosta-Salmón y Southgate, 2006). El trozo de manto extraído se colocó dentro de la cavidad gonadal, tal y como lo requiere el método para la producción de perlas.

Grupo C (testigo): Los organismos se sometieron al mismo procedimiento que en los dos grupos anteriores (anestesia y manipulación), con la salvedad de que a este grupo no se le realizó incisión alguna, ni inserción de manto.

En todos los casos, los implantes se realizaron tratando de evitar al máximo la lesión de la zona gonadal, ya que además de ser la zona donde se realizan los injertos, es donde se encuentran cercanos algunos órganos vitales, como el estómago y tubo digestivo.

Además del procedimiento físico *per se* que se siguió para la realización de los injertos, se manejó como una segunda variable de estudio la temporalidad con que se llevaron a cabo éstos. Para ello, se realizaron los injertos de junio a diciembre 2008, con el fin de evaluar el efecto de las condiciones ambientales (particularmente temperatura del agua) sobre la respuesta inmune y condición reproductiva de los organismos. La metodología utilizada para los injertos fue la misma descrita arriba.

Una vez realizados los injertos, los organismos se colocaron dentro de sacos de tela, en contenedores con agua corriente para neutralizar el efecto del narcótico. Una vez rehabilitados, éstos se etiquetaron, con la fecha y el nombre del tratamiento experimental al que pertenecían y se transportaron a las instalaciones submarinas de la empresa, donde se mantuvieron bajo condiciones de cultivo en suspensión durante un periodo de 31 días, durante el cual se realizaron análisis para determinar el efecto del injerto en la respuesta inmune y fisiología reproductiva de los organismos, los días 3, 7, 14, 21 y 31 posteriores al injerto (ver sección 6.4).

### **6.3. Análisis ambiental**

Mensualmente a lo largo del periodo de estudio (junio 2008 a enero 2009), se monitorearon aquellos parámetros ambientales que se consideraron más representativos del agua de mar y con mayor influencia sobre las variables a estudiar. Estos incluyeron temperatura ( $\pm 0.1$  °C), salinidad ( $\pm 0.1$  ups) y oxígeno disuelto ( $\pm 0.1$  mg/L), los cuales

se registraron con la ayuda de un medidor portátil de multiparámetros YSI-553. Todos estos datos se obtuvieron cerca de las instalaciones de la empresa y siempre a 2 metros de profundidad.

#### **6.4. Efecto del injerto de manto sobre la respuesta inmune de los organismos**

##### **6.4.1. Hematopoyesis**

El proceso de hematopoyesis después de la realización de los injertos se analizó mediante la extracción de hemolinfa del pericardio de cada uno de los organismos de los tres grupos experimentales (implantados con manto propio, donado y sin implantar) para cada uno de los meses comprendidos a lo largo del periodo junio 2008 a enero 2009. En cada mes, el proceso de evaluación se realizó a los días 3, 7, 14, 21 y 30, después de los injertos, de acuerdo a lo sugerido por Suzuki y Awaji (1995). Las muestras de hemolinfa se recolectaron en tubos eppendorf de 1.5 mL y se fijaron en formol al 4%. Posteriormente, se revisaron en un microscopio óptico Olympus BX-42 en aumentos de 10X. El microscopio estaba equipado con un sistema de análisis digital de imágenes, consistente en una cámara Olympus Cool Snap (mod. E-4.10) y el programa Image Pro Plus (vers. 5.1., Media Cybernetics, Nueva Jersey, Estados Unidos) Los conteos de hemocitos se realizaron por triplicado en una cámara Neubauer® de 1mL para dar representatividad al procedimiento.

Adicionalmente, la evaluación de la respuesta del sistema inmune de los organismos se evaluó mediante el uso de acetato de fluoresceína. A manera de una evaluación preliminar, se seleccionaron 10 organismos de concha nácar de talla comercial y se dividieron en dos grupos experimentales: A) organismos a los que se les inyectó acetato de fluoresceína (500 $\mu$ L) en el músculo aductor, B) organismos a los que

se les inyectó acetato de fluoresceína (500 $\mu$ L) en la gónada, cerca de la glándula digestiva. Una vez inyectada la solución, los organismos se mantuvieron en condiciones de cultivo controladas en el laboratorio, dentro de contenedores de plástico de 60 L conteniendo agua de mar filtrada a 1  $\mu$ m y mantenidos a una temperatura entre 25–27 °C. Durante esta fase, los organismos se alimentaron a saciedad mediante un sistema de alimentación continua con una mezcla de las microalgas *Isochrysis galbana* y *Chaetoceros muelleri* en proporción 1:1 y a una densidad de 20 cel/ $\mu$ L. El ensayo tuvo una duración de tres días, durante los cuales se recolectaron las heces fecales de los organismos de cada uno de los tratamientos, mismas que se colocaron en una placa PS de 6 pozos con fondo plano Thermo Scientific Nunc® (Cod. 152034) para ser analizadas en un transiluminador de luz UV (Gel- Doc 2000, BIO RAD). Una vez recolectadas las heces, los organismos se fijaron en solución Davidson durante 48 h y posteriormente se deshidrataron, incluyeron en Paraplast TX (DAIGGER®. Cat. No. EF16065A) y cortaron en un micrótopo de rotación Leica® (Mod. RM2100) a 3  $\mu$ m de espesor. Las muestras obtenidas se observaron en un microscopio Olympus® BX-42 equipado con un dispositivo de inmunofluorescencia indirecta. Las visualizaciones se realizaron empleando filtros de 400 a 590 nm, con objetivos de 10 y 40X.

#### **6.4.2. Proliferación celular y formación del saco perlero**

El efecto del injerto de manto sobre el proceso de proliferación celular y formación del saco perlero se determinó mediante la metodología propuesta por Suzuki (1991), la cual fue modificada en el presente estudio para la utilización de 5-etinil-2-desoxiuridina (EdU), en lugar de 5-Bromo-2-desoxiuridina (BrdU). El análisis de la proliferación celular a partir del momento en que el organismo es operado es un reflejo

de la respuesta hematopoyética a la herida provocada por el injerto de manto. Para este análisis se agregaron 500µL de Edu en una solución salina balanceada MMBSS (Click-iT™ EdU Alexa Fluor® 488 de Invitrogen). Una vez preparada, ésta se inyectó en el músculo aductor de los animales de cada uno de los tres grupos experimentales. Para detectar las células marcadas con EdU, se seleccionaron tres organismos de cada tratamiento experimental a los días 3, 7, 14, 21 y 30 posteriores a la operación. Estos fueron disectados y se extrajeron muestras de manto, músculo aductor y gónada (en particular de la zona donde se realizó el injerto de manto). Los tejidos se fijaron en solución Davidson durante 48 h y nuevamente se deshidrataron, incluyeron en Paraplast TX y cortaron en un micrótopo de rotación Leica® a 3 µm de espesor. Las células marcadas con EdU se analizaron otra vez con un microscopio Olympus® BX-42 equipado con un dispositivo de inmunofluorescencia indirecta. Las visualizaciones se realizaron empleando un filtro de 590 nm en aumentos de 10, 40 y 100X. Este procedimiento permitió identificar las células que habían incorporado el reactivo como un reflejo directo del proceso de proliferación, así como el mecanismo por el cual se llevaba a cabo la cicatrización y la formación del saco perlero.

**Es importante señalar que el muestreo de la proliferación celular en particular solo se pudo realizar en los meses comprendidos entre agosto y diciembre 2008, debido a que se tuvo un retraso de tres meses en el arribo del reactivo, que por ser de origen animal, se tuvo detenido en la aduana de la ciudad de México hasta ser liberado. Este problema solo afectó los resultados de este análisis.**

## **6.5. Efecto del injerto de manto en el desarrollo gonádico y variaciones en la composición bioquímica de la gónada y tejidos somáticos**

### **6.5.1. Evaluación del desarrollo gonádico**

La evaluación del desarrollo gonádico como efecto del injerto de manto se realizó mediante disección de una muestra de 3 organismos de cada grupo experimental posterior al injerto para extraer muestras de gónada. Estas se fijaron en solución Davidson durante 48 h y posteriormente se deshidrataron, incluyeron en Paraplast TX y cortaron en un micrótopo de rotación Leica® a 3  $\mu\text{m}$  de espesor. Las muestras obtenidas se tiñeron por contraste con eosina y hematoxilina. Una vez teñidas, las laminillas se observaron bajo un microscopio compuesto Olympus BX 41 con objetivos de 10x, 40x, 60x. De cada ejemplar se identificó el sexo y el estadio de desarrollo gonadal, a partir de la escala de clasificación de 5 estadios propuesta por Saucedo y Monteforte (1997): Indiferenciación, Desarrollo, Madurez, Desove parcial y Post-desove.

### **6.5.2. Determinación de la composición bioquímica**

Posterior a la realización de los injertos, se tomaron muestras mensuales de gónada y tejidos somáticos (glándula digestiva, músculo aductor y manto) de los organismos de los tres grupos experimentales. Las muestras se pesaron (0.1 g) y se liofilizaron en un liofilizador Virtis (Mod. 10-145, MR-BA) para obtener el peso seco. Posteriormente, éstas se rehidrataron en 1 mL de solución salina (NaCl 35 %) y se homogenizaron para la obtención de los extractos crudos correspondientes. Estos se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  en el Laboratorio de Bioquímica Fisiológica del CIBNOR y se utilizaron para los siguientes análisis rutinarios:

Para la determinación de la concentración de hidratos de carbono se siguió la técnica de Van Handel (1965). Se utilizaron 0.1 mL del extracto crudo, los cuales se mezclaron con 0.1 mL de ácido tricloracético (TCA) al 20% (dilución 1:1), con el fin de remover las proteínas presentes de la muestra. La mezcla resultante se centrifugó a 3,600 rpm a  $-5^{\circ}\text{C}$  por 15 min. Posteriormente se recuperó el sobrenadante y se le agregaron 1 mL de solución de antrona (0.1 % disuelto en ácido sulfúrico  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 76 %). Se incubó la muestra durante 4 min a  $85-90^{\circ}\text{C}$  e inmediatamente después se enfrió a  $4^{\circ}\text{C}$  para detener la reacción. La absorbancia se leyó a 620 nm y la concentración de carbohidratos totales fue determinada realizando una curva tipo de siete puntos utilizando dextrosa como estándar a partir de 5 mg/mL.

Para la determinación de proteínas solubles, se utilizó el método descrito por Bradford (1976), el cual es un ensayo de unión proteína-colorante, basado en el cambio diferencial de color de un colorante en respuesta a varias concentraciones de proteína. Se trata de un método de determinación de proteínas que implica la unión del azul brillante de Coomassie G-250 con las proteínas. Esta unión del colorante con las proteínas provoca un cambio en el máximo de absorción del colorante desde 465 a 595 nm. La cuantificación se realizó con un reactivo colorimétrico de Sigma (No. B6916) y solución de suero de bovino como estándar (Sigma 9048-46-8). Esto se realizó a partir de una curva tipo también de siete puntos.

Para la determinación de lípidos totales se empleó el método de sulfofosfovainillina (Barnes y Blackstock, 1973), utilizando un reactivo comercial y soluciones estándar (Merck No. 3321). Para tal efecto, se añadieron 0.025 mL del homogenizado en tubos de ensayo y se agregaron 0.25 mL de ácido sulfúrico concentrado. La mezcla resultante se calentó a baño María a  $90^{\circ}\text{C}$  por 10 min e

inmediatamente después fue enfriada en baño de hielo. Se colocaron 0.02 mL de la muestra en un lector de microplaca (Lab-systems, Uniskan II) y se añadieron 0.2 mL de reactivo enzimático comercial. La absorbancia se registró a 560 nm y la determinación de la concentración de lípidos totales se realizó con una curva tipo con ocho puntos a partir de 10 mg/mL.

Los triglicéridos se determinaron por reacción calorimétrica mediante la hidrólisis enzimática de los triglicéridos y determinación enzimática subsiguiente del glicerol formado (Trinder, 1984). Se utilizó para ello un kit comercial de Merck (GPO-PAP, num. 1.1434.001), el cual fue adaptado para su lectura en microplaca (Labsystems Uniskan II; Racotta et al. 1998; Palacios et al. 2000). Se utilizaron 20 $\mu$ L del sobrenadante y 200 $\mu$ L del reactivo y la absorbancia se registró a 495. La determinación de la concentración total se realizó con una curva tipo con ocho puntos a partir de 10 mg/mL.

#### **6.6. Efecto del injerto de manto en las tasas de aceptación/rechazo de implantes y mortalidad de los organismos**

Para determinar las tasas de aceptación/rechazo, se recolectaron los 12 organismos de los tres grupos experimentales a los días 3, 7, 14, 21 y 30 posteriores al injerto, los cuales se sacaron de los costales plásticos en los que se encontraban y se observó si el núcleo colocado durante el injerto había sido aceptado o rechazado, así mismo se contabilizaron los organismos vivos y muertos. Posteriormente, se determinaron los porcentajes de aceptación o rechazo y las tasas de mortalidad para cada uno de los tratamientos.

### 6.7. Análisis Estadístico

Primeramente, se realizaron análisis de normalidad por medio de la prueba de t-Student e inmediatamente con el método de Levene para confirmar la homogeneidad de varianzas de todos los grupos experimentales (talla, origen del manto, época del año) para determinar el tipo de prueba estadística a utilizar (paramétrica o no paramétrica) (Sokal y Rohlf, 1982). Una vez que se corroboró la normalidad de los datos, se realizaron análisis de varianza (ANOVA) de una vía para evaluar las variaciones en el conteo de hemocitos y el proceso de proliferación celular por efecto del origen del manto (propio vs donado). A su vez, se corrió un ANOVA de dos vías para evaluar las variaciones en la composición bioquímica de tejidos en función del origen del manto y tiempo de injerto. Cuando fue necesario, se aplicaron pruebas *a posteriori* de Tukey para identificación de grupos homogéneos o heterogéneos de medias. Se fijó un nivel de significancia de  $p \leq 0.05$  para todos los análisis.

## 7. Resultados

### 7.1. Distribución de los datos

Una vez realizados los análisis de la respuesta hematopoyética a partir del injerto de manto de cada uno de los tratamientos experimentales, la prueba de t-student confirmó la existencia de una distribución normal para el conteo de hemocitos de los organismos en el grupo testigo (figura 1), el tratamiento al que se injertó manto de un donador común (figura 2) y el tratamiento al que se injertó manto propio (figura 3), incluidas sus réplicas, durante los días 3, 7, 14, 21 y 31 a lo largo del periodo julio–diciembre 2008.

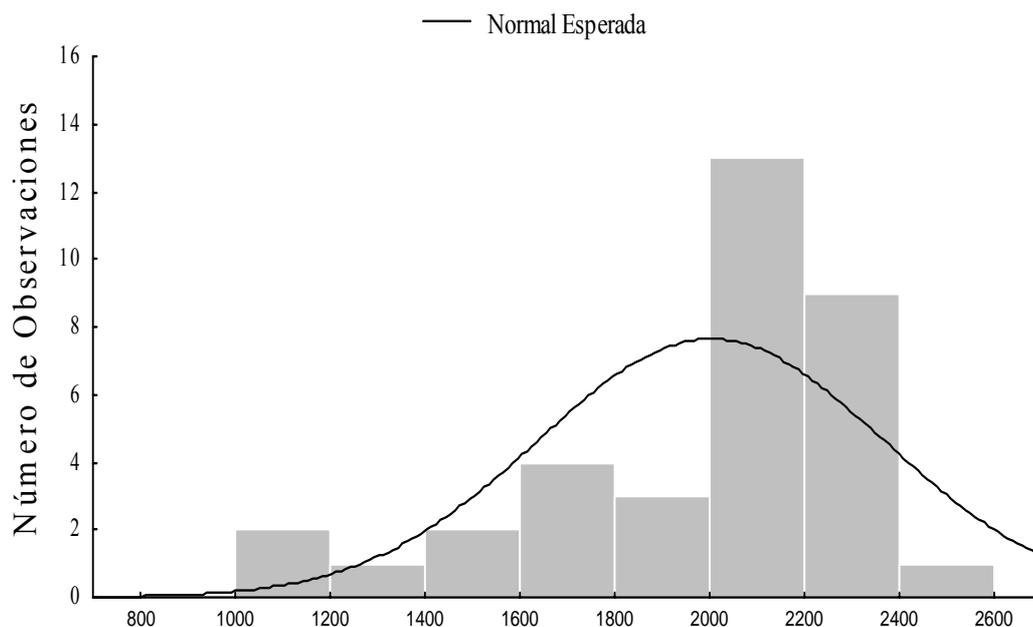


Figura 1. Distribución de hemocitos, a partir de una prueba t-student, para el grupo testigo, durante los meses comprendidos entre junio a diciembre 2008.

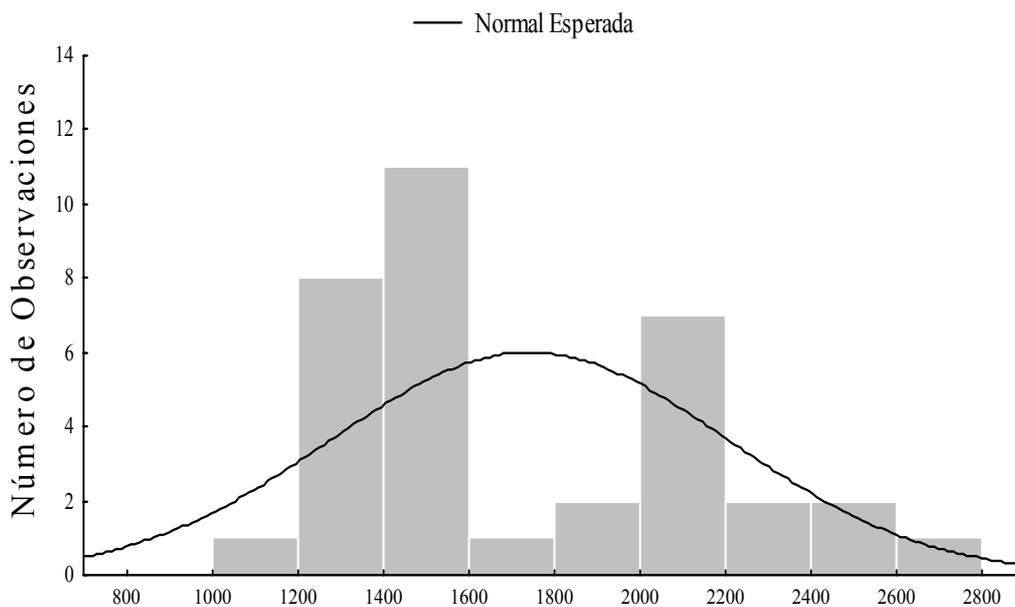


Figura 2. Distribución de hemocitos, a partir de una prueba t-student, para el tratamiento al que se injertó manto de un donador común durante los meses comprendidos entre junio a diciembre 2008.

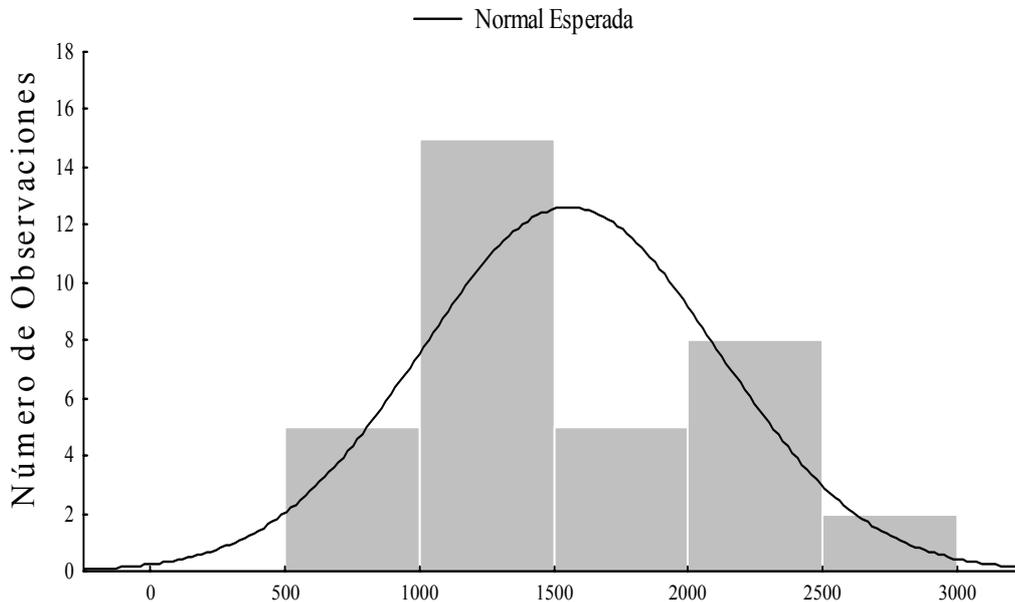


Figura 3. Distribución de hemocitos, a partir de una prueba t-student, para el tratamiento al que se injertó manto propio, durante los meses comprendidos entre junio a diciembre 2008.

## 7.2. Parámetros Ambientales

Las figuras 4, 5 y 6 presentan las variaciones en los parámetros ambientales del agua de mar durante el periodo de estudio. La temperatura más alta se presentó en el mes de septiembre (29.85 °C), mientras que la más baja en el mes de junio (20.87 °C). Asimismo, la salinidad también fue más alta y baja en el mes de septiembre (36.25 ups) y junio (34.92 ups), respectivamente. En lo que respecta al oxígeno disuelto, el valor más alto ocurrió en el mes de junio (6.87 mg/L O<sub>2</sub>), mientras que el valor más bajo fue de 5.72 mg/L O<sub>2</sub> para el mes de noviembre.

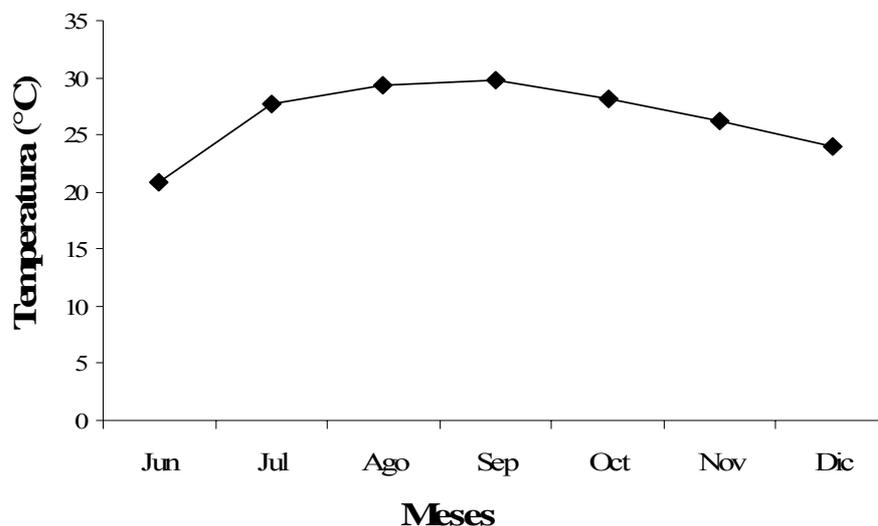


Figura 4. Variaciones en la temperatura del agua en las instalaciones submarinas de la empresa Perlas del Cortez, durante los meses comprendidos entre junio a diciembre 2008.

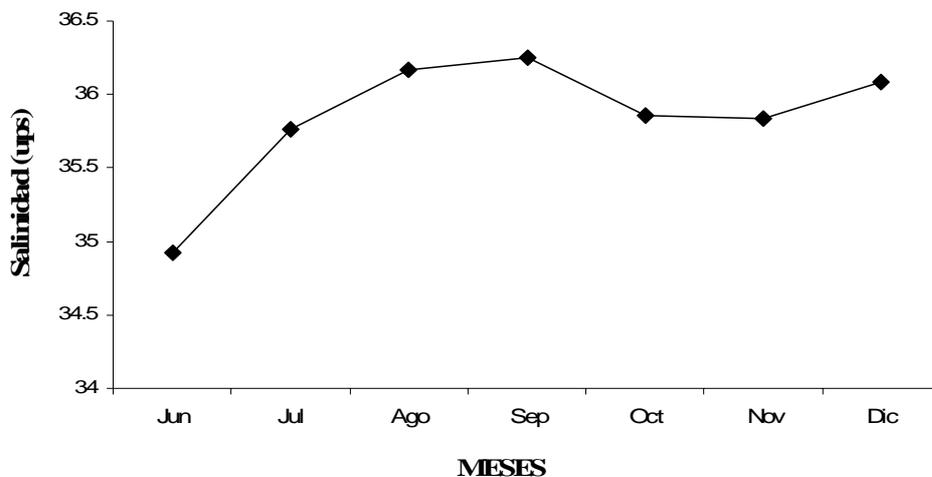


Figura 5. Variaciones en la salinidad del agua en las instalaciones submarinas de la empresa Perlas del Cortez, durante los meses comprendidos entre junio a diciembre 2008.

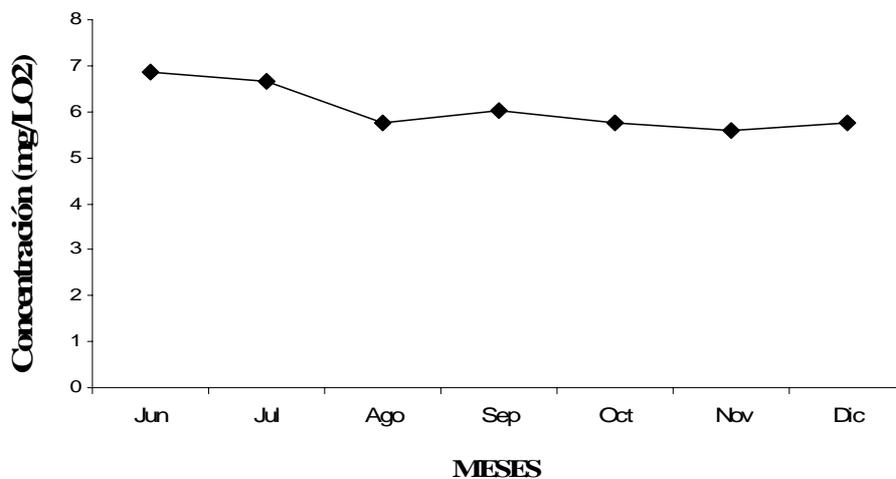


Figura 6. Variaciones en la concentración de oxígeno disuelto del agua en las instalaciones submarinas de la empresa Perlas del Cortez, durante los meses comprendidos entre junio a diciembre 2008.

### 7.3. Efecto del injerto de manto en la respuesta inmune

#### 7.3.1. Hematopoyesis

La figura 7 presenta el número de hemocitos circulantes de los organismos pertenecientes a los tres grupos experimentales para el día 31. Se aprecia que los valores mayores (2194) y menores (693) números se presentaron en organismos del grupo control y los injertados con manto del mismo organismo, respectivamente. Estas diferencias fueron significativas entre grupos ( $F= 2.94$ ,  $p < 0.05$ ). A su vez, la Tabla II muestra que a partir del análisis de Tukey, se forman dos grupos homogéneos.

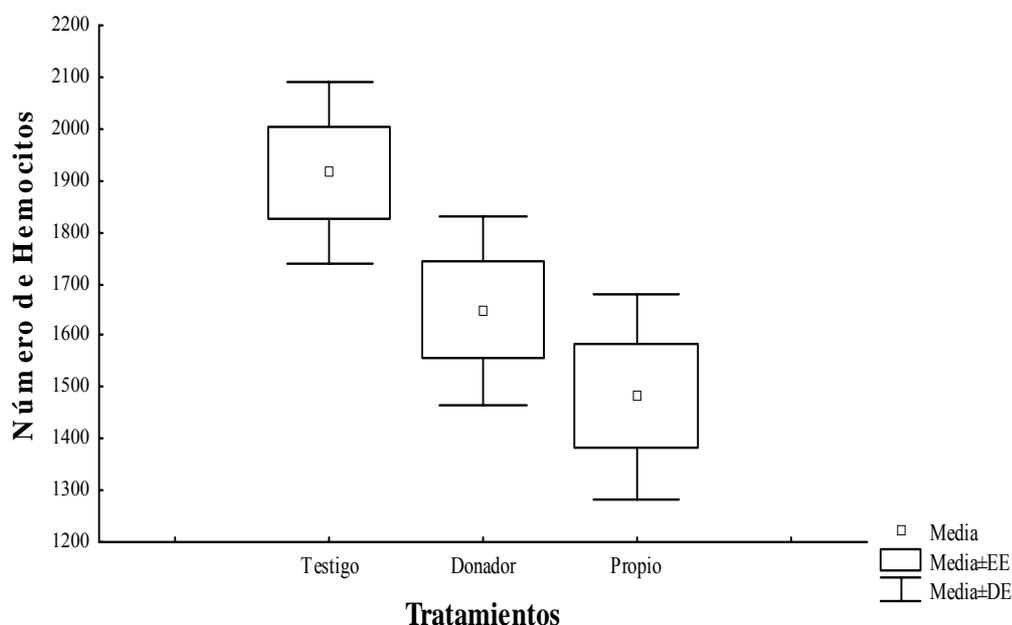


Figura 7. Variaciones en el número de hemocitos de los organismos de concha nácar *Pteria sterna* pertenecientes a los tres tratamientos experimentales.

Tabla II. Análisis de Tukey para identificación de grupos homogéneos y heterogéneos de medias para el conteo de hemocitos en los diferentes tratamientos experimentales de injerto de concha nácar *P. sterna*.

Tratamiento	1	2
Propio	****	
Donado	****	****
Testigo		****

Por otro lado, la figura 8 muestra las variaciones en el conteo de hemocitos de los organismos con respecto al tiempo (independientemente al grupo experimental. Se observa que el número se mantuvo relativamente constante entre los meses de junio a diciembre 2008, por lo que no se encontraron diferencias significativas con respecto al tiempo ( $F=0.534$ ,  $p < 0.05$ ). A su vez, el análisis de Tukey confirma que solo se forma un grupo homogéneo (Tabla III).

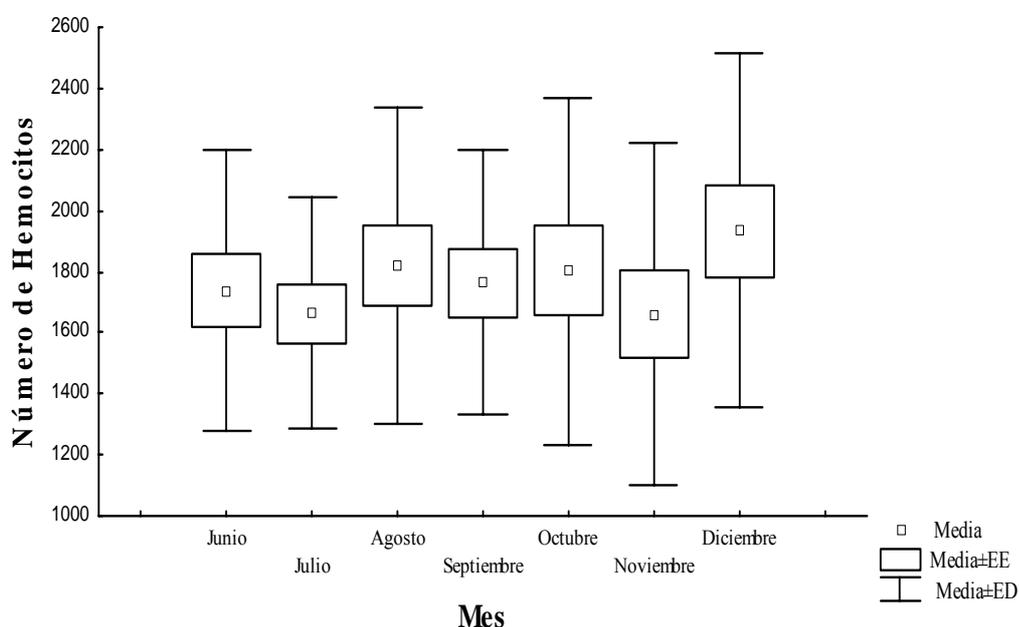


Figura 8. Variaciones mensuales en el número de hemocitos de los organismos de concha nácar *Pteria sterna* durante los meses comprendidos entre junio a diciembre 2008.

Tabla III. Análisis de Tukey para identificación de grupos homogéneos y heterogéneos de medias pertenecientes al conteo de hemocitos para los meses en que se realizó el estudio.

Mes	1
Noviembre	****
Julio	****
Junio	****
Septiembre	****
Octubre	****
Agosto	****
Diciembre	****

La figura 9 muestra las variaciones en el conteo de hemocitos de los organismos en cada uno de los muestreos realizados en los días posteriores al injerto de manto (3, 7, 14, 21, 31). Se observa que el número de hemocitos disminuyó conforme pasaron los días siendo los mayores números ( $\leq 2751$ ) dentro de los primeros 7 días posteriores al injerto en los meses de octubre y diciembre y los menores ( $\geq 693$ ) después del día 21 hasta el 31 (octubre y noviembre), se encontraron diferencias significativas con respecto a los días ( $F=2.67$ ,  $p < 0.05$ ). Por lo que, se puede observar a partir del análisis de Tukey la formación de tres grupos homogéneos (Tabla IV).

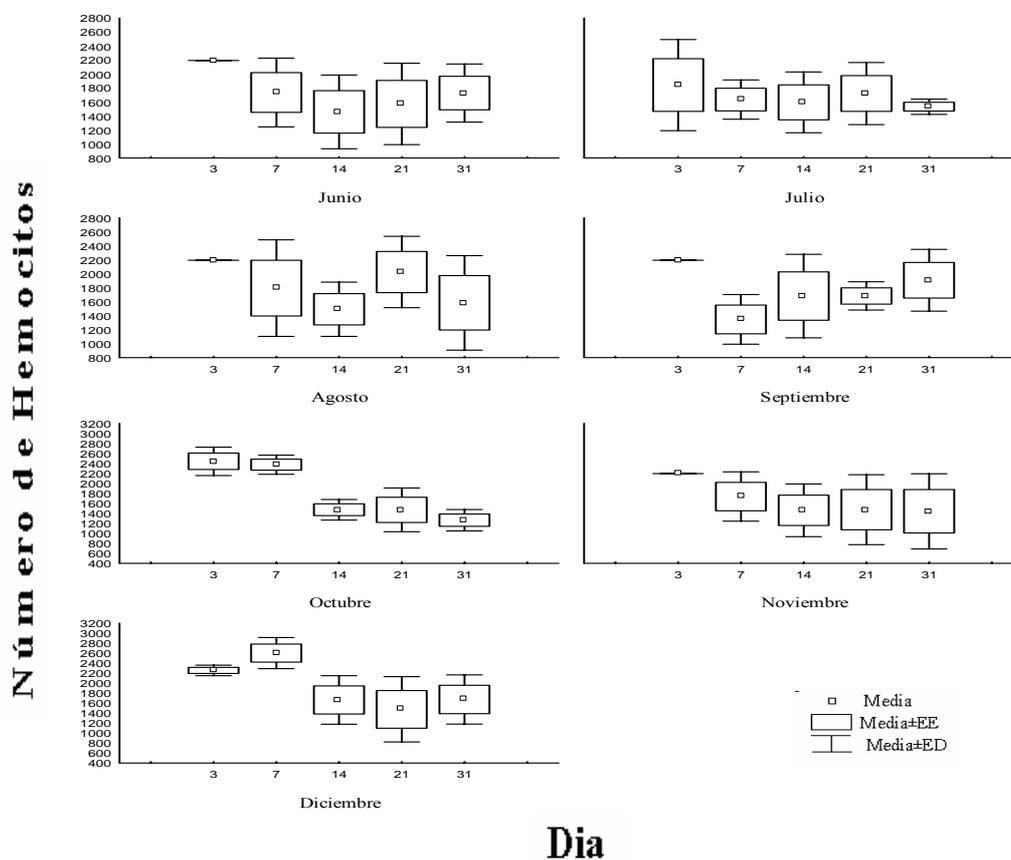


Figura 9. Variaciones en el número de hemocitos en los días sucesivos a la realización de los injertos en los organismos de concha nácar *Pteria sterna* durante los meses comprendidos entre junio a diciembre 2008.

Tabla IV. Análisis de Tukey para identificación de grupos homogéneos y heterogéneos de medias pertenecientes al conteo de hemocitos, para todos los días en que se extrajeron dichos hemocitos.

Día	1	2	3
31	****		
21	****		
14	****	****	
7		****	****
3			****

En lo que respecta al efecto de la temperatura en el comportamiento de los hemocitos de los organismos del grupo control (figura 10), se puede observar que la relación fue inversamente proporcional. Así, el mes de septiembre, cuando se reportó la temperatura más elevada (29.85 °C), corresponde al momento en que el número de hemocitos fue más bajo (1677), mientras que para junio, cuando la temperatura fue más baja (20.87 °C), se tiene uno de los valores más altos para los conteos de hemocitos (2194).

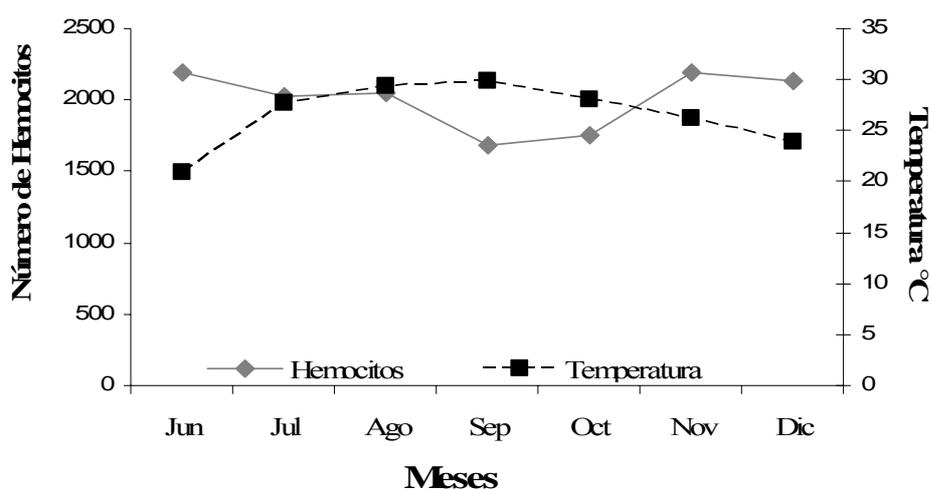


Figura 10. Relación de la temperatura del agua con el número de hemocitos presentes en los organismos de concha nácar *Pteria sterna* del grupo control durante los meses comprendidos entre junio a diciembre 2008.

En los cortes histológicos de los organismos pertenecientes a este mismo grupo se puede observar que existe un elevado número de hemocitos alrededor de los tejidos de la gónada, así como diversos agregados de fagocitos y células cafés (figura 11), cuya presencia se discute en la sección 8.

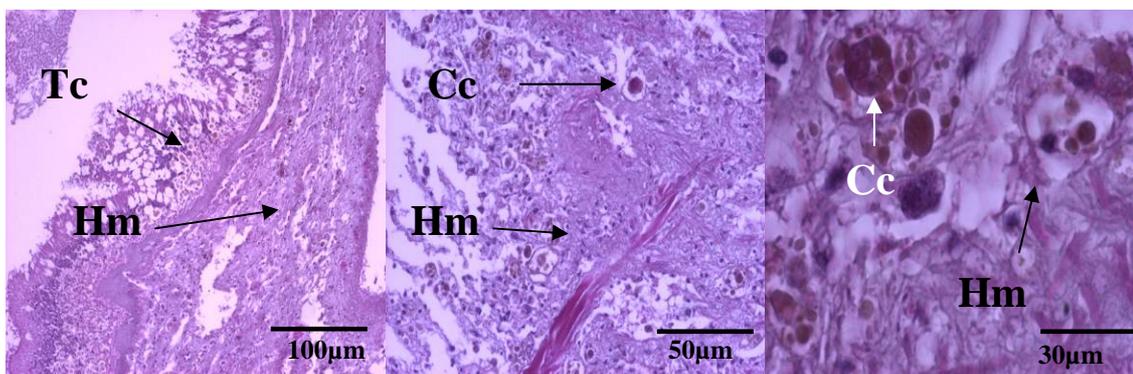


Figura 11. Corte transversal de gónada de organismos de concha nácar *Pteria sterna* del grupo control (de izquierda a derecha 10X, 20X y 100X). Se observa la presencia de numerosos hemocitos inmersos alrededor de la gónada. (Tc= Tejido conectivo; Hm= Hemocitos; Cc= Células cafés).

En los organismos injertados con manto de un donador común (figura 12), se puede observar un patrón completamente diferente, pues en este caso el número de hemocitos mantuvo una relación directamente proporcional con la temperatura. Esto es, para el mes de junio, cuando se reporta la temperatura mas baja (20.87 °C), también se observó el número de hemocitos más bajo (1533); de igual forma, en el mes de más cálido de septiembre (29.85 °C), la cantidad de hemocitos también fue mayor (2108).

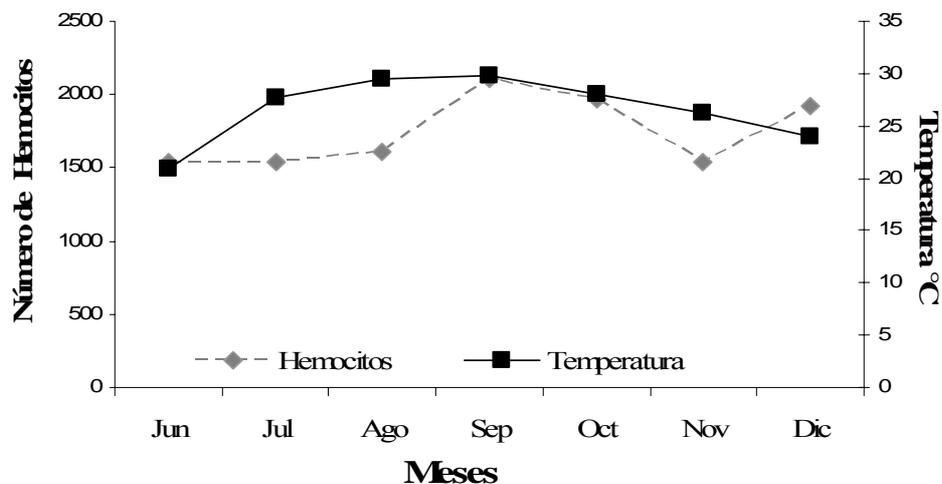


Figura 12. Relación de la temperatura del agua con el número de hemocitos presentes en los organismos de concha nácar *Pteria sterna* del tratamiento al que se le injertó manto de un organismo común, durante los meses comprendidos entre junio a diciembre 2008.

El tratamiento al que se le injertó manto de un donador común mostró un elevado número de hemocitos ( $\leq 2751$ ) en los cortes histológicos de la gónada. En este caso, el número de hemocitos es mayor al observado en el grupo control ( $\geq 1663$ ), y al igual que ese, se observan algunos agregados de células cafés (figura 13).

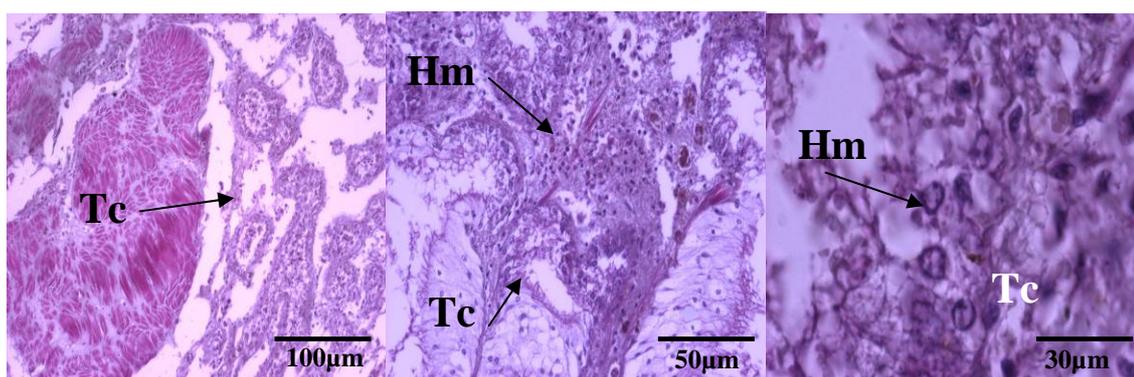


Figura 13. Corte transversal de gónada de organismos de concha nácar *Pteria sterna* del tratamiento al que se injertó manto de un donador común (de izquierda a derecha 10X, 20X y 100X), en donde no hubo diferenciación de sexos (Tc= Tejido conectivo; Hm= Hemocitos).

En lo que respecta a los organismos injertados con manto propio (figura 14), se puede observar que el comportamiento de los hemocitos no sigue un patrón definido como en los casos anteriores. En este caso, los conteos más bajos ocurrieron, tanto en meses fríos de junio (20.77 °C; 1486 hemocitos), como en los cálidos de septiembre (29.85 °C; 1500 hemocitos). De igual forma, los mayores conteos de hemocitos ocurrieron en a 29.41 °C en agosto (1796) y a 23.91 °C en diciembre (1748).

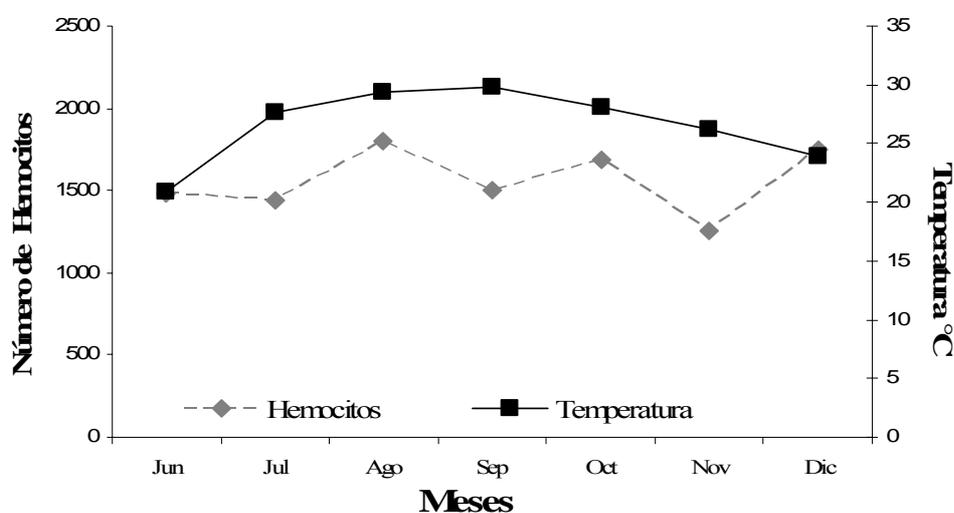


Figura 14. Relación de la temperatura del agua con el número de hemocitos presentes en los organismos de concha nácar *Pteria sterna* para el tratamiento al que se le injertó manto propio durante los meses comprendidos entre junio a diciembre 2008.

Finalmente también se observó la presencia de numerosos hemocitos en la gónada de los organismos de este tratamiento (figura 15), siguiendo el mismo patrón que en los dos tratamientos anteriores, tanto en cuanto a la presencia de hemocitos, como en cuanto a la presencia de agregados celulares de fagocitos y células cafés.

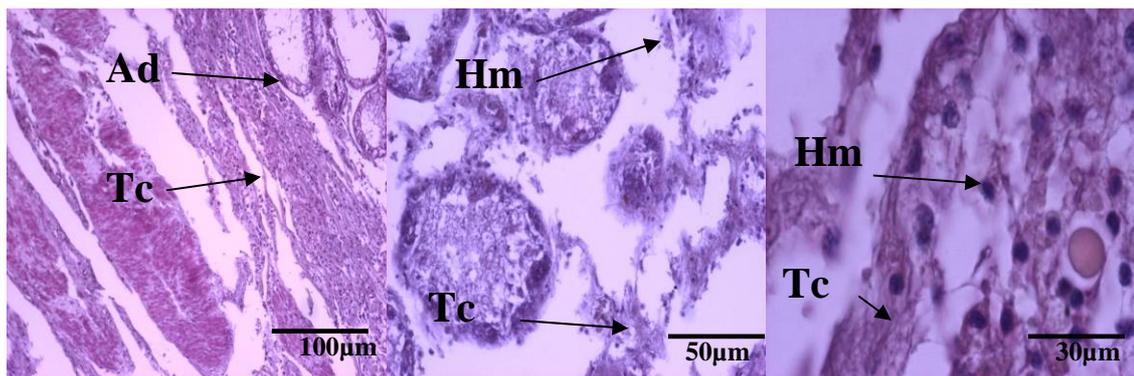


Figura 15. Corte transversal de gónada de los organismos de concha nácar *Pteria sterna* del tratamiento al que se injertó manto propio (de izquierda a derecha 10X, 20X y 100X), donde tampoco hubo diferenciación de sexos (Ad= Adenomero; Tc= Tejido conectivo; Hm= Hemocitos).

En lo que respecta a la respuesta del sistema inmune a partir de la inyección de acetato de fluoresceína, se pudo observar que la respuesta de los organismos dependió del sitio en donde se aplicó la inyección (figura 16). De hecho, se observa que el pozo A de la izquierda (inyección en músculo), muestra actividad fluorescente, mientras que en el caso del pozo B de la derecha (inyección en gónada) no la presenta.

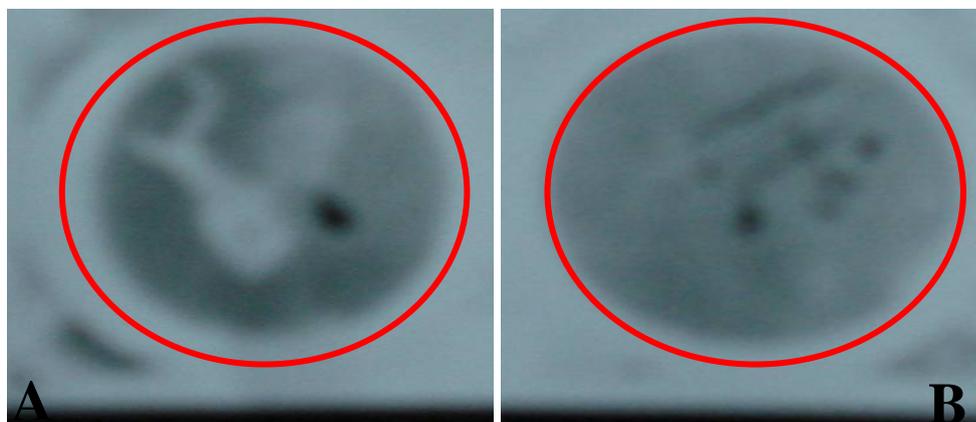


Figura 16. Respuesta de los organismos de concha nácar *Pteria sterna*, ante el acetato de fluoresceína; el pozo A corresponde al grupo en que se inyectó el colorante en el músculo, el pozo B corresponde al grupo que se inyectó colorante en la gónada.

De la misma manera, en la figura 17 se presenta un corte transversal del músculo y en la figura 18 uno de glándula digestiva correspondiente al tratamiento al que se

inyectó acetato de fluoresceína en el músculo. En estos se puede observar que la intensidad de la señal fluorescente de los tejidos es nula, más cuando se compara con las figuras 19 y 20, que corresponden a cortes transversales de músculo y glándula digestiva respectivamente de organismos inyectados con acetato de fluoresceína en el área de la gónada; en este caso se puede observar que existe una gran intensidad en la señal fluorescente de ambos tejidos.

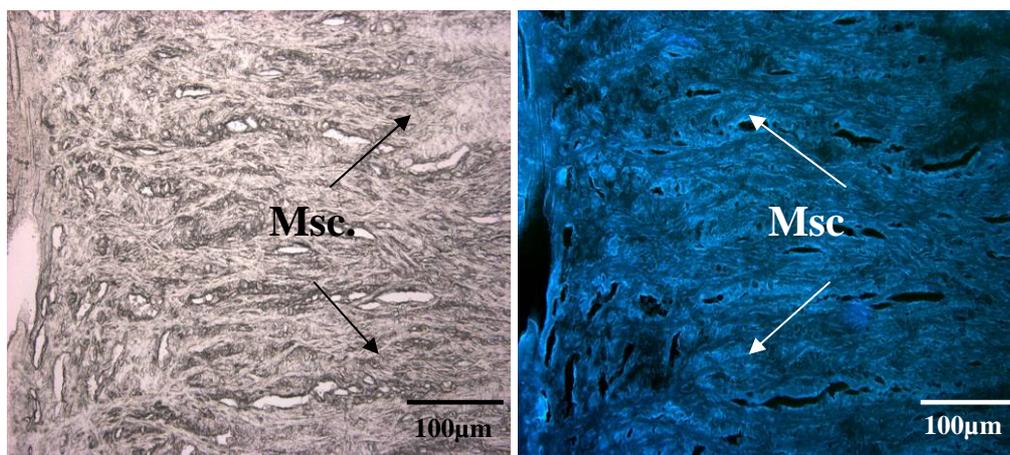


Figura 17. Corte transversal de músculo aductor de los organismos de concha nácar *Pteria sterna* inyectados con acetato de fluoresceína en músculo aductor. A la derecha corte a 10X en campo claro, y a la izquierda corte a 10X campo fluorescente. (Msc= músculo,).

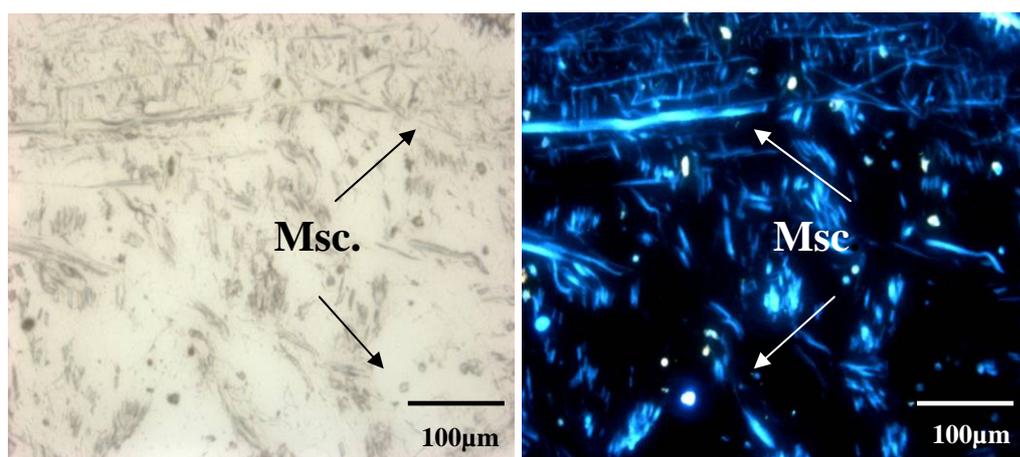


Figura 18. Corte transversal de de músculo aductor de los organismos de concha nácar *Pteria sterna* inyectados con acetato de fluoresceína en gónada. A la derecha corte a 10X en campo claro, y a la izquierda corte a 10X campo fluorescente. (Msc= músculo,).

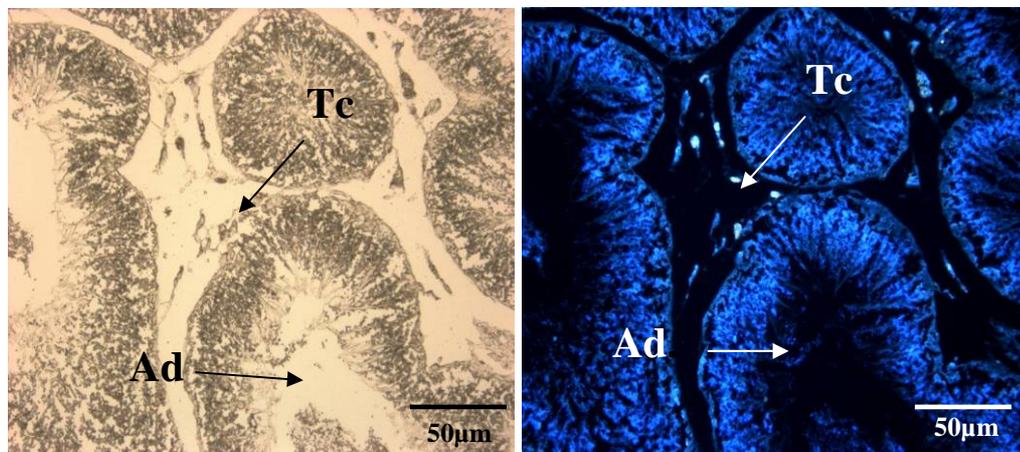


Figura 19. Corte transversal de glándula digestiva de los organismos de concha nácar *Pteria sterna* inyectados con acetato de fluoresceína en músculo aductor. A la derecha corte a 40X en campo claro, y a la izquierda corte a 40X campo fluorescente (Tc= Tejido conectivo, Ad= Adenomero).

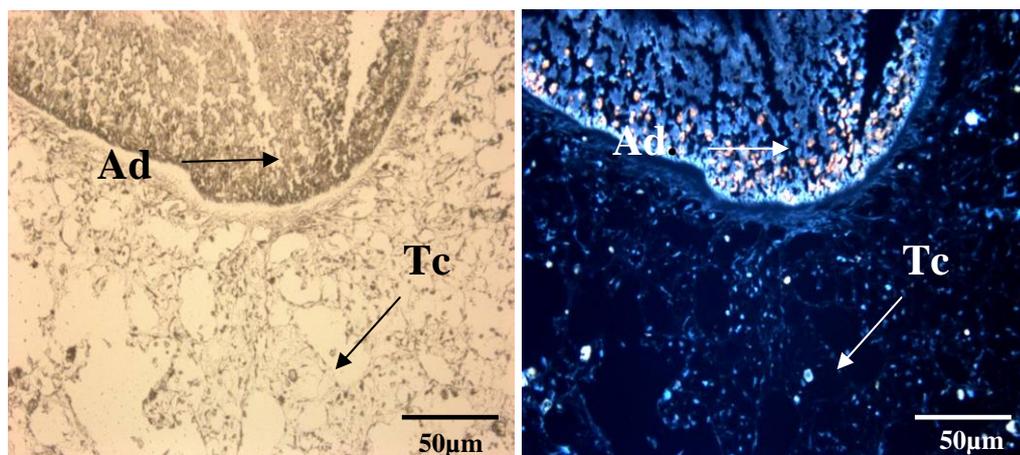


Figura 20. Corte transversal de glándula digestiva de los organismos de concha nácar *Pteria sterna* inyectados con acetato de fluoresceína en gónada. A la derecha corte a 40X en campo claro, y a la izquierda corte a 40X campo fluorescente (Tc= Tejido conectivo, Ad= Adenomero).

### 7.3.2. Proliferación celular y formación del saco perlero

La proliferación celular, estudiada como una respuesta secundaria al proceso de injerto para la producción de perlas, se determinó mediante la tinción de las células con EdU (5-etinil-2-desoxiuridina). La figura 21, que corresponde a un corte longitudinal de gónada de organismos injertados con manto propio, manifiesta una señal fluorescente que depende del número de células que se generaron posteriores a la inyección del reactivo, más que como efecto del injerto de manto. Esto sugiere que la asimilación del reactivo no es selectiva y que éste es asimilado por todas las células de la zona gonadal que se encuentran en alguna etapa de proliferación, sin importar a que tejido o tratamiento pertenezcan. Por otro lado, se puede observar el mismo tipo de respuesta en la figura 22, correspondiente a un corte longitudinal de manto de organismos injertados con manto de un donador común; aquí el reactivo fue asimilado por las células de la zona exterior del manto, que suele presentar una continua restitución de células, al igual que los adenómeros de la glándula digestiva (figura 23), donde también se aprecia una elevada tasa de restitución celular.

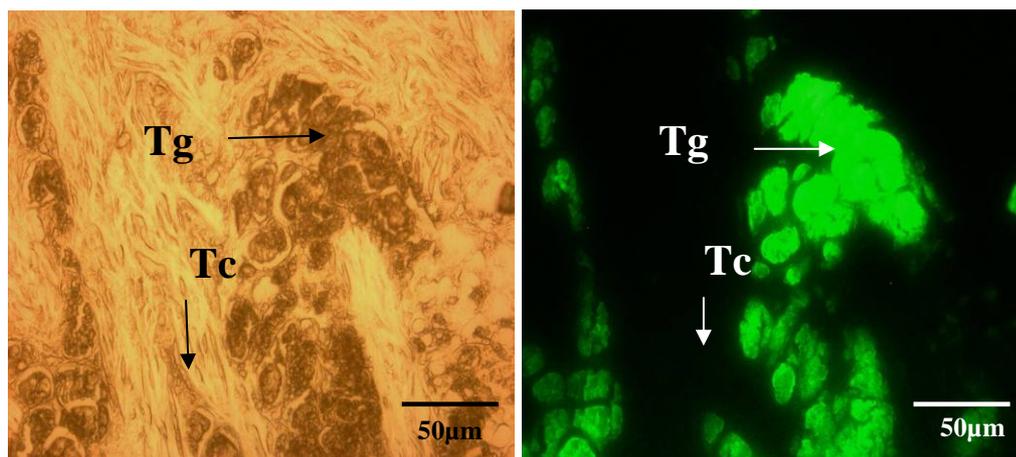


Figura 21. Corte longitudinal a 40X de gónada de organismos de concha nácar *Pteria sterna* injertados con manto propio y teñidos con Edu, campo claro izquierda y la señal fluorescente de las células en proliferación (derecha) (Tc= Tejido conectivo, Tg= Tejido gonádico).

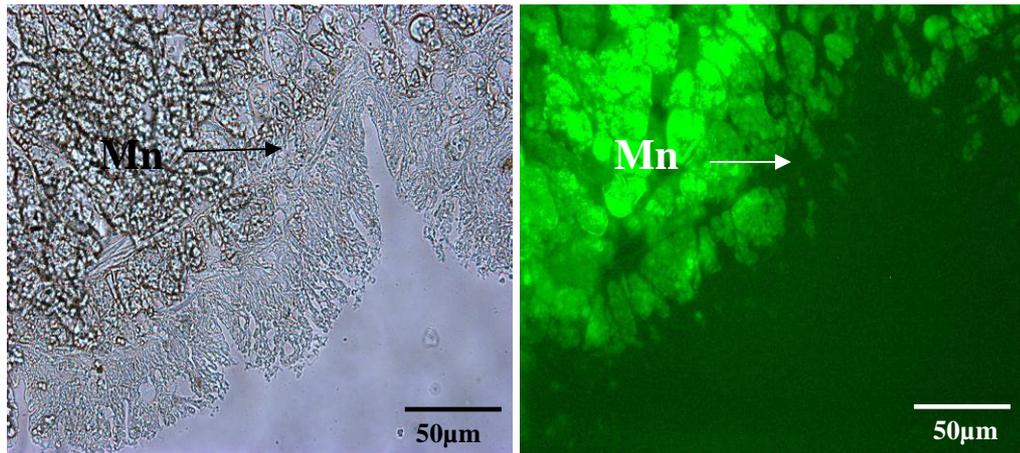


Figura 22. Corte longitudinal a 40X de manto de organismos de concha nácar *Pteria sterna* injertados con manto de un donador común y teñidos con Edu, campo claro (izquierda) y la señal fluorescente de las células en proliferación (derecha) (Mn= Manto).

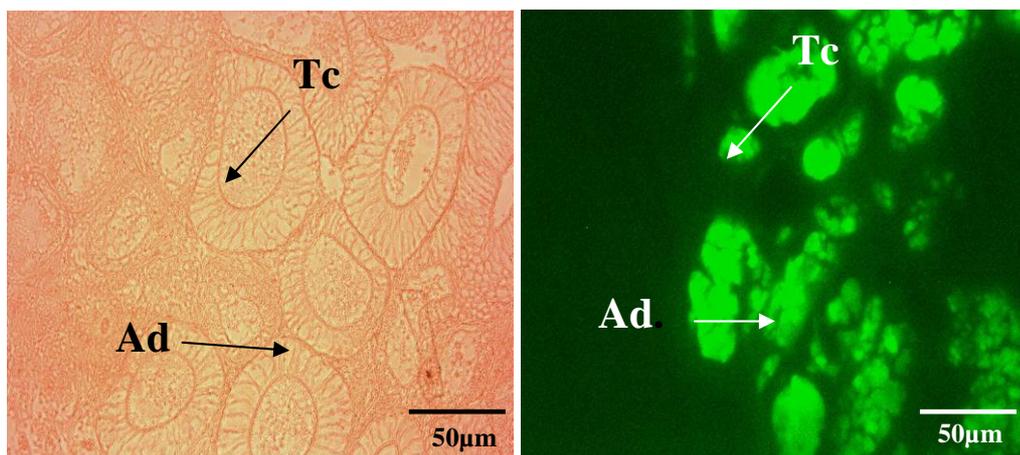


Figura 23. Corte longitudinal a 40X de glándula digestiva de organismos de concha nácar *Pteria sterna* del grupo control y teñidos con Edu, campo claro (izquierda) y la señal fluorescente de las células en proliferación (derecha) (Ad= Adenómero, Tc= Tejido conectivo).

Por otra parte, no se encontraron diferencias visibles en el proceso de proliferación celular durante la formación del saco perlero en los organismos injertados con manto de un donador común y manto propio. Ello debido a que la respuesta fue muy similar en ambos tratamientos (figura 24), tanto para las células del manto donado, como para las de la región gonadal que recibió el injerto (figura 26),

donde intensidad fluorescente como efecto del injerto fue similar. Por el contrario, se detectó una diferencia visual entre estos dos tratamientos y el grupo testigo (figura 25), el cual no presentó una proliferación celular tan marcada por efecto del injerto, ni una señal tan intensa como respuesta a la tinción con EdU. Este patrón ocurrió de la misma forma para las células de la región del manto donado y de la gónada receptora del injerto (figura 27), donde no se pudo confirmar la existencia de proliferación celular que indicara formación del saco perlero, ya que la tinción se extendió a todos los tejidos que se encontraban en regeneración y o restitución celular.

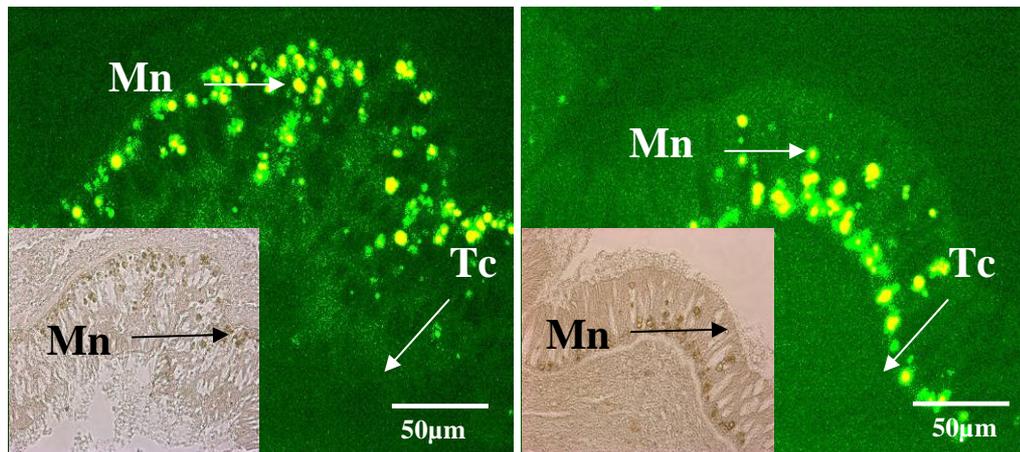


Figura 24. Corte longitudinal a 40X de manto de los organismos de concha nácar *Pteria sterna* injertados con manto de donador común (izquierda) y para organismos injertados con manto propio (derecha) teñidos con EdU. (Mn= Manto, Tc= Tejido conectivo).

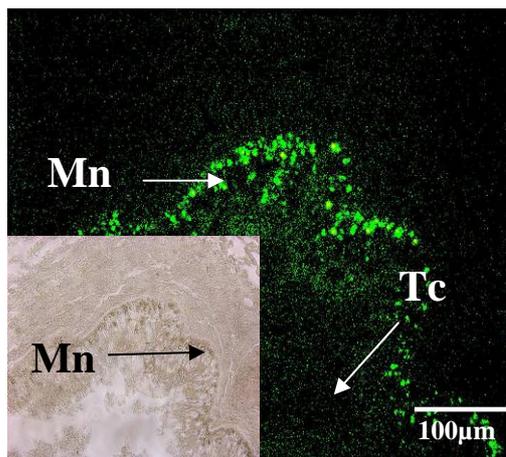


Figura 25. Corte longitudinal a 20X de manto de los organismos de concha nácar *Pteria sterna* del grupo control, teñido con Edu, (Mn= Manto, Tc= Tejido conectivo).

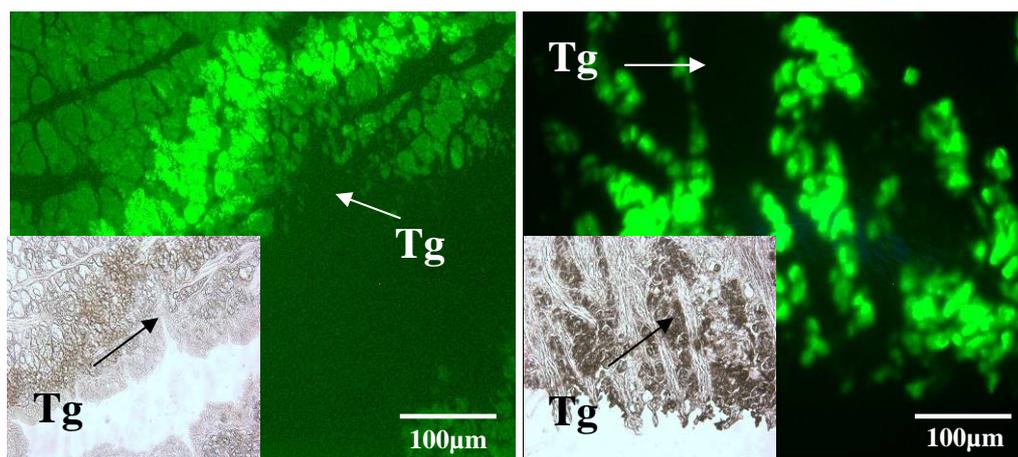


Figura 26. Corte longitudinal a 20X de gónada de los organismos de concha nácar *Pteria sterna* injertados con manto de donador común (izquierda) y para organismos injertados con manto propio (derecha) teñidos con Edu. (Tg= Tejido gonádico).

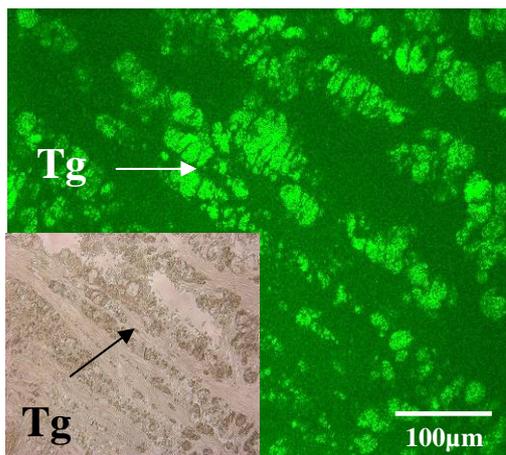


Figura 27. Corte longitudinal a 20X de gónada de los organismos de concha nácar *Pteria sterna*.del grupo control, teñido con Edu, (Tg= Tejido gonádico).

## 7.4. Efecto del injerto de manto en la fisiología reproductiva

### 7.4.1. Desarrollo de la gónada

La figura 28 muestra la proporción de sexos de los organismos del grupo control después de ejecutado el injerto. No se observa existencia de hembras (0%) y la cantidad de machos es reducida (20%), mientras que la mayoría de los organismos se encuentran en una etapa de indiferenciación sexual (80%).

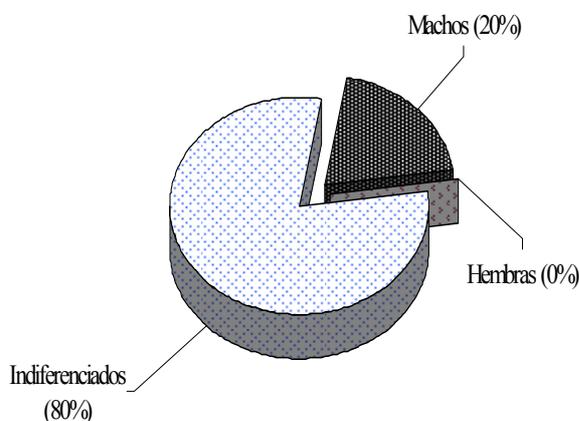


Figura 28. Proporción de sexos de los organismos de concha nácar *Pteria sterna* del grupo control durante los meses comprendidos entre junio a diciembre 2008.

A su vez, la figura 29 presenta las diferentes fases del desarrollo de la gónada de los organismos pertenecientes al grupo control, en donde solo se identificaron tres estadios reproductivos: (1) Organismos indiferenciados (100%, 67%, 100%, 100%, 33%, 33%, 100%) durante todos los meses de junio a diciembre respectivamente, (2) Organismos maduros (33% y 67%) durante los meses de octubre y noviembre y (3) Organismos en post-desove (33%) en los meses de julio y octubre.

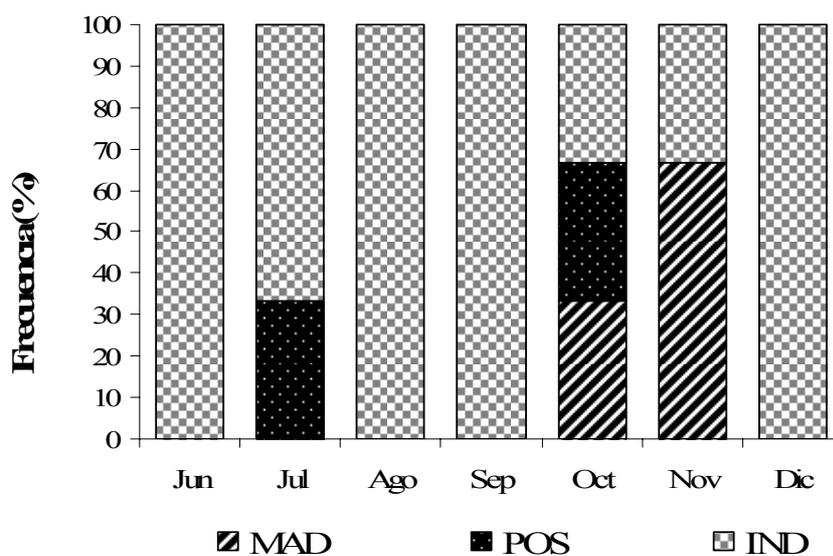


Figura 29. Fases de desarrollo gonádico de los organismos de concha nácar *Pteria sterna* del grupo control durante los meses comprendidos entre junio a diciembre 2008 (MAD= Madurez, POS= Postdesove, IND= Indiferenciados)

A partir de los cortes histológicos de los organismos del grupo control se puede apreciar en la figura 30 las diferentes fases de desarrollo gonádico que se presentaron en dicho tratamiento, siendo la fase de indiferenciación la dominante (a) seguida por la de postdesove (b) y madurez (c).

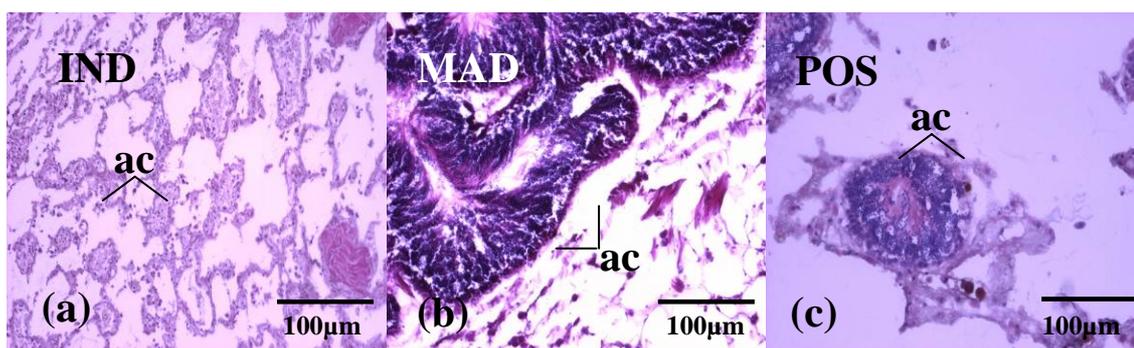


Figura 30. Corte transversal de gónada a 10X de los organismos de concha nácar *Pteria sterna* del grupo control (MAD= Madurez, POS= Postdesove, IND= Indiferenciados, ac= acino).

Para el caso de los organismos injertados con manto de un donador común (figura 31), también se identifica el mismo patrón en cuanto a la proporción de sexos, siendo este grupo el que presenta la mayor relación de organismos indiferenciados (95%), la menor presencia de machos (5%) y una ausencia total de hembras (0%).

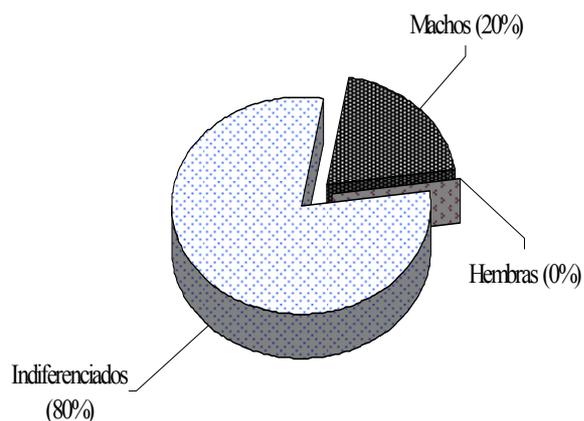


Figura 31 Proporción de sexos de los organismos de concha nácar *Pteria sterna* injertados con manto de donador común durante los meses comprendidos entre junio a diciembre 2008.

Para este mismo tratamiento se puede observar también una dominancia del estadio de indiferenciación a lo largo de todos los meses (100%, 67%, 100%, 100%, 67%, 67% y 100%), con presencia de algunos organismos maduros en los meses de octubre y noviembre (33%) y organismos en post-desove solo para el mes de julio (33%) (figura 32).

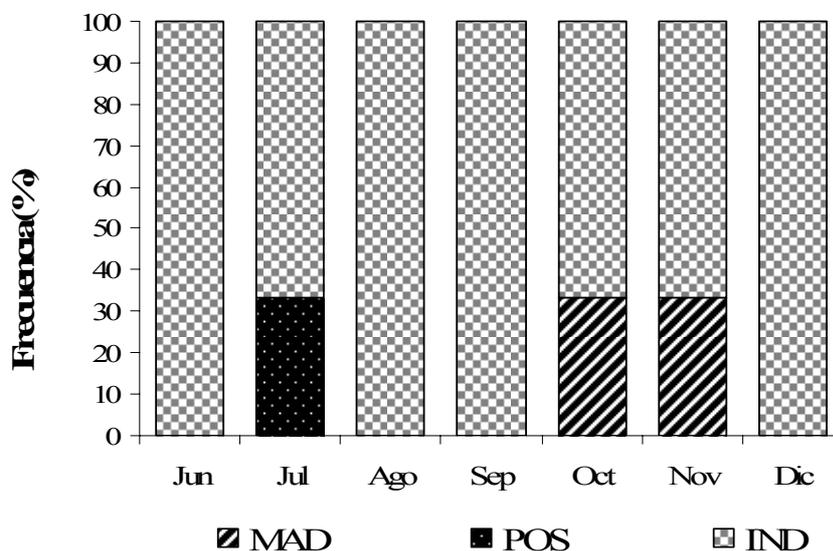


Figura 32. Fases de desarrollo gonádico de los organismos de concha nácar *Pteria sterna* inyectados con manto de un donador común, durante los meses comprendidos entre junio a diciembre 2008 (MAD= Madurez, POS= Postdesove, IND= Indiferenciados)

En la figura 33 se muestra que los organismos pertenecientes al tratamiento que recibió el injerto con manto de un donador común presentan un menor desarrollo gonádico, sin embargo presenta el mismo patrón que el grupo control siendo que la mayoría de los organismos se encuentran en fase de indiferenciación (a), algunos se encuentran maduros (b) y otros con acinos en fase de reabsorción, así como presencia de agregaciones de células fagocíticas o células cafés (c) que indican que el organismo se encuentra en un etapa de post-desove o de reabsorción de gametos.

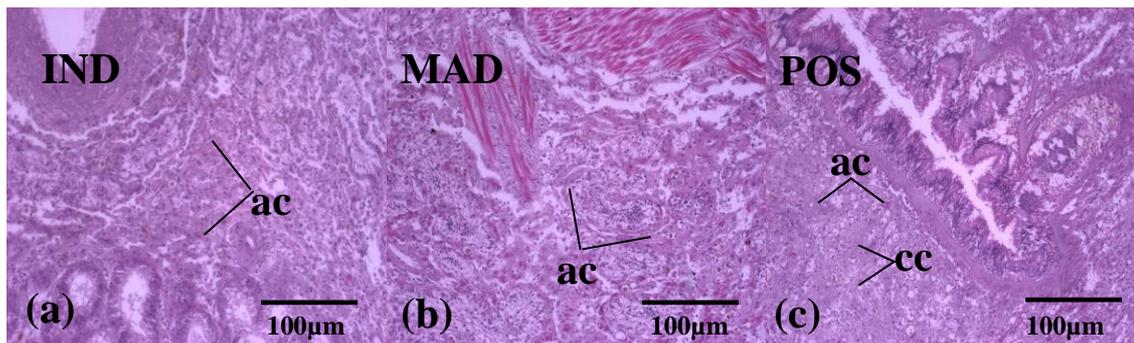


Figura 33. Corte transversal de gónada a 10X de los organismos de concha nácar *Pteria sterna* del tratamiento al que se injertó manto de un donador común (MAD= Madurez, POS= Postdesove, IND= Indiferenciados, ac= acino cc= Células cafés).

En cuanto a la proporción de sexos del tratamiento que recibió manto propio (figura 32), se observa una distribución de sexos similar a las anteriores, con un 90% de organismos indiferenciados, 10% de machos y 0% de hembras.

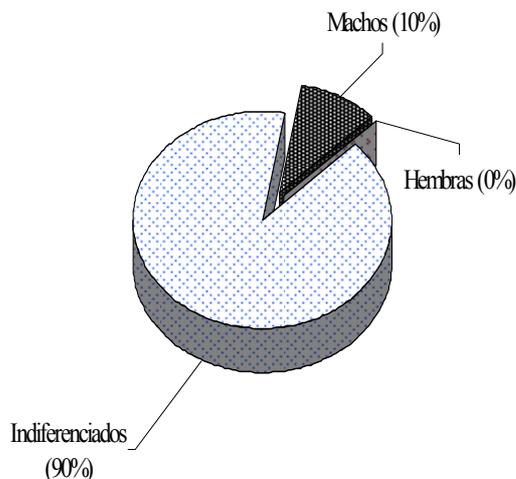


Figura 34. Proporción de sexos de los organismos de concha nácar *Pteria sterna* del tratamiento al que se le injertó manto del mismo organismo durante los meses comprendidos entre junio a diciembre 2008.

Los estadios de desarrollo de los organismos injertados con manto propio (figura 35) muestra que la madurez sexual ocurrió en el mes de noviembre (33%) y el postdesove en julio (33%), mientras que la etapa de indiferenciación se presentó en todos los meses muestreados. En ninguno de los tratamientos experimentales se detectó la presencia de hembras u organismos hermafroditas en periodo de transición.

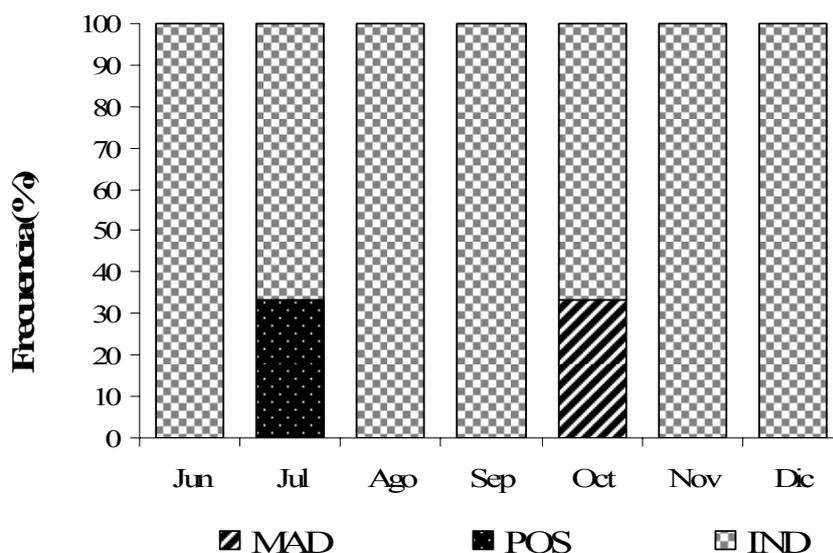


Figura 35. Fases de desarrollo gonádico de los organismos de concha nácar *Pteria sterna* del tratamiento al que se le injertó manto propio, durante los meses comprendidos entre junio a diciembre 2008 (MAD= Madurez, POS= Postdesove, IND= Indiferenciados).

En la figura 36 se muestra que al igual que en los otros dos tratamiento que la mayoría de los organismos se encontraban en una fase indiferenciada, (a), seguida de organismos en postdesove (b) y organismos maduros (c), al igual que en los tratamientos anteriores solo se lograron identificar machos a partir de los cortes histológicos, donde se observan acinos en etapa de reabsorción y/o desarrollo, al igual que algunas células cafés.

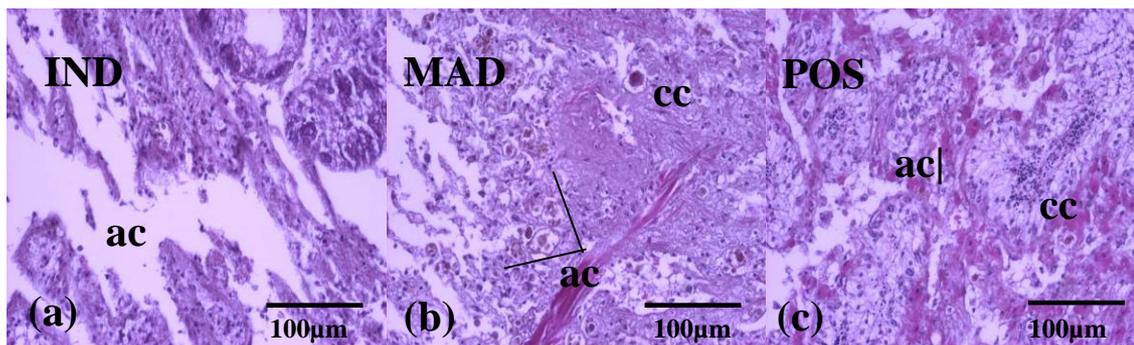


Figura 36. Corte transversal de gónada a 20X de los organismos de concha nácar *Pteria sterna* del tratamiento al que se le injertó manto propio (MAD= Madurez, POS= Postdesove, IND= Indiferenciados, ac= acino cc= Células cafés).

#### 7.4.2. Composición de la gónada y tejidos somáticos

Es importante recordar que debido al problema en la entrega de ciertos reactivos de origen animal que fueron detenidos por varios meses en la aduana de la ciudad de México el año pasado, se generó un retraso en la programación de análisis del presente estudio. Por ello, para la parte de concentración de sustratos metabólicos, se presentan resultados del periodo agosto-diciembre de 2008 únicamente, así mismo es importante mencionar que debido a las mortalidades registradas en los tratamientos y debido al número reducido de las muestras en algunos casos no se lograron obtener muestras suficientes para algunos meses.

La figura 37 presenta las variaciones en la composición promedio de carbohidratos, proteínas, lípidos y triglicéridos del manto de los tres grupos experimentales. Los valores más altos para el contenido de carbohidratos se observaron en los tratamientos a los que se les injertó manto propio (46.84 mg/g), mientras que los valores más bajos se presentaron en el grupo testigo (15.44 mg/g). No se encontraron diferencias significativas en el contenido de este combustible entre tratamientos ( $F=$

107.51,  $p > 0.05$ ), con respecto al tiempo ( $F = 2.46$ ,  $p > 0.05$ ), ni para la interacción entre factores ( $F = 2.95$ ,  $p > 0.05$ ). En el contenido promedio de proteínas, se aprecia que los valores más elevados ocurrieron en el tratamiento que recibió manto de un donador (490.78 mg/g), en tanto que los valores más bajos ocurrieron en tratamiento que recibió manto de un donador (196.76 mg/g), tampoco se encontraron diferencias significativas entre tratamientos ( $F = 0.195$ ,  $p > 0.05$ ), con respecto al tiempo ( $F = 0.408$ ,  $p > 0.05$ ), ni para la interacción entre ambos factores ( $F = 0.074$ ,  $p > 0.05$ ). En cuanto al contenido de lípidos y triglicéridos el tratamiento que recibió manto de un donador presentó el valor más alto para lípidos (112.43 mg/g) y triglicéridos (12.10 mg/g), los valores más bajos de lípidos y triglicéridos se presentaron en el grupo injertado con manto de donador (6.66 mg/g) y el grupo control (8.52 mg/g) respectivamente, no existen diferencias significativas entre tratamientos ( $F = 0.123$ ,  $p > 0.05$  para lípidos y  $F = 1.070$ ,  $p > 0.05$  para triglicéridos), entre los meses ( $F = 0.453$ ,  $p > 0.05$  para lípidos y  $F = 1.561$ ,  $p > 0.05$  para triglicéridos) y con respecto a la interacción de ambos factores ( $F = 0.378$ ,  $p > 0.05$  para lípidos y  $F = 1.339$ ,  $p > 0.05$  para triglicéridos).

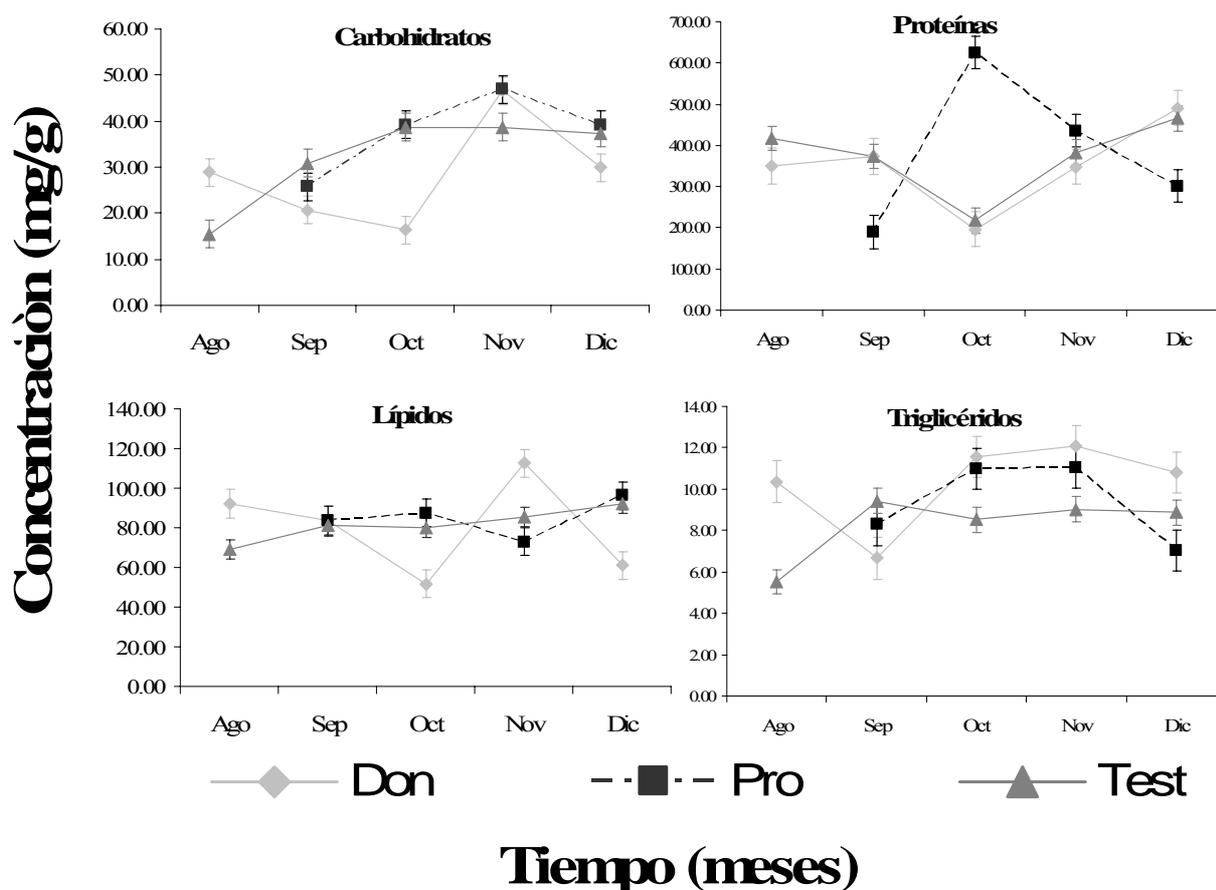


Figura 37. Variaciones mensuales en el contenido promedio de carbohidratos, proteínas, lípidos y triglicéridos del manto de organismos de *P. sterna* para los tres tratamientos experimentales durante el periodo comprendido entre agosto a diciembre 2008 (Don= tratamiento injertado con manto de donador común; Pro= tratamiento injertado con manto propio; Test= grupo control).

Las variaciones en la composición bioquímica del músculo se muestran en la figura 38, los valores más altos para carbohidratos se observaron a el tratamiento al que se injertó manto propio (318.70 mg/g), en tanto que los valores más bajos ocurrieron en el grupo control (38.01 mg/g), no se observaron diferencias significativas entre los tres tratamientos ( $F= 0.868$ ,  $p > 0.05$ ), con respecto al tiempo ( $F= 2.685$ ,  $p > 0.05$ ) o en la interacción de ambos factores ( $F= 2.218$ ,  $p > 0.05$ ). Referente al contenido promedio de proteínas los valores más altos ocurrieron para el tratamiento injertado con manto de un donador común (774.29 mg/g), en tanto que los valores más bajos se encontraron en los

organismos injertados con manto propio (591.15 mg/g), no se encontraron diferencias significativas entre los tres tratamientos experimentales ( $F= 0.117$ ,  $p > 0.05$ ), a lo largo del tiempo ( $F= 0.166$ ,  $p > 0.05$ ) o en la relación de ambos factores ( $F= 0.134$ ,  $p > 0.05$ ). En cuanto al contenido de promedio de lípidos y triglicéridos, se puede observar que los valores más altos de lípidos se registraron en el grupo testigo (139.01 mg/g), y valores de triglicéridos para el grupo testigo (13.69 mg/g), a su vez, los más bajos se registraron en el tratamiento que recibió manto de un donador común (52.65 mg/g) para lípidos y en el grupo testigo (5.14 mg/g) para carbohidratos, las variaciones en el contenido promedio de lípidos tampoco reflejó diferencias significativas entre tratamientos ( $F= 0.154$ ,  $p > 0.05$ ), a lo largo del tiempo ( $F= 0.385$ ,  $p > 0.05$ ) o la interacción entre ambos factores ( $F= 0.316$ ,  $p < 0.05$ ). En el contenido promedio de triglicéridos tampoco se observaron diferencias significativas entre los tres tratamientos ( $F= 1.311$ ,  $p > 0,05$ ) en el tiempo ( $F= 1.068$   $p > 0.05$ ) o en la interacción de ambos factores ( $F= 1.362$ ,  $p > 0.05$ ).

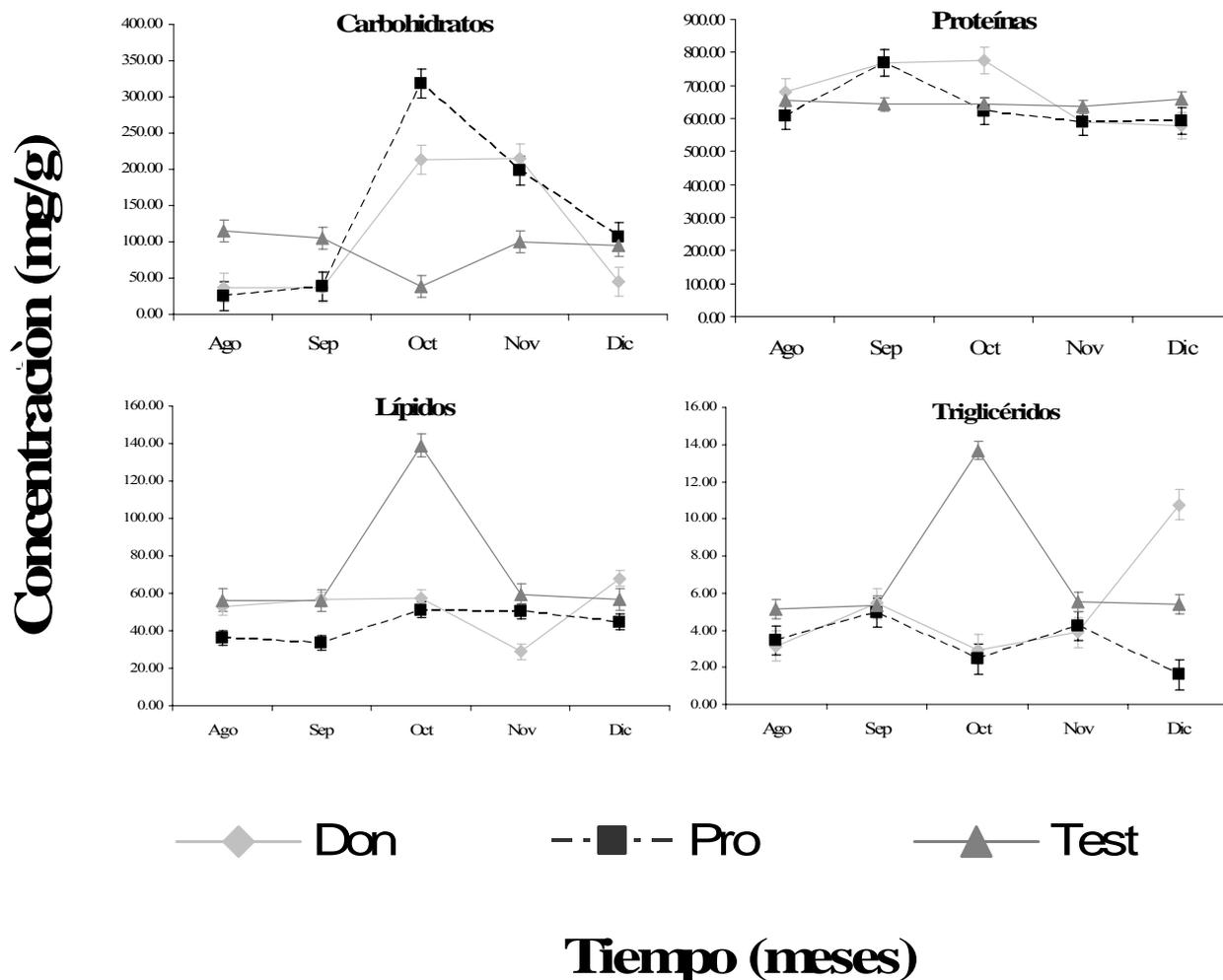


Figura 38. Variaciones mensuales en el contenido promedio de carbohidratos, proteínas, lípidos y triglicéridos del músculo de organismos de *P. sterna* para los tres tratamientos experimentales durante el periodo comprendido entre agosto a diciembre 2008 (Don= tratamiento injertado con manto de donador común; Pro= tratamiento injertado con manto propio; Test= grupo control).

La figura 39 muestra las variaciones en el contenido promedio de carbohidratos, proteínas, lípidos y triglicéridos de la glándula digestiva de los tres tratamientos. Los valores más altos de carbohidratos se presentan en el tratamiento injertado con manto de un donador (71.94 mg/g), mientras que los más bajos en el tratamiento que recibió manto de un donador común (44.55 mg/g). No existen diferencias significativas en este combustible entre tratamientos ( $F= 0.062$ ,  $p > 0.05$ ), en el tiempo ( $F= 2.965$ ,  $p > 0.05$ ) o para la interacción entre ambos factores ( $F= 2.077$ ,  $p > 0.05$ ). En cuanto a las

variaciones en el contenido promedio de proteínas, mostró los valores más altos en el tratamiento que recibió manto de un donador común (826.91 mg/g) y los mas bajos en el que recibió manto propio (221.88 mg/g), en este caso en particular se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos ( $F= 19.98$ ,  $p < 0.05$ ), tal como lo muestra el análisis de Tukey, en donde se puede observar que existen dos grupos homogéneos (Tabla V). Por otra parte, no se encontraron diferencias en las variaciones de este metabolito a lo largo del tiempo ( $F= 0.249$ ,  $p > 0.05$ ), pero si en la interacción de ambos factores ( $F= 22.13$ ,  $p < 0.05$ ). En lo referente al contenido promedio de lípidos los valores más altos se observaron en los organismos que recibieron manto de un donador común (197.93 mg/g) y los más bajos en el grupo testigo (147.7 mg/g), no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos ( $F= 0.056$ ,  $p > 0.05$ ), a lo largo del tiempo ( $F= 2.188$ ,  $p > 0.05$ ), ni en la interacción de ambos factores ( $F= 1.612$ ,  $p > 0.05$ ). En cuanto al contenido promedio de triglicéridos los valores más altos ocurrieron para el tratamiento de injerto con manto propio (64.92 mg/g) y los más bajos en el grupo control (31.29 mg/g), no existen diferencias significativas entre os tres tratamientos ( $F= 0.453$ ,  $p > 0.05$ ), entre los diferentes meses ( $F= 1.888$ ,  $p > 0.05$ ) ni en la interacción de los factores ( $F= 1.432$ ,  $p > 0.05$ ).

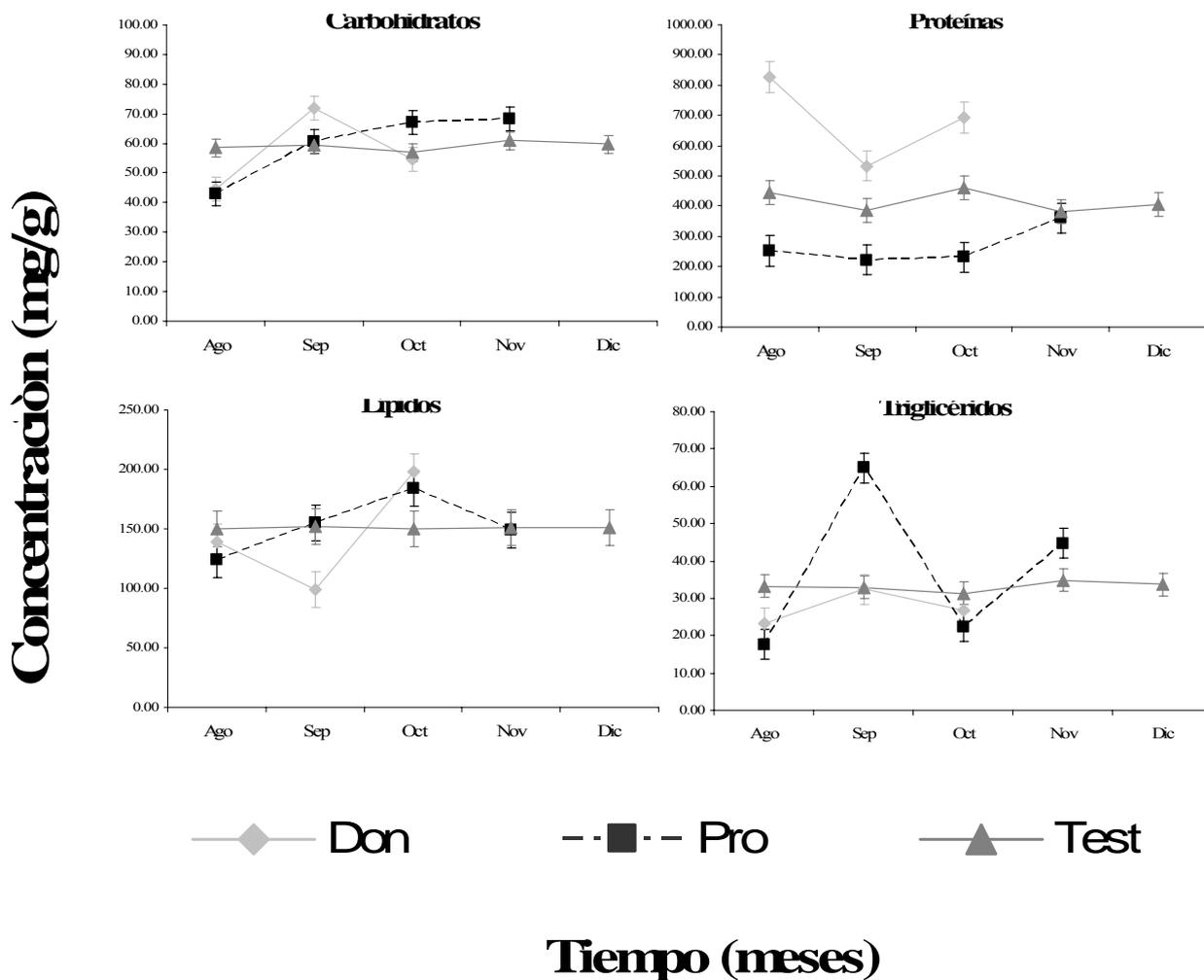


Figura 39. Variaciones mensuales en el contenido promedio de carbohidratos, proteínas, lípidos y triglicéridos del glándula digestiva de organismos de *P. sterna* para los tres tratamientos experimentales durante el periodo comprendido entre agosto a diciembre 2008 (Don= tratamiento injertado con manto de donador común; Pro= tratamiento injertado con manto propio; Test= grupo control).

Tabla V. Análisis de Tukey para identificación de grupos homogéneos y heterogéneos de medias pertenecientes al contenido total de proteínas de la glándula digestiva de los tres tratamientos experimentales.

Tratamiento	1	2
Propio	****	
Donado	****	
Testigo		****

Las variaciones en la composición bioquímica de la gónada se presentan en la figura 40. Los valores más altos para el contenido promedio de carbohidratos se reportaron para el grupo al que se injertó manto de un donador (118.67 mg/g), mientras que los más bajos se observaron en el grupo control (69.94 mg/g). No se encontraron diferencias significativas en este metabolito entre tratamientos ( $F= 0.565$ ,  $p > 0.05$ ), con respecto al tiempo ( $F= 0.366$ ,  $p > 0.05$ ), ni en la interacción de ambos factores ( $F= 0.460$ ,  $p > 0.05$ ). En cuanto al contenido total de proteínas, la concentración fue mayor en el tratamiento injertado con manto propio (814.62 mg/g) y menor en el grupo control (523.01 mg/g), las variaciones en la composición bioquímica no fueron significativas entre los tres tratamientos ( $F= 1.401$ ,  $p > 0.05$ ), a lo largo del tiempo ( $F= 1.473$ ,  $p > 0.05$ ) ni entre ambos factores ( $F= 1.437$ ,  $p > 0.05$ ). El contenido total de lípidos de la alcanzó valores máximos en el el grupo testigo (214.66 mg/g) y mínimos en el grupo de injerto con manto de un donador (26.85 mg/g), tampoco se encontraron diferencias significativas entre los tres tratamientos ( $F= 1.760$ ,  $p > 0.05$ ), en el tiempo ( $F=1.497$ ,  $p > 0.05$ ) o para la interacción de ambos factores ( $F= 2.576$ ,  $p > 0.05$ ). En cuanto al contenido total de triglicéridos las concentraciones máximas se presentaron en el grupo control (61.80 mg/g); a su vez las concentraciones mínimas ocurrieron en los organismos injertados con manto de un donador común (4.03 mg/g), no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos ( $F= 1.903$ ,  $p > 0.05$ ), el tiempo ( $F= 0.655$ ,  $p > 0.05$ ) ni la interacción de factores ( $F= 1.536$ ,  $p > 0.05$ ).

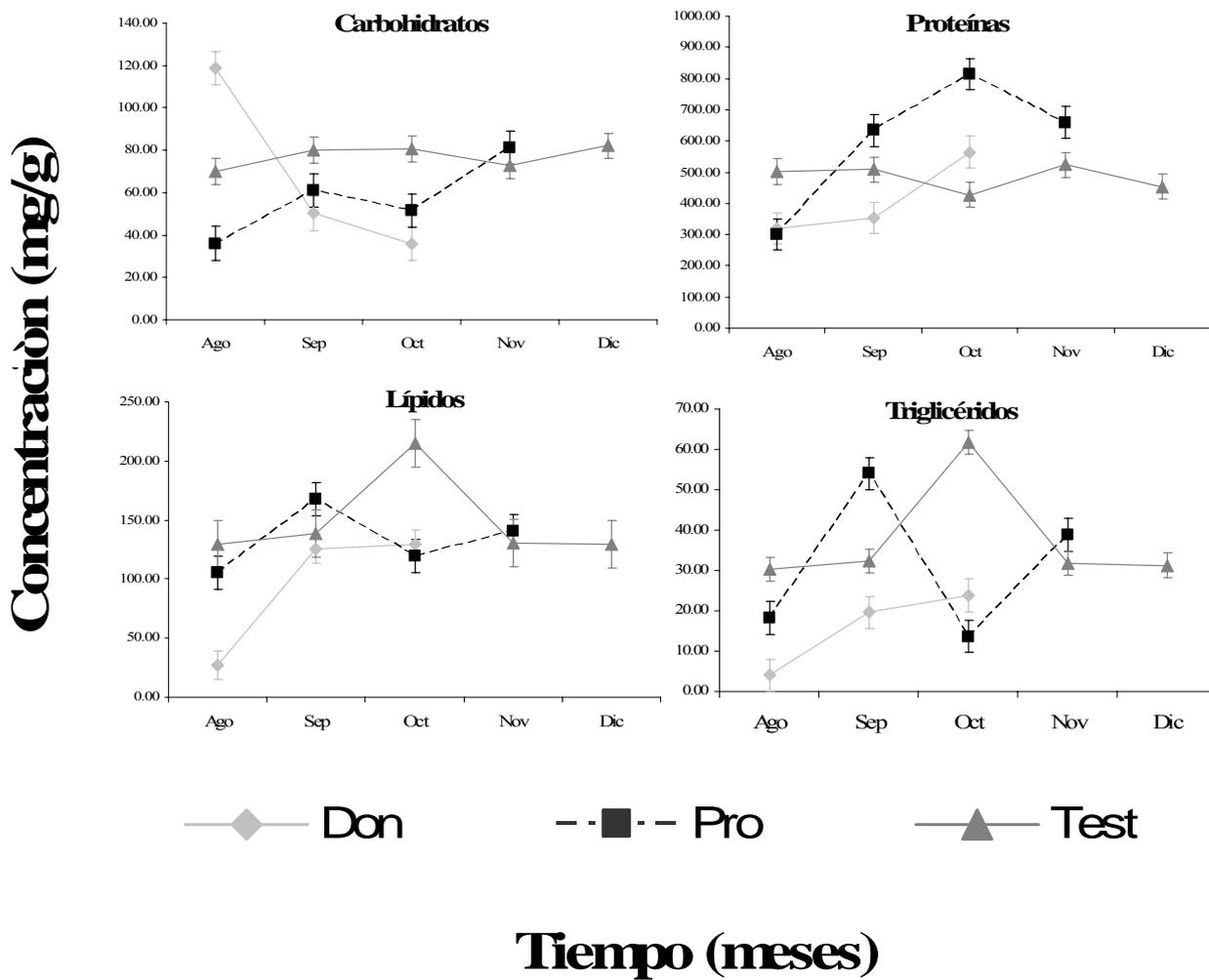


Figura 40. Variaciones mensuales en el contenido promedio de carbohidratos, proteínas, lípidos y triglicéridos de la gónada de organismos de *P. sterna* para los tres tratamientos experimentales durante el periodo comprendido entre agosto a diciembre 2008 (Don= tratamiento injertado con manto de donador común; Pro= tratamiento injertado con manto propio; Test= grupo control).

## 7.5. Efecto del injerto de manto en la tasa de mortalidad y aceptación/rechazo de implantes

### 7.5.1. Mortalidad

La figura 41 muestra las variaciones en la tasa promedio de mortalidad absoluta de los organismos pertenecientes a los diferentes tratamientos experimentales a lo largo de los meses en que se llevo a cabo el estudio. Se encontraron diferencias entre los tratamientos. El grupo testigo fue el que presentó la menor tasa de mortalidad absoluta, con un máximo en el mes de agosto (~20%), seguido del tratamiento al que se injertó manto de un donador común, cuyos picos ocurrieron en agosto y diciembre (~80% en ambos casos) y finalmente el grupo al que se le injertó manto propio, en el que la mortalidad absoluta fue más alta, particularmente en el mes de agosto (~90%).

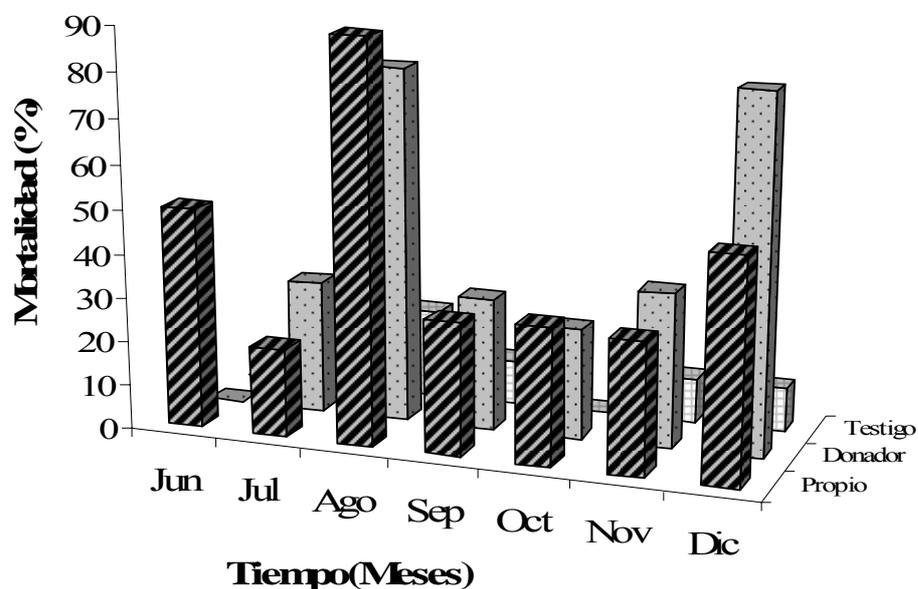


Figura 41. Variaciones en la tasa de mortalidad de organismos de *P. sterna* de los tres tratamientos experimentales durante el periodo comprendido entre agosto a diciembre 2008.

En cuanto a la mortalidad analizada de forma individual para cada uno de los meses (figura 42) se puede observar que para el mes de junio, las mayores mortalidades ocurrieron en el tratamiento injertado con manto propio (~50%), mientras que en los otros dos tratamientos no se reportaron mortalidades para este mes. Para el mes de julio la mayor mortalidad se presentó en el tratamiento que recibió manto de un donador común (~30%), y la mínima se presentó en el grupo testigo (~10%). En el caso del mes de agosto, la mayor mortalidad la presentó el tratamiento al que se injertó manto propio (~90%), la mínima se observó en el grupo control (~10%). Las mayores mortalidades registradas para el mes de septiembre se observaron en ambos tratamientos a los que se injertó manto (~30%), y las mínimas para el grupo testigo (~20%). Las mayores mortalidades para el mes de octubre se presentaron en el tratamiento al que se injertó manto propio (~31%) el grupo control presentó la tasa más baja (~0%). Para el mes de noviembre las mayores mortalidades se registraron para el tratamiento al que se injertó manto de un donador común (~35%), y las menores en el grupo testigo (~10%). Finalmente para el mes de diciembre la mayor mortalidad se observó para el tratamiento injertado con manto de un donador (~80%), y la menor en el testigo (~10%).

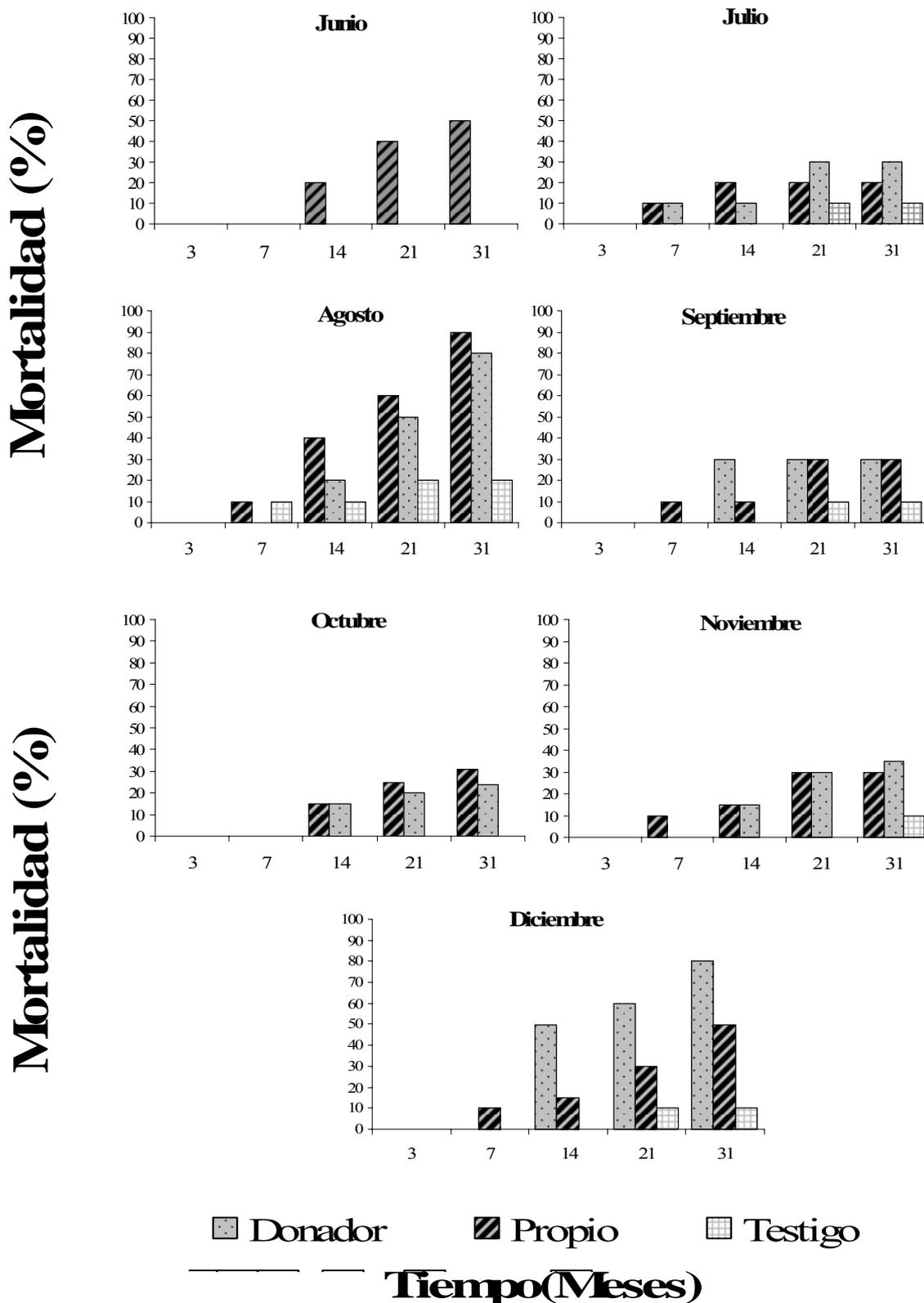


Figura 42. Variaciones en la tasa de mortalidad de los tres tratamientos experimentales durante los días del mes de diciembre 2008.

### 7.6.2. Tasa de aceptación/rechazo

Las variaciones en la tasa de aceptación/rechazo de implantes se presentan en la figura 43 para cada uno de los dos grupos experimentales a los que se injertó manto. Aunque el porcentaje de aceptación más alto ocurrió en el tratamiento al que se le injertó manto propio para el mes de septiembre (~60%), éste estuvo acompañado también del promedio de aceptación más bajo ocurrió en los meses de agosto y diciembre (0 %). Por otro lado, se puede apreciar que los organismos del tratamiento que recibió manto de un donador presentaron valores de aceptación superiores al 50 % en los meses de julio y los más bajos en el mes de diciembre (~0 %).

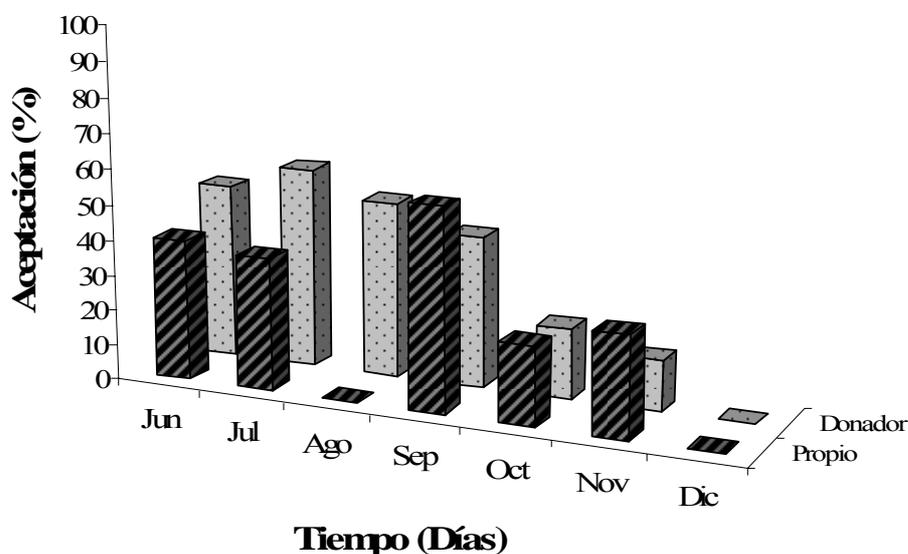


Figura 43. Variaciones en las tasas de aceptación/rechazo de los dos tratamientos a los que se injertó manto, durante el periodo comprendido entre agosto a diciembre 2008.

## 8. Discusión

### 8.1. Efecto del injerto de manto en la respuesta inmune

A la fecha, son pocos los trabajos que han estudiado el sistema inmune de los moluscos bivalvos, particularmente en las ostras perleras sometidas al proceso de injerto de manto para la producción de perlas. Estos incluyen a las principales especies productoras de perlas, como *P. fucata* (Suzuki, 1991; Awaji y Suzuki, 1995; Acosta-Salmón y Southgate, 2006), *P. fucata martensii* (Suzuki y Awaji, 1995) y *P. margaritifera* (Acosta-Salmón y Southgate, 2005). Por el contrario, para el caso de las ostras perleras nativas de México (*P. mazatlanica* y *P. sterna*), no se tiene información de la respuesta inmune por efecto del injerto de manto, ya que el único trabajo sobre el tema se han enfocado a analizar el efecto del injerto de manto en el desarrollo histológico y composición bioquímica de la gónada y tejidos somáticos (Saucedo *et al.*, 2002). De este trabajo se desprendieron dos resultados importantes. Primero, que los organismos injertados maduraban más rápido que los no injertados. Segundo, que el manto injertado en la gónada como parte del procedimiento rutinario para inducir la formación de perlas, provocaba un cambio en los mecanismos naturales de regulación de la gametogénesis, los cuales favorecían a su vez un re-direccionamiento del flujo de energía desde los tejidos de reserva (músculo principalmente y glándula digestiva en segundo lugar) hacia la gónada para acelerar la maduración. En este contexto, el presente estudio estaba dirigido a complementar los resultados anteriores, abordando ahora el efecto del injerto de manto en el sistema inmune (hematopoyesis y regeneración celular para la formación del saco perlero), así como en la fisiología reproductiva (desarrollo y composición de la gónada y tejidos somáticos) y tasas de

aceptación/rechazo de implantes y tasas de mortalidad de la concha nácar. Todo esto partiendo de la hipótesis de que el origen y la época de injerto de manto, tiene un efecto diferencial en la respuesta inmune y mecanismos de regulación de la gametogénesis, los cuales a su vez están controlados por el sistema neuroendócrino de los organismos (Saucedo *et al.*, 2002; Vite-García y Saucedo, 2008) (el cual no se pudo estudiar en este trabajo).

Con respecto al sistema inmune, primeramente se encontró que el efecto del injerto de manto de un donador común generó los conteos más altos de hemocitos en los organismos (2576), particularmente dentro de los primeros 7 días posteriores al injerto. Por el contrario, los conteos más bajos de hemocitos se tuvieron en los organismos del grupo al que se injertó manto propio (1134). Estos resultados podrían deberse al hecho de que el proceso de cicatrización y regeneración celular se inicia a las pocas horas de que el organismo ha sido lesionado durante el injerto, por lo que la velocidad con que éste responde para asegurar su curación está íntimamente relacionada con su condición y tasa metabólica, la cual a su vez está influenciada por los cambios en algunos parámetros ambientales, tales como la temperatura del agua y la disponibilidad de alimento (MacDonald y Thompson, 1985; Thompson *et al.*, 1991). Este resultado coincide con los reportes de Acosta-Salmón y Southgate (2005), quienes determinaron que el proceso de curación, principalmente el sellado de la zona afectada después de la herida tarda aproximadamente 6 horas en sanar y depende en gran medida de la rápida producción de hemocitos, la temperatura del agua y el estado fisiológico del organismo. Es importante considerar el factor adicional al proceso natural de cicatrización que sucede en un proceso de implante donde participan dos individuos, ya que el receptor reconoce al implante como extraño y necesariamente incrementa su respuesta inmune

para protegerse, al tanto que el implante, al estar vivo, reconoce al receptor en similares condiciones y actúa en consecuencia, lo que justifica una elevada producción hematopoyética, difícil de diferenciar en su origen (donador o receptor). Por otro lado, al tener injerto de manto del mismo organismo (donador y transplante del mismo origen), no hay reacción de rechazo y el proceso es menos exacerbado.

Adicionalmente, se observó que las mayores tasas de mortalidades de organismos ocurrieron en los meses cálidos, que es cuando la especie presenta sus niveles de energía más bajos y cuando es más vulnerable al manejo provocado por el injerto (Saucedo y Southgate, 2008; Cáceres-Puig *et al.*, 2009). De hecho, el injerto es, *per se*, un proceso invasivo que demanda a los organismos una gran cantidad de energía, la cual debe asegurar, no solo la cicatrización de la zona afectada, sino la regeneración por multiplicación mitótica de células que formaran lo que se conoce como saco perlero (Suzuki, 1991; Awaji y Suzuki, 1995; Suzuki y Awaji, 1995). Además, otra parte de la energía asimilada y disponible tiene que ser utilizada para la realización de los procesos metabólicos de crecimiento, reproducción y mantenimiento de la maquinaria enzimática (Newell y Branch, 1980; Barber y Blane, 2006). Los resultados obtenidos en este trabajo referente a las altas tasas de mortalidad de *P. sterna* en meses cálidos coinciden con las observaciones de Cáceres-Puig *et al.* (2009), quien sugiere que el esfuerzo reproductivo de esta especie para iniciar la gametogénesis es muy alto (~200%), por lo que el injerto para fines de producción de perlas debe realizarse en los meses fríos de invierno y primavera (noviembre a marzo), o bien en aquellos meses en los que los organismos ya están maduros (noviembre a febrero) y no deben canalizar tanta energía para el inicio y sustento de la gametogénesis (Vite-García y Saucedo, 2008). Esto demuestra que, además de la importancia del manto para el

proceso de formación de perlas, es importante tener en cuenta la fecha en que se realizan los injertos, considerando el elevado costo energético al que se ven sometidos los organismos. Para una mayor comprensión de los efectos de los factores ambientales, particularmente temperatura y disponibilidad de alimento, sobre la respuesta y condición de los moluscos bivalvos, se puede consultar a MacDonald y Thompson (1985), Thompson *et al.* (1991), Delaporte *et al.* (2003); Delaporte *et al.* (2006), etc.

Como complemento de los resultados arriba referidos, se observó también que la época en la que se realizaron los injertos tuvieron un efecto marcado en la producción de hemocitos, probablemente por efecto de los valores de temperatura del agua y concentración de alimento registrados en ese momento. Al respecto, es importante mencionar que los hemocitos son los principales componentes del sistema inmune de los moluscos bivalvos y se pueden observar dos tipos de hemocitos, granulares y agranulares, siendo los agranulares los que presentan un gran habilidad fagocítica por lo que son el primer tipo de células que aparecen en el sitio de la herida y en el caso de las ostras perleras que son injertadas con un agente externo (manto de un donador común), son los encargados de dar protección sistémica, de evitar la pérdida de sangre al funcionar de forma análoga a las plaquetas de los invertebrados (Suzuki y Awaji, 1995) y de asegurar la cicatrización y regeneración celular (Acosta-Salmón y Southgate, 2005). Además, se ha reportado que los hemocitos presentan concentraciones bajas en los meses templados del año e incrementan su número en los meses subsecuentes dependiendo de la temperatura, disponibilidad de alimento y la reabsorción de gametos (Delaporte *et al.*, 2006; Delaporte *et al.*, 2007). Los resultados obtenidos en este estudio en cuanto al número de hemocitos presentes en los tratamientos en los que se injertó

manto sugieren una relación directamente proporcional con la temperatura del agua (figuras 12 y 14), independientemente de su origen (donado o propio).

Por otra parte, Acosta-Salmón y Southgate (2005) mencionan que la regeneración del manto es un proceso energéticamente costoso para las ostras perleras y está estrechamente relacionado con los patrones estacionales de almacenamiento de nutrientes. Ello debido a que el manto es, *per se*, uno de los sitios en donde se almacenan nutrientes para el sustento de la reproducción en muchas especies de bivalvos (Barber y Blake, 1991; Lodeiros *et al.*, 2001; Arellano-Martínez *et al.*, 2004; Saucedo y Southgate, 2008). Por ello, la velocidad de regeneración celular en la zona del injerto, independientemente del origen del manto, se verá influenciada, por la cantidad de nutrientes almacenados en este tejido al momento de la herida. Esto coincide con lo reportado previamente por Saucedo *et al.* (2001) en torno al efecto modulador de la gametogénesis que ejerce el manto injertado en la madreperla *P. mazatlanica*. A su vez, este resultado se puede constatar analizando los bajos conteos de hemocitos en el tratamiento al que se injertó manto propio, además de las altas tasas de mortalidad registradas en los organismos de dicho tratamiento (~90%).

A la fecha, no se sabe a ciencia cierta cómo funciona el sistema inmune de las ostras perleras posterior al injerto de manto, a pesar de que se han realizado trabajos dirigidos a la identificación del órgano o tejido encargado de la producción, regulación y activación de las células del sistema inmune (Suzuki, 1991; Awaji y Suzuki, 1995; Suzuki y Awaji, 1995). En general, estos autores sugieren que la glándula digestiva y/o el tejido conectivo del canal digestivo pudieran ser los encargados de regular alguno o todos estos procesos fisiológicos.

En el presente trabajo se pudo observar la función del sistema inmune de las ostras, a partir de la inyección de acetato de fluoresceína, ya que esta permitió observar la ruta que toman los patógenos, antígenos o factores externos que pueden llegar a dañar a las ostras. En el caso de los organismos a los que se inyectó ésta en el músculo aductor, se logró detectar una señal fluorescente en las heces fecales (figura 16), lo cual pudiera ser el resultado de la eliminación del reactivo por parte del organismo, sin existir una asimilación, pasando a través del músculo hacia el sistema linfático y de ahí hasta el sistema digestivo y posteriormente a las heces. Caso contrario es lo que se ocurrió con los organismos a los que se les inyectó acetato de fluoresceína en la zona de la gónada, que es la zona donde normalmente se realizan los injertos para la producción de perla libre. En este caso, no se logró distinguir ninguna señal fluorescente en las heces fecales, lo que sugiere que el reactivo fue asimilado en este tratamiento, probablemente por efecto de una asimilación activa, inducida por las células del sistema inmune, (Dongen *et al.*, 1987; Kurki *et al.*, 1988; Hanselman y Smolowitz, 2000; Fang *et al.*, 2008), al analizar la respuesta de las células hematopoyéticas de vertebrados en diferentes etapas de desarrollo y bajo diferentes estímulos, en este sentido, no existen estudios previos con moluscos y mucho menos con bivalvos como es el caso de las ostras perleras que se utilizaron en este estudio, por otra parte estos autores solo han analizado esta respuesta en algunos tejidos como el tejido cerebral y tejido ocular, señalando que, dependiendo del tipo de estímulo al que se vean expuestos dichos tejidos, será la respuesta del sistema inmune y de ahí el tipo de proliferación celular, como podrían ser inmunoglobulinas, linfocitos, células T, células B, natural killer, etc., en el caso de vertebrados, cabe mencionar que hasta el momento no se había utilizado este tipo de reactivo en organismos completos como es el caso de este estudio, por lo

que, los resultados obtenidos son de suma importancia, pues es a partir de estos que se puede inferir que dependiendo el estímulo y el tejido donde se lleva a cabo, será la respuesta del organismos, induciendo o no a la activación de las células del sistema inmune y como en el caso de los moluscos la regulación del sistema inmune depende por completo de los hemocitos, es que se puede inferir que debido a la asimilación que se observo existen rutas metabólicas específicas que permiten la asimilación o eliminación del reactivo, dependiendo del tipo de estímulo, tal y como se observa en las figuras 16 a 20, ya que después de haber inyectado el acetato de fluoresceína este se incorporo en todos los tejidos, del tratamiento al que se inyectó en la gónada. Este hallazgo permite reforzar el supuesto de que tanto la glándula digestiva, como el tejido conectivo del canal digestivo, tienen un papel muy importante en la regulación y activación de las células del sistema inmune de las ostras perleras (Suzuki y Awaji, 1995).

En términos de proliferación celular posterior al injerto de manto (propio o donado), se observó que las células hematopoyéticas (hemocitos) presentes en el pericardio, se activaron como respuesta al injerto, provocando a su vez la activación y la proliferación de otro tipo de células, particularmente las del manto, glándula digestiva y gónada que se encuentran sujetas a una elevada tasa de división y replicación celular natural (Suzuki, 1991). Esto fue claro en especial en los cortes histológicos de los organismos del grupo control (figuras 23, 25 y 27), pero también en aquellos injertados con manto proveniente de un donador común (figuras 24 y 26), donde se esperaría por lógica una mayor tasa de proliferación a partir del injerto. En estas últimas dos figuras se muestra que el manto injertado incrementa el número de células en los tejidos de los organismos, lo cual se ve reflejado en una señal fluorescente mucho más marcada que la

del grupo testigo. Ello confirma que la proliferación celular se activa por efecto de la herida provocada al momento de realizar el injerto de manto en la gónada (Suzuki, 1991; Awaji y Suzuki, 1995; Suzuki y Awaji, 1995; Acosta-Salmón y Southgate, 2005; Delaporte *et al.*, 2006; Delaporte *et al.*, 2007). Así mismo, permite observar que la principal diferencia en la respuesta hematopoyética como efecto del injerto de manto, entre los dos tratamientos el de un donador común y el de manto de propio, reside en la cantidad de hemocitos que se generan posteriores a la operación de injerto, al mismo tiempo que se puede observar que en el caso de los organismos pertenecientes al tratamiento de manto propio, a pesar de tener un mayor número de células hematopoyéticas y una mayor tasa de proliferación celular, la cual se puede deducir, debido a una mayor intensidad de la señal fluorescente que se observa a partir de la adición de EdU (figuras 24 y 26), es este grupo el que presenta el mayor número de organismos muertos como resultado del injerto, esto se debe principalmente al gran gasto de energía al que se ven sometidos, pues de primera instancia los organismos no tienen las reservas suficientes, ni la energía necesaria para sobrellevar dicho estrés, en inicio por la temperatura del agua de los meses en los que se realizó el estudio, segundo, por que como ya se mencionó el proceso de cicatrización y regeneración celular es un proceso con un elevado gasto energético y en especial en este tratamiento pues hay que recordar que además de la cicatrización y regeneración de la herida provocada como resultado del proceso de injerto para la producción de perlas, esta además, el proceso de cicatrización y regeneración del manto que se extrajo para obtener el tejido necesario para el proceso de injerto, al respecto se sabe que esta cicatrización tarda de 60 a 90 días para que el manto extraído quede completamente restituido (Acosta-Salmón y Southgate, 2005), por lo que es de esperar que si el organismo no cuenta con las

reservas energéticas suficientes, no será capaz de recuperarse de la operación y extracción del manto.

Debido al bajo número de organismos muestreados posterior al injerto, no se logró confirmar el tiempo en el que se forma el saco perlero en la concha nácar *P. sterna*. Reportes previos señalan que esta estructura se forma al día 14 en *P. fucata* (Suzuki, 1991; Awaji y Suzuki, 1995; Acosta-Salmón y Southgate, 2006), al día 14 a 21 en *P. fucata martensii* (Suzuki y Awaji, 1995) y al día 21 en *P. margaritifera* (Acosta-Salmón y Southgate, 2005). Lo que si se logró determinar es que el proceso de cicatrización de la herida ocurrió dentro de los primeros 7 a 14 días posteriores al injerto, que fue cuando el número de hemocitos comenzó a disminuir, hasta alcanzar los niveles más bajos para los días 30–31. Este dato si coincide con lo reportado para las diversas especies de ostras perleras. Las bajas tasas de aceptación y retención de injertos registrados a lo largo del experimento, coincide con los resultados obtenidos previamente (Vite-García y Saucedo, 2008; Cáceres-Puig *et al.*, 2009), donde los autores proponen que las altas tasas de mortalidad y por ende las bajas tasas de aceptación/rechazo pueden deberse al hecho de que, es en los meses de marzo a septiembre, que son los más cálidos, cuando los organismos están más gastados energéticamente como resultado de la activa canalización de reservas que dan continuidad al proceso reproductivo.

## 8.2. Efecto del injerto de manto en la fisiología reproductiva

A la fecha, existen numerosos estudios y revisiones sobre la biología y fisiología reproductiva de moluscos bivalvos de importancia comercial, los cuales incluyen a las familias Ostreidae, Mytilidae, Pectinidae (Bayne, 1976; Seed, 1976; Andrews, 1979; Giese y Pearse, 1979; Sastry, 1979; Mackie, 1984; Román *et al.*, 2002; Barber y Blake, 2006) y Pteriidae (Desai *et al.*, 1979; Gervis y Sims 1992; Saucedo *et al.*, 2002; Vite-García, 2005; Vite-García y Saucedo, 2008; Saucedo y Southgate, 2008; Cáceres-Puig *et al.*, 2009). De estos estudios se han logrado identificar algunas de las estrategias utilizadas por las especies para la asimilación, almacenamiento y uso de energía para procesos de crecimiento somático y reproducción, así como la relación de estos procesos con la dinámica ambiental. En el caso en particular de la familia Pteriidae (ostras perleras), se ha reportado que las especies nativas de la Bahía de La Paz habitan en una zona de transición entre el ambiente cálido templado y el frío templado (zona subtropical), por lo cual las estrategias reproductivas suelen ser diferentes a las utilizadas por las especies de cualquiera de los ambientes tropical o templado (Saucedo y Southgate, 2008).

Los resultados de este estudio demostraron que los organismos recolectados entre junio y diciembre se encontraban mayormente en estadios de indiferenciación sexual y post-desove, y un pequeño porcentaje en estadios de desarrollo y madurez (entre octubre y noviembre), independientemente del grupo experimental al que pertenecieran. Estos resultados coinciden con la mayoría de los reportes anteriores sobre la reproducción de la especie (Saucedo y Moteforte 1997; Vite-García y Saucedo, 2008; Cáceres-Puig *et al.*, 2009), en los cuales se menciona que a pesar de que *P. sterna* presenta desoves parciales a lo largo del año, lo hace con mayor intensidad en dos picos

reproductivos, uno en los meses fríos de enero-febrero cuando la temperatura del agua oscila entre los 20–22 °C aproximadamente y el segundo en los meses templados de abril-mayo a temperaturas entre los 23 y 25 °C aproximadamente. Como se ha mencionado anteriormente, en este estudio se seleccionó la temporada junio a diciembre 2008 como ideal para la realización de los injertos, considerando que era cuando la especie se encontraba energéticamente más fuerte para soportar el estrés generado por la manipulación, anestesia y cirugía (Cáceres-Puig *et al.*, 2009).

Por otro lado, al comparar los resultados de desarrollo gonadal entre los tres tratamientos experimentales, se obtuvo que los organismos del grupo control (sin injerto) alcanzaron los mayores porcentajes de madurez (33% y 67% durante los meses de octubre y noviembre), en comparación con aquellos injertados con manto de un donador común (33% en los meses de octubre y noviembre) y con manto propio (33% para el mes de noviembre). Aunque estos resultados confirman que el injerto generó efectivamente un estrés que retraso ligeramente el desarrollo de las gónadas, rechaza la hipótesis de trabajo del presente estudio y contradice las observaciones previas efectuadas por Saucedo *et al.* (2001) para *P. mazatlanica*, en el sentido de que el manto injertado en área de la gónada potenciaba la maduración de la misma. Por otro lado, las proporciones sexuales fuertemente sesgadas hacia la presencia de machos en los tres tratamientos experimentales (~85%) confirman las observaciones hechas previamente para las ostras perleras obtenidas de cultivo extensivo, en las cuales las altas densidades (posiblemente estresantes) favorecen la formación del sexo que es energéticamente menos costoso, los machos (Saucedo *et al.*, 2002; Gómez-Robles y Saucedo, 2005; Vite-García y Saucedo, 2008, Gómez-Robles y Saucedo, 2009). Esta misma tendencia hacia la producción de machos en condiciones de cultivo extensivo ha sido confirmada

para otras especies de ostras perleras, como *P. margaritifera* recolectada de cultivo extensivo en la Isla Orpheus, Townsville, Australia (Acosta-Salmón *et al.*, 2005) y *P. penguin* nativa de Tailandia (Arjarasirikoon *et al.*, 2004) y la Isla de Tonga (Dr. Paul Southgate, com. pers.).

Otra posible explicación a las diferencias en el grado de desarrollo de la gónada de los organismos injertados con manto (sea donado o propio) con respecto a los del grupo control implica una reabsorción parcial de gametos como una posible estrategia para compensar el déficit energético que demandaba la cicatrización de la herida. Ello tomando en cuenta que la gametogénesis en bivalvos representa un proceso de alta demanda energética (Epp *et al.*, 1988; Barber y Blake, 2006) y los organismos utilizan diferentes estrategias para asegurar el suministro de energía, ya sea a partir de la ingesta de alimento (lo que conlleva una estrategia oportunista), de las reservas almacenadas en tejidos somáticos (como una estrategia conservadora), o de ambas fuentes (Gabbott, 1975; Bayne, 1976; Epp *et al.*, 1988; Pazos *et al.*, 1997; Racotta *et al.*, 1998; Saucedo *et al.*, 2002; Barber y Blake, 2006; Southgate y Lucas, 2008). Para el caso de *P. sterna*, se ha reportado que la energía necesaria para la gametogénesis proviene de la combinación de estrategias conservadoras y oportunistas que aseguran la reproducción a lo largo de casi todo el año, particularmente en los picos de invierno y primavera. Debido a ello, el proceso de reabsorción de gametos en los organismos injertados con manto propio o donado podría corroborarse por la presencia de numerosas células cafés, ya que éstas constituyen agregaciones de fagocitos que intervienen en los procesos de reciclamiento de nutrientes hacia el final de un ciclo reproductivo, pero también en la defensa y respuesta inmune ante agentes exógenos, en este caso el manto injertado (Gray, 1992; MacKay, 1993; Sarasquete *et al.*, 1997; Acosta-Salmón y Southgate, 2005).

En lo que respecta al efecto del injerto de manto en la composición bioquímica de los organismos, no se observaron diferencias significativas en los flujos de energía desde los tejidos de reserva (glándula digestiva, músculo aductor y manto) hacia la gónada en ninguno de los tres grupos experimentales. Nuevamente, esto rechaza la hipótesis de estudio y contradice lo reportado por Saucedo *et al.* (2001), quienes observaron en *P. mazatlanica* un mayor flujo de energía (medida en términos de variaciones en los niveles de proteínas y carbohidratos) desde el músculo aductor (primeramente) y glándula digestiva (en segundo lugar) hacia la gónada en los organismos injertados con manto, en comparación de los organismos del grupo control. Estos autores sugieren que al realizar el injerto de manto en la zona de la gónada se puede alterar alguna de las rutas metabólicas involucradas en la regulación natural de la gametogénesis, provocando un re-direccionamiento en el flujo de energía de los tejidos somáticos a la gónada, dando como resultado un desarrollo gonádico más rápido en organismos injertados que en organismos no injertados. A pesar de que no se observaron diferencias importantes entre grupos en este sentido, si hay resultados puntuales que vale la pena comentar. Por ejemplo, el contenido total de proteínas del músculo aductor disminuyó en los organismos de los dos tratamientos a los que se injertó manto, principalmente manto de un donador común y en los meses de noviembre y diciembre, que es cuando la temperatura del agua comienza a disminuir y se evidencia el pico reproductivo de invierno. Esto estuvo acompañado de un incremento en el contenido total de lípidos y triglicéridos de la gónada en el mes de noviembre.

Igualmente, en los organismos de ambos grupos injertados con manto (propio y donado), este mismo patrón de flujo de energía de tejidos somáticos a la gónada generó una disminución en el contenido total de proteínas de la glándula digestiva, el cual

estuvo acompañado de un aumento en la concentración de lípidos y triglicéridos de la gónada. Esto fue particularmente evidente para los triglicéridos del mes de septiembre en los organismos del tratamiento injertado con manto propio, a diferencia de los otros dos tratamientos. Este resultado confirma que la glándula digestiva (primeramente) y el músculo aductor (en segundo lugar) son los principales reservorios de energía para cubrir las necesidades del proceso reproductivo en *P. stera*. De hecho, se ha reportado para esta especie que la energía canalizada para activar y sustentar la gametogénesis proviene mayormente de las reservas almacenadas en la glándula digestiva (~35%) y en menor proporción del músculo aductor (~28%) (Vite-García y Saucedo, 2008; Cáceres-Puig *et al.*, 2009).

Los resultados de composición bioquímica de tejidos sugieren que el manto también actúa como reservorio de energía para la gametogénesis, independientemente del grupo experimental del que se trate. Ello debido a que se detectaron bajos niveles de proteínas en el manto para los meses de septiembre en el tratamiento al que se injertó manto propio y octubre en el tratamiento al que se injertó manto de un donador común, al mismo tiempo que se incrementaban los niveles de triglicéridos en la gónada, particularmente para el mes de octubre en ambos tratamientos a los que se injertó manto. Sin embargo, a pesar de esta tendencia, los valores de concentración de sustratos energéticos de este tejido sugieren que el manto es el último tejido del que hacen uso los organismos para obtener energía para el desarrollo gonádico o para reconstituir los tejidos dañados y atacar los antígenos que se presentan como resultado del proceso de injerto. Al respecto, numerosos autores han señalado que el manto en bivalvos participa de una forma secundaria o insignificante en el almacenamiento de nutrientes utilizados durante la gametogénesis en especies como almejas pectínidas (Sastry y Blake, 1971;

Ansell, 1974; Comely, 1974; Taylor y Venn, 1979; Barber y Blake, 1981, 1983, 1991; Robinson *et al.*, 1981; Epp *et al.*, 1988; Couturier y Newkirk, 1991; Besnard, 1991; Martínez, 1991; Martínez y Mettifogo, 1998; Pazos *et al.*, 1997; Racotta *et al.*, 1998; Lodeiros *et al.*, 2001; Racotta *et al.*, 2003; Arellano-Martínez *et al.*, 2004), en mejillones (Gabbott, 1975, 1976, 1983; Bayne, 1976; Zandee *et al.*, 1980; Bayne *et al.*, 1982), y en menor grado en ciertas especies de ostras perleras (Desai *et al.*, 1979; Saucedo *et al.*, 2002; Vite-García, 2005; Vite-García y Saucedo, 2008; Cáceres-Puig *et al.*, 2009) y ostiones (Kang *et al.*, 2000). Por el contrario, otros autores han encontrado que el manto si participa de manera activa durante el proceso reproductivo, aunque en menor medida que el músculo aductor y la glándula digestiva, en algunas especies como *Nodipecten subnodosus* (Arellano-Martínez *et al.*, 2004) y *Pteria sterna* (Cáceres-Puig *et al.*, 2009).

De particular importancia fueron las variaciones en la composición bioquímica del músculo aductor, gónada y glándula digestiva en los organismos que recibieron manto de un donador común, las cuales fueron más elevadas que en los tratamientos al que se injertó manto propio y al grupo control. Al relacionar estos resultados con los relativos a los conteos de hemocitos, los cuales fueron más altos en el grupo de manto de un donador común, se confirma nuevamente que el proceso de defensa contra un agente reconocido como ajeno o no compatible, así como el proceso de cicatrización de la herida, requirió un mayor aporte de energía de los sustratos energéticos provenientes de los diferentes tejidos somáticos, a diferencia del otro tratamiento que también recibió injerto de manto propio, en el cual estos valores fueron más bajos. Debe recordarse que debido a que los tiempos en los que se realizó este experimento son considerados no reproductivos, los organismos seguramente canalizaron los mayores flujos de energía disponible hacia el crecimiento somático (MacDonald y Thomposon, 1985; Thompson

*et al.*, 1991), independientemente del origen del manto injertado. A partir de esto, se puede inferir que existe una compatibilidad de tejidos en esta especie, en el entendido de que el injerto de manto para la producción de perla libre es análogo a un trasplante de órgano en este tipo de organismos. A su vez, se asume que el sistema inmune, al tener gran eficacia para reconocer como extrañas a las células procedentes de otros individuos, se encargará de eliminarlas en el menor tiempo posible, dado que este es su principal objetivo. Por ello, es de esperar que los organismos injertados con manto de un donador común destinen mayor cantidad de energía para reducir el tiempo de exposición ante el antígeno y así poder erradicarlo, en comparación con los organismos injertados con manto propio, en los cuales el tejido es reconocido como propio y no es necesario canalizar tanta energía para eliminarlo, ya que no representa una amenaza para el organismo (Barrett *et al.*, 2003; Martínez y Rosen, 2005).

Por otro lado, los organismos de los dos grupos sometidos al proceso de injerto para la producción de perla libre sufrieron altas tasas de mortalidad de hasta un ~90% (figura 41) y bajas tasas de aceptación y retención de núcleos de no más del ~50% (figura 43) durante los meses más cálidos de junio a septiembre particularmente. Como ya se discutió, esto es casi seguro que se deba a la vulnerabilidad energética en la que se encuentran los organismos en estos meses, debido a las altas temperaturas del agua. Así mismo, estas altas mortalidades podrían atribuirse también al manejo pre-operatorio de los organismos (elevado tiempo de exposición al anestésico), manejo post-operatorio (fatiga ocasionada a la cirugía o debilidad por infecciones causadas por el injerto), o la combinación de ambos factores (Saucedo *et al.*, 2001).

Con la información obtenida en este estudio, se puede corroborar que la respuesta hematopoyética, proliferación celular y cicatrización de la herida provocada

por el injerto de *P. sterna* está influenciada principalmente por factores ambientales (siendo la temperatura uno de los más importantes), seguida de la época de injerto y el origen del manto. A su vez, la proliferación celular que se inicia posterior al proceso de injerto está regulada por la cantidad de hemocitos y estos a su vez presentan una velocidad de activación diferencial, dependiendo del origen de manto. Los principales tejidos involucrados en la regulación y activación de las células del sistema inmune de la especie son la glándula digestiva y el tejido conectivo del canal digestivo. Se sugiere realizar injertos en los meses de febrero a abril para complementar la información generada en este estudio.

## 9. Conclusiones

La temperatura es el factor ambiental más importante que influencia la producción de hemocitos como respuesta a la herida.

La época del año y el origen del manto son factores determinantes en las tasas de aceptación/rechazo y mortalidad de los organismos a ser injertados para la producción de perlas.

La respuesta hematopoyética está altamente influenciada por el origen del manto mostrando una velocidad de activación diferencial siendo mayor en los organismos injertados con manto de un donador compón y menor en el caso de los organismos injertados con manto propio.

En *Pteria sterna*, el injerto de manto no tiene un efecto directo en el desarrollo gonádico tal y como se ha reportado en *Pinctada mazatlanica*.

La composición bioquímica de los tejidos está estrechamente relacionada con el injerto de manto, pues es a partir de las reservas energéticas presentes en los tejidos de reserva (glándula digestiva, músculo aductor y manto) que los organismos serán capaces de sobrevivir a la operación y así poder regenerar el tejido y formar el saco perlero.

La glándula digestiva es el principal tejido de reserva, seguido por el músculo aductor y en menor medida por el manto.

Las tasas de aceptación/rechazo y mortalidad estarán determinadas por la cantidad de energía presente en los tejidos de somáticos y de reserva de los organismos.

## 10. Perspectivas

Tomando en cuenta los resultados obtenidos a partir de esta tesis, se sugiere realizar injertos de perla libre para ver el desarrollo del saco perlero durante los meses fríos (invierno 09) y en los meses en que los organismos se encuentren en un estado óptimo en lo que se refiere a desarrollo gonádico.

En lo referente a la fisiología reproductiva de las ostras perleras como respuesta al proceso de injerto de manto, se sugiere ampliar el periodo de muestro al menos a un ciclo anual completo para determinar con precisión la relación entre el injerto de manto y el desarrollo gonádico de los organismos. Ello bajo el supuesto de que la proliferación celular por efecto del injerto de manto acelera el desarrollo de la gónada.

En este sentido también se recomienda realizar un estudio para evaluar la calidad de los gametos y la viabilidad de las larvas obtenidas de los desoves de los organismos injertados al compararlos con los gametos de organismos que no han sido afectados por dicho proceso.

Asimismo, se sugiere ampliar el número de muestra de cada uno de los tratamientos experimentales manejados, considerando que aún se observan y registran altas tasas de mortalidad, debidas al manejo de estos organismos.

## 11. Referencias bibliográficas

- Acosta-Salmón H y P. C. Southgate. 2005. Histological changes in the gonad of the blacklip pearl oyster (*Pinctada margaritifera* Linnaeus, 1758) during the reproductive season in north Queensland, Australia. *Moll. Res.* 25, 71-74.
- Acosta-Salmón H. y P. C. Southgate. 2005. Mantle regeneration in the pearl oysters *Pinctada fucata* and *Pinctada margaritifera.*, *Aquaculture* 246 (2005) 447– 453.
- Acosta-Salmón H. y P. C. Southgate. 2006. Wound healing after excision of mantle tissue from the Akoya pearl oyster, *Pinctada fucata.*, *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 143 (2006) 264–268.
- Alagarwami K., S. Dharmaraj, A. Chellam y T.S. Velayudhan. 1989. Larval and juvenile rearing of pearl oyster *Pinctada margaritifera* (Linnaeus). *Aquaculture* 76: 43–56.
- Alagarwami K., S. Dharmaraj, T.S. Velayudhan, A. Chellam, A.C.C. Victor y A.D. Gandhi. 1983. Larval rearing and production of spat of pearl oyster *Pinctada fucata* (Gould). *Aquaculture* 34: 287–301.
- Aldana-Avilés C. 1998. Evaluación de la captación de semilla, crecimiento y supervivencia de juveniles de *Pteria sterna* (Gould, 1851), en tiempos diferentes de preengorda, en El Merito, Bahía de La Paz, Baja California Sur, México. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Baja California Sur, La Paz, BCS.
- Andrews J. D. 1979. Pelecypoda: Ostreidae. En: Giese C., Pearse, J. S. (Eds.), *Reproduction of Marine Invertebrates*. Academic Press., New York., 293 – 341.
- Ansell A.D. 1974. Seasonal changes in biochemical composition of the bivalve *Chlamys septemradiata* from the Clyde Sea area. *Mar. Biol.* 25: 85-99.
- Araya-Núñez O., B. Ganning y F. Bückle-Ramírez. 1991. Gonad maturity, induction of spawning, larval breeding, and growth in the American pearl-oyster (*Pteria sterna*, Gould). *California Fish and Game* 77: 181–193.
- Araya-Núñez O., B. Ganning y F. Bückle-Ramírez. 1995. Embryonic development, larval culture, and settling of American pearl-oyster (*Pteria sterna*, Gould). *California Fish and Game* 81: 10–21.

- Arellano-Martínez, M., Racotta, I. S., Ceballos-Vázquez, B. P y J. F. Elorduy-Garay. 2004. Biochemical composition, reproductive activity and food availability of the lion's paw *Nodipecten subnodosus* in the Laguna Ojo de Liebre, Baja California Sur, Mexico. *J. Shellfish Res.* 23: 15-23.
- Arjarasirikoon U., M. Kruatrachue, P. Sretarugsa, Y. Chitramvong y S. Jantataeme. 2004. Gametogenic processes in the pearl oyster, *Pteria penguin* (Roding, 1798) (Bivalvia, Mollusca). *J. Shellfish Res.* 23, 403-410.
- Arnaud-Haond, S., M. Monteforte, F. Bonhomme y F. Blanc. 2000. Population structure and genetic variability of pearl oyster *Pinctada mazatlanica* along Pacific coasts from Mexico to Panama. *Conservation Genetics* 1: 299–307.
- Atlan, G., N. Balmain, S. Berland, B. Vidal y E. López. 1997. Reconstruction of human maxillary defects with nacre powder: histological evidence for bone regeneration. *Acad.Sci.Paris, Sciences de la vie/Life Sciences.* 320: 253-258.
- Awaji M. y T. Suzuki. 1995. The pattern of Cell Proliferation during Pearl Sac Formation in the Pearl Oyster., *Fisheries Science* 61(5), 747-751.
- Awaji M. y T. Suzuki. 1998. Monolayer Formation and DNA Synthesis of the Outer Epithelial Cells from Pearl Oyster Mantle in Coculture whit Amebocytes., *In vitro Cell Dev. Biol. Animal* 34: 486-491.
- Baber B. J. y N. J. Blake. 1981. Energy storage and utilization in relation to gametogenesis in *Argopecten irradians concentricus* (Say). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 52: 121-134.
- Baber B. J. y N. J. Blake. 1983. Growth and reproduction of the bay scallop, *Argopecten irradians* (Lamarck) at its Southern distributional limit. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 66: 247-256.
- Baber B. J. y N. J. Blake. 1991. Reproductive physiology. En: Shumway, S.E. Ed., *Scallops: Biology Ecology and Aquaculture.* 1a Edición, Elsevier, Amsterdam.378-428.
- Baber B. J. y N. J. Blake. 2006. Reproductive physiology. En: Shumway, S.E., Parsons, G.J. (Eds.), *Scallops: Biology, Ecology, and Aquaculture.* Elsevier, 2a Edición, Amsterdam, Holanda, 357-416.
- Barrett AJ, K. Rezvani, S. Solomon, A. M. Dickinson, X. N. Wang, G. Stark, H. Cullup, M. Jarvis, P. G. Middleton y N. Chao. 2003. New developments in

- allotransplant immunology. Hematology (Am Soc Hematol Educ Program). 2003: 350-71.
- Bayne B. L. 1976. Aspects of reproduction in bivalve mollusks. En: Wiley, M. (Ed.), Estuarine Processes, Vol. 1. Academic Press, Londrés, 432-448.
- Bayne B. L, A. Bubel, P. Gabbott, D. R. Livingstone, D. M. Lowe y M. N. Moore. 1982. Glycogen utilization and gametogenesis in *Mytilus edulis* L. Mar. Biol. Lett. 3: 89-105.
- Bervera-León H. 2002. Distribución y abundancia espacio-temporal de semilla de *Pinctada mazatlanica* (Bivalvia : Pteriidae) en la Bahía de La Paz, Baja California Sur, México., Tesis de Maestría, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, La Paz, Baja California Sur, México.
- Besnard J. Y. 1991. Seasonal variations in the lipids and fatty acids on the female gonad of the scallop *Pecten maximus* (Linnaeus, 1758) in the Bay of Seine (French Channel). En: Shumway, S.E., Sandifer, P.A. (Eds), An International Compendium of Scallops Biology and Culture. World Aquac. Soc.: 74-86.
- Bosland M.C. 1992. Animal models for the study of prostatic carcinogenesis. J Cell Biochem Suppl 1992;16:89- 98.
- Bosland MC, H. Ford y L. Horton. 1995. Induction at high incidence of ductal prostate adenocarcinomas in NBL/Cr and Sprague-Dawley Hsd:SD rats treated with a combination of testosterone and estradiol-17b or diethylestilbestrol. Carcinogenesis 1995;1311-1317.
- Bückle-Ramírez L.F., D. Voltolina, E. Morales y F. Valenzuela. 1992. Spat settlement and growth of *Pteria sterna* (Gould) (Mollusca, Bivalvia) in Bahía de los Angeles, Baja California, México. Tropical Ecology 33: 137–147.
- Cáceres-Martínez C.J., C. Ruíz-Verdugo y D. Ramírez-Filipini. 1992. Experimental collection of pearl oyster, *Pinctada mazatlanica* and *Pteria sterna*, spat on a filament substrate. Journal of the World Aquaculture Society 23: 232–240.
- Cáceres Martínez, C. y C. Rangel-Davalos. 1994. El desarrollo de la acuicultura en las Lagunas Costeras. En: Lagunas Costeras y el Litoral Mexicano. Cáceres-Martínez y De la Lanza-Espino (Eds). 425-444 pp
- Cáceres Puig, J. I. 2007. Dinámica anual del esfuerzo reproductivo de *Pteria sterna* (Gould, 1851) en la Bahía de La Paz, B.C.S., México., Tesis de Maestría, Centro

- de Investigaciones Biológicas del Noroeste, La Paz, Baja California Sur, México.
- Cáceres-Puig, J. I, C. J. Cáceres-Martínez y P. E. Saucedo. 2009. Reproductive effort of Pacific winged pearl oyster *Pteria sterna* and its relation with the timing for planning pearl seeding operations. J. Shellfish Res. (aceptado).
- Cariño, M. M. Y A. Alameda. 1998. Historia de las relaciones hombre espacio 1500-1940. Capítulo I. En: Diagnóstico Ambiental de Baja California Sur. NIPARAJA, UABCS, FUNDEA (Eds.), La Paz, BCS, México.
- Cariño-Olvera M.M. y M. Monteforte. 1995. History of pearling in the Bay of La Paz, South Baja California, México (1533-1914). Gems and Gemology 31: 88–108.
- Comely C. A. 1974. Seasonal variation in the flesh weights and biochemical content of the scallop *Pecten maximus* (L.) in the Clyde Sea Area. J. Cons. Int. Explor. Mer. 35: 281-295.
- Connolly K. M. y S. Bogdanffy. 1993. Evaluation of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) as an endogenous marker of cell proliferation in rat liver: A dual-stain comparison with 5-bromo 2' deoxyuridine. J Histochem Cytochem 1993;41:1-6.
- Couturier C. Y y G. F. Newkirk. 1991. Biochemical and gametogenic cycles in scallops, *Placopecten magellanicus* (Gmelin, 1791), held in suspension culture. En: Shumway, S.E., Sandifer, P.A. (Eds.), An International
- Davis C. L y D. E. Hricik. 2004. Transplant: immunology and treatment of rejection. Am J Kidney Dis. 2004, 43: 1116-37.
- De Zwaan A., y M. Mathieu. 1992. Cellular biochemistry and endocrinology. En: Gosling, E. (Ed.), The Mussel *Mytilus*: Ecology, Physiology, Genetics and Culture. Elsevier, Nueva Cork, pp. 223–307.
- Delaporte, M. y J.F. Samain. 2005. Modulation of hemocyte parameters of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* by nutrition. Implication in summer mortalities. Ifremer, Plouzane (France). 365 pp.
- Delaporte, M; Soudant, P; Lambert, C; Moal, J; Pouvreau, S; Samain. 2006. Impact of food availability on energy storage and defense related hemocyte parameters of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* during an experimental reproductive cycle., Aquaculture [Aquaculture]. Vol. 254, no. 1-4, pp. 571-582. 28

- Desai K., G. Hirani, y D. Nimavat. 1979. Studies on the pearl oyster *Pinctada fucata* (Gould): Seasonal biochemical changes. Ind. J. Mar. Sci. 8: 49-50 (com. breve).
- Diario Oficial de la Federación, 1939. Norma Oficial de la Federación. Norma Oficial del Gobierno de los Estados Unidos Mexicanos que clasifica a las ostras perleras como especies en peligro de extinción.
- Diario Oficial de la Federación, 1994. Norma Oficial de la Federación. Norma Oficial del Gobierno de los Estados Unidos Mexicanos NOM-059-ECOL-1994 que clasifica a las ostras perleras como especies bajo protección especial.
- Dongen, J.J.M., H.J Adriaansen y H, Hooijkaas. 1987. Immunological marker analysis of cells in the various hematopoietic differentiation stages and their malignant counterparts. Pp. 87–116 in Ruiters, D.J., Fleuren, G.J. Warnaar, S.O. (Application of Monoclonal Antibodies in Tumor Pathology. M. Nijhoff Publ., Dordrecht. 1987.
- Doumenge F. 1992. Nacres et perles. Traditions et changements. In : Doumenge, F. et A. Toulemont (Eds.). Bull. Inst. Océanogr. Monaco, Num. Spéc. 8 : 1-52.
- Epp, J., V. M. Bricelj, y R. E. Malouf. 1988. Seasonal partitioning and utilization of energy reserves in two age classes of the bay scallop *Argopecten irradians irradians* (Lamarck). J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 121: 113-136.
- Errea P. y A. Herrero. 1994. Graft establishment between compatible and incompatible *Prunus*. spp. J. Exp. Bot. 45, 272, 393-401.
- Fang Z., Q. Feng, Y. Chi, L. Xie, R. Zhang. 2008. Investigation of cell proliferation and differentiation in mantle of *Pinctada fucata* (Bivalve, Mollusca). Mar. Biol. (2008). 153: 745-754.
- Fassler R. C. 1991. Farming jewels: the aquaculture of pearls. Aquaculture Magazine Sep/Oct 1991: 34–52.
- Fassler R. C. 1995. Farming jewels: new development in pearl farming. World Aquaculture 26: 5–10.
- Fassler R. C. 2004. Pearls—Once Rare—Now Suffer from Overproduction. Pearl World, The International Pearling Journal 4: 1–4.
- Furuya Y., S. Krajewski, J. I. Epstein, J. C. Reed y J. T. Isaacs. 1996. Expression of bcl-2 and the progression of human and rodent prostatic cancers. Clin Cancer Res 1996;2:389-398.

- Gabbott P. A. 1975. Storage cycles in marine bivalve molluscs: a hypothesis concerning the relationship between glycogen metabolism and gametogenesis. En: Barnes, H. (Ed.), Proc. 9th Eur. Mar. Biol. Symp. Aberdeen University Press, Escocia, pp. 191-211.
- Gabbott P. A. 1976. Energy metabolism. En: Bayne, B.L. (Ed.), Marine Mussels: Their Ecology and Physiology. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 293-355.
- Gabbott P. A. 1983. Development and seasonal metabolic activities in marine molluscs. En: Hochachka, P.W. (Ed.), The Mollusca, Vol. 2, Environmental Biochemistry and Physiology. Academic Press, NuevaYork, pp. 165-217.
- Gabbott P. y K. Peek. 1991. Cellular biochemistry of the mantle tissue of the mussel *Mytilus edulis* L. Aquaculture 94: 165-176.
- Garcia-Gasca A., R. Ochoa-Baez, y M. Betancourt. 1994. Microscopic Anatomy of the Mantle of the Pearl Oyster *Pinctada mazatlanica* (Hanley, 1856)., Journal of Shellfish Research, Vol. 13, No. 1, 85-91.
- Gaytán-Mondragón I., C. Cáceres-Martínez, y M. Tobías-Sánchez. 1993. Growth of the pearl oysters *Pinctada mazatlanica* and *Pteria sterna* in different culture structures at La Paz Bay, Baja California Sur, México. J. World Aqua. Soc. 24: 541-546.
- Gervis M. y N. Sims. 1992. Biology and culture of pearl oysters (Bivalvia: Pteriidae). Overseas development administration of the United Kingdom. International Center for Living Aquatic Resources Management, Manila, Philippines. 49 pp.
- Giese A. C. y J. S. Pearse. 1974. Introduction: General principles. En: Giese A. C., Pearse J. S. (Eds.), Reproduction of Marine Invertebrates, Vol. 1., Academic Press., New York., 1 – 49.
- Giese A. C. y J. S. Pearse. 1979. Molluscs: Pelecypods and lesser classes. En: Giese A. C., Pearse J. S. (Eds.), Reproduction of Marine Invertebrates, Vol.5., Academic Press., New York., 112 – 292.
- Gómez-Robles E., M.C. Rodríguez-Jaramillo, P.E. Saucedo. 2005. Digital image analysis of lipid and protein histochemical markers for measuring oocyte development and quality in pearl oyster *Pinctada mazatlanica* (Hanley,1856). J. Shellfish Res. 25.

- Gómez-Robles M. E. y P. E. Saucedo. 2009. Evaluation of quality indices of gonadal and somatic tissues involved in reproduction of the pearl oyster *Pinctada mazatlanica* with histochemistry and digital image analysis. *J. Shellfish Res.* 28: 1–7.
- Gray D. 1992. The dynamics of immunological memory. *Semin. Immunology*, 4:29–34.
- Gruet M.J. 1992. La perle de culture dans une économie de marché. In : Doumenge, F. et A. Toulemon (Eds.). *Bull. Inst. Océanogr. Monaco, Num. Spéc.* 8 : 105-108.
- Hanselman R. y R Smolowitz. 2000. Identification of Proliferating Cells in Hard Clams. *Biol. Bull.* 199: 199-200.
- Haws M. 2002. The basics of pearl farming: A Layma's Manual. Center of Tropical and Subtropical Aquaculture. Hawai, Estados Unidos. Publicación Especial, 127 pp.
- Jabbour-Zahab R., D. Chagot, F. Blanc, y H. Grizel. 1992. Mantle histology, histochemistry and ultrastructure of the pearl oyster *Pinctada margaritifera* (L.), *Aquat. Living resour.*, 1992. 5, 287-298.
- Kang, C-K., M. S. Park, P. Y. Lee, W. J. Choi, y W. C. Lee. 2000. Seasonal variations in condition, reproductive activity, and biochemical composition of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), in suspended culture in two coastal bays of Korea. *J. Shellfish Res.* 19: 771-778.
- Keen M. 1979. *Seashells of the Tropical West America*. Stanford University Press, Stanford, California. 1068 pp.
- Kiefert L., D. McLaurin-Moreno, E. Arizmendi, H. A. Hanni, y S. Elen. 2004. Cultured pearls from the Gulf of California, Mexico. *Gems Gemmology* 40, 26-38.
- Kripa, V., K. S. Mohamed, K. K. Appukuttan, y T. S. Velayudhan., 2007., Production of Akoya pearls from the southwest coast of India. *Aquaculture* 262: 347-354.
- Kurki, P., K. Ogata y R. M. Tan. 1988. Monoclonal antibodies to proliferating cell nuclear antigen (PCNA)/cyclin as probes for proliferating cells by immunofluorescence microscopy and flow cytometry., *J. Immunol. Methods.*, 109, 49.
- Lamghari M., M. J. Almeida, S. Berland, H. Huet, A. Laurent, C. Milet y E. López. 1999. Simulation of bone narrow cells and bone formation by nacre: in vivo and in vitro studies. *Bone* 25: 91S-94S.

- Landman, N. H., P. M. Mikkelsen, R. Bieler, y B. Bronson. 2001. Pearls: A Natural History. American Museum of Natural History and The Field Museum, Nueva York, Estados Unidos.
- Lodeiros, C., J. Rengel, H. E. Guderley, O. Nusetti, y J. Himmelman. 2001. Biochemical composition and energy allocation in the tropical scallop *Lyropecten (Nodipecten) nodosus* during the months leading up to and following the development of gonads. *Aquaculture* 199: 63-72.
- Loir M. 1989. Trout Sertoli cells and germ cells in primary culture: I. Morphological and ultrastructural study. *Gamete Res.* 24: 151-169.
- Lu Q. L., P. Abel, C.S. Foster y E. Lalani. 1996. Bcl-2: Role in epithelial differentiation and oncogenesis. *Hum Pathol* 1996;27:102-110.
- MacDonald, B. A. y R. J. Thompson. 1985. Influence of temperature and food availability on the ecological energetics of the giant scallop *Placopecten magellanicus*. II. Reproductive output and total production. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 25: 295-303.
- Mackie G. L. 1984. Bivalves. En: Wilburg K. M. (Ed.), *The Mollusca.*, Vol. 7: *Reproduction.*, Academic Press., New York., 351 – 417.
- MacKay C. R. 1993. Immunological memory. *Advanced Immunology*, 53:217–265.
- Martínez G. 1991. Seasonal variation in biochemical composition of three size classes of the Chilean scallop *Argopecten purpuratus* Lamark, 1819. *The Veliger* 34: 335-343.
- Martinez O. M. y H. R. Rosen. 2005. Basic concepts in transplant immunology. *Liver Transpl.* 2005, 11: 370-81.
- Martínez, G. y L. Mettifogo. 1998. Adductor muscle and mobilization of trophic material for gametogenesis of the scallop *Argopecten purpuratus* Lamarck. *J. Shellfish Res.* 17: 113-116.
- Martínez-Fernández E., H. Acosta-Salmón, C. Rangel-Dávalos, A. Olivera-Bonilla, H. Ruiz-Rubio y A. Romo-Piñeira. 2004. Spawning and larval culture of the pearl oyster *Pinctada mazatlanica* in the laboratory. *World Aquaculture* 34: 36–39
- Martínez-Quiñonez F. y R. Gueorguiev-Nikolov. 2001. Mercados de exportación para perla cultivada sudcaliforniana. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Baja California Sur, La Paz, BCS, México.

- Matlins A. L. 1995. The Pearl Book : the definitive buying guide. GemStone Press, Vermont USA. 198 pp.
- McAnally-Salas L. y E. Valenzuela-Espinoza. 1990. Crecimiento y sobrevivencia de larvas de la ostra concha nácar *Pteria sterna* en condiciones de laboratorio. Ciencias Marinas 16: 29–41.
- McLaurin-Moreno D., E. Arizmendi-Castillo, S. Farrell, y S. Elen. 1998. Curso de Identificación y Evaluación de Perlas. Instituto de Estudios Superiores de Monterrey A. C. y Perlas de Guaymas, Guaymas, Sonora, México.
- Monteforte M. 1990. Ostras perleras y perlicultura: Situación actual en los principales países productores y perspectivas para México. Serie Científica. Universidad Autónoma de Baja California Sur 1: 13–18.
- Monteforte M. 1991. Las perlas, leyenda y realidad: Un proyecto actual de investigación científica. Panorama 38: 28–35.
- Monteforte M. 1996. Cultivo de ostras perleras y perlicultura. En: Estudio del Potencial Pesquero y Acuícola de Baja California Sur. Casas-Valdéz M. y G. Ponce-Díaz (eds.). FAO-UABCS-CIBNOR-CICIMAR-CRIP (Eds.), pp. 571–613.
- Monteforte M. 2003. Aprovechamiento racional de las ostras perleras (*Pinctada mazatlanica* y *Pteria sterna*) en Bahía de La Paz, Baja California Sur, México: cultivo, repoblamiento y perlicultura., Informe final del Proyecto Q008 Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste SC.
- Monteforte M. y M. M. Cariño-Olvera. 1992. Exploration and evaluation of Natural Stocks of Pearl Oysters *Pinctada mazatlanica* and *Pteria sterna* (Bivalvia: Pteriidae) in La Paz Bay, Sudcalifornia México. AMBIO, Journal of Human Environment 24: 314–320.
- Monteforte M. y A. García-Gasca. 1994. Spat collection studies on pearl oysters *Pinctada mazatlanica* and *Pteria sterna* (Bivalvia: Pteriidae) in Bahia de La Paz, South Baja California, México. Hydrobiología 291: 21-34.
- Monteforte M., H. Bervera, S. Morales, V. Pérez, Saucedo, P. y H. Wright. 1994. Results on the production of cultured pearls in *Pinctada mazatlanica* and *Pteria sterna* from Bahía de La Paz, South Baja California, México. J. Shellfish Res. 13(1) : 344-345.

- Monteforte M., E. Kappelman-Piña y B.E. López-Espinosa. 1995. Spat fall annual survey of pearl oyster *Pteria sterna* (Gould) on experimental collectors at Bahía de La Paz, South Baja California, México. *Aquac. Fish. Manag.*, 26, 497-511.
- Monteforte M., H. Bervera y S. Morales. 1994. Growth and survival of pearl oysters *Pinctada mazatlanica* and *Pteria sterna* in extensive conditions at Bahía de La Paz, South Baja California, México. *J. Shellfish Res.* 13(1) : 343-344.
- Monteforte M. y S. Morales-Mulia. 2000. Growth and survival of the Calafia mother-of-pearl oyster *Pinctada mazatlanica* (Hanley 1856) under different sequences of nursery culture-late culture at Bahía de la Paz, Baja California Sur, México. *Aquaculture Research*. Vol. 31(12):901-915.
- Monteforte M., H. Bervera, J. J. Ramírez, y P.E. Saucedo. 2005. Effect of stocking density on growth and survival of the rainbow pearl oyster *Pteria sterna* (Gould 1852) during nursery and late culture in Bahía de La Paz, Baja California Sur, México. *Aquac. Int.* 14 13: 391-407.
- Newell R. C. y G. M. Branch. 1980. The influence of temperature on the maintenance of metabolic energy balance in marine invertebrates. *Advances in Marine Biology* 17, 329–396.
- Ojeda-Ramirez J. J. 2007. Efecto probiotico de *Lactobacillus* sp. en el crecimiento y supervivencia de semilla débil de madreperla *Pinctada mazatlanica* (Hanley, 1856). Tesis de Licenciatura, Universidad Autonoma de Baja California Sur., La Paz, Baja California Sur, México.
- Pazos A. J., G. Román, C. P. Acosta, M. Abad y J. L. Sánchez. 1997. Seasonal changes in condition and biochemical composition of the scallop *Pecten maximus* L. from suspended culture in the Ria de Arousa (Galicia, N.W. Spain) in relation to environmental conditions. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 211: 169-193.
- Pazos A. J., G. Román, C. P. Acosta, M. Abad y J. L. Sánchez. 1997. Seasonal changes in condition and biochemical composition of the scallop *Pecten maximus* L. from suspended culture in the Ria de Arousa (Galicia, N.W. Spain) in relation to environmental conditions. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 211: 169-193.
- Pereira-Mouriès L. P., M. J. Almeida, C. Milet, S. Berland, y E. López. 2002. Bioactivity of nacre water-soluble organic matrix from the bivalve mollusk

- Pinctada maxima* in three mammalian cell types: fibroblasts, bone marrow stromal cells and osteoblasts. *Com. Biochem. Physiol. (Part B)* 132: 217-229.
- Racotta, I. S., J. L. Ramírez, S. Avila y A. M. Ibarra. 1998. Biochemical composition of gonad and muscle in the catarina scallop, *Argopecten ventricosus*, after reproductive conditioning under two feeding systems. *Aquaculture* 163: 111-122.
- Racotta, I. S., J. L. Ramírez, A. M. Ibarra, M. C. Rodríguez-Jaramillo, D. Carreño y E. Palacios. 2003. Growth and gametogenesis in the lion-paw scallop *Nodipecten (Lyropecten) subnodosus*. *Aquaculture* 217: 335-349.
- Rangel-Dávalos, D. C. y V. J. Chávez-Villalba. 1994. Desarrollo científico y tecnológico de la madreperla y la concha nácar. Secretaría de Pesca, Gobierno del Estado de Baja California Sur, México.
- Robinson, W. E., W. E. Wehling, M. P. Morse, y G. C. Leod. 1981. Seasonal changes in soft-body component indices and energy reserves in the Atlantic deep-sea scallop, *Placopecten magellanicus*. *Fish. Bull.* 79: 449-458.
- Román G., G. Martínez, O. García y L. Freitas. 2002. Reproducción. En: Maeda-Martínez, A.N. (Ed.), *Los Moluscos Pectinidos de Iberoamérica: Ciencia y Acuicultura*. Ed. Limusa, Mexico., 27 – 60.
- Sarasquete, C., M. L. González de Canales, J. Blasco, D. Capetta Da Silva, J. M. Arellano y M. Gutiérrez. 1997. Histochemical distribution and accumulation of trace metals in the heart of green and normal *Crassostrea angulata* specimens from different southwest Spanish coasts. *Eur. J. Histochem.*, 41:139-148.
- Sastry, A. N. y N. J. Blake. 1971. Regulation of gonad development in the bay scallop, *Aequipecten irradians* Lamark. *Biol. Bull.* 140: 274-282.
- Sastry A. N. 1979. Pelecypoda (excluding Ostreidae). In: Giese, A.C., Pearse, J. S. (Eds.), *Reproduction of Marine Invertebrates.*, Academic Press., New York., 113–292.
- Saucedo P.E. 2001. Investigación aplicada al acondicionamiento gonadal y reproducción de la madreperla *Pinctada mazatlanica* (Hanley, 1856) en el laboratorio. Tesis Doctoral, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. La Paz, B. C. S. México.

- Saucedo P.E. y M. Monteforte. 1997. Repopulation experiments of pearl oyster, *Pteria sterna* (Gould, 1851) at Bahía de La Paz, Baja California Sur, México. *AMBIO, Journal of Human Environment* 26: 522–528.
- Saucedo P.E., I. Racotta, H. Bervera., H. Villareal y M. Monteforte. 2001. Differential gonadal development of grafted and ungrafted specimens of the Califa mother-of-pearl oyster, *Pinctada mazatlanica* (Bivalvia: Pteriidae)., *Invertebrate Reproduction and Development*.,39:3., 183-193.
- Saucedo P. E., I. Racotta, H. Villarreal, y M. Monteforte. 2002. Seasonal changes in the histological and biochemical profile of the gonad, digestive gland, and muscle of the Calafia mother-of-pearl oyster, *Pinctada mazatlanica* (Hanley, 1856) associated with gametogenesis. *J. Shellfish Res.* 21: 127-135.
- Saucedo P.E., H. Bervera, M. Monteforte, P.C. Southgate y P. Monsalvo. 2005. Factors influencing recruitment of hatchery-reared pearl oyster (*Pinctada mazatlanica*; Hanley, 1856) spat. *Journal of Shellfish Research* 24: 215–220.
- Saucedo P.E., P. Ormart-Castro y M. Osuna-García. 2007. Towards development of large-scale hatchery production of larvae and spat of the pearl oyster *Pinctada mazatlanica* (Hanley, 1856) in Mexico. *Aquaculture* (en prensa).
- Saucedo P.E. y P. C. Southgate. 2008. Reproduction, Development, and Growth. En: Southgate P.C., Lucas J.S. (Eds.). *The Pearl Oyster: Biology and Culture*. Cap. 5. Elsevier Science Publishers, Australia (en prensa).
- Serrano Guzmán S. J. y D. Salinas Ordaz. 1993. Cultivo de larvas y producción de semilla de *Pteria sterna* (Mollusca: Bivalvia) en un criadero comercial. *Rev. Inv. Cient.* 4: 81-90.
- Seed R. 1976. Ecology. In: Bayne , B. L. (Ed.), *Marine Mussels: Their Ecology and Physiology*., Cambridge University Press., Cambridge., 13 – 65.
- Sevilla M. L. 1969. Contribución al conocimiento de la madreperla *Pinctada mazatlanica* (Hanley, 1845). *Rev. Soc. Mex. Hist. Nat.*, 30: 223-262.
- Shirai S. 1994. An overview of pearl oyster culture in the world. Conferencia magistral. Congreso Internacional Pearls'94. Honolulu, Hawaii.
- Simon E. y M. Haws. 1999. Producing Pearls Using the Black-lip Pearl Oyster (*Pinctada margaritifera*)., Center for Tropical and Subtropical Aquaculture Publication Number 141 December 1999

- Southgate, P. C. 2008. Pearl Oyster Culture. En: Southgate PC, Lucas JS (eds) The Pearl Oyster: Biology and Culture, Elsevier Science Publishers, Holanda, pp. 231–272.
- Southgate P.C. y A.C. Beer. 1997. Hatchery and early nursery culture of the blacklip pearl oyster (*Pinctada margaritifera*, L.). Journal of Shellfish Research 16: 561–568.
- Southgate P.C. 2004. Progress towards development of a cultured pearl industry in Kiribati, central Pacific. Aquaculture 2004., Book of Abstracts, World Aquaculture Society. 556 p.
- Southgate P. C. y J. S. Lucas. 2008. The pearl Oyster., Elsevier., First edition 2008., Oxford., Amsterdam, The Netherlands., 589.
- Suzuki T. y K. Mori. 1991. Immunolocalization and in Vitro Secretion of Hemolymph Lectin of the pearl Oyster, *Pinctada fucata martensii*., Zoological Science 8: 23-29
- Suzuki T. y M Awaji. 1995. Wound-induced hematopoiesis in connective tissues of digestive canal in pearl oyster, *Pinctada fucata martensii*., Journal of Marine Biotechnology 3: 168-170
- Taylor A. C. y T. J. Venn. 1979. Seasonal variation in weight and biochemical composition of the tissues of the queen scallop *Chlamys opercularis*, from the Clyde Sea area. J. Mar. Biol. Assoc. U.K. 59: 605-621.
- Taylor J.J. 1999. Spat production, nursery rearing and grow-out of the silver-lip pearl oyster, *Pinctada maxima* (Jameson) Tesis Doctoral, Universidad James Cook, Queensland, Australia.
- Thompson R., y B. A. MacDonald. 1991. Physiological integrations and energy partitioning. En: Shumway, S.E., Parsons, G.J. (Eds.), Scallops: Biology, Ecology, and Aquaculture. Elsevier, 2nd ed., Amsterdam, Holanda, pp. 493–520.
- Vite-García M. N. y P. E. Saucedo. 2008. Energy storage and allocation during reproduction of Pacific winged pearl oyster *Pteria sterna* (Gould, 1851) at Bahía de La Paz, Baja California Sur, Mexico. J. Shellfish Res. 27: 375-383.
- Vite-García M. N. 2005. Variaciones estacionales en el uso de reservas energéticas entre los tejidos relacionados con la gametogenesis en las ostras perleras *Pteria sterna* (Gould, 1851) y *Pinctada mazatlanica* (Hanley, 1856)., Tesis de Maestría,

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, La Paz, Baja California Sur, México.

Waalkes M.P. y S. Rehm. 1992. Carcinogenicity of oral cadmium in the male Wistar (WF/NCr) rat: Effect of chronic dietary zinc deficiency. *Fund Appl Toxicol* 1992;19:512-520.

Wright-López H. 1997. Ecología de la captación de la semilla de Madreperla *Pinctada mazatlanica* y Concha Nácar *Pteria sterna* (Bivalvia, Pteriidae) en Isla Gaviota, Bahía de La Paz, B.C.S. México., Tesis de Maestría, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, La Paz, Baja California Sur, México.