

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA

ESCUELA SUPERIOR DE CIENCIAS BIOLOGICAS



IDENTIFICACION DE LOS ELEMENTOS FORMES DE
LA HEMOLINFA DE:

La Almeja Pismo, Tivela stultorum (Bivalvia: Pelecypoda)

TESIS PROFESIONAL QUE COMO REQUISITO
PARCIAL PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A

CLAUDIA MARIA GARCIA CUELLAR

ENSENADA, B. C.

ABRIL 1984.

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA
ESCUELA SUPERIOR DE CIENCIAS BIOLOGICAS

IDENTIFICACION DE LOS ELEMENTOS FORMES DE LA
HEMOLINFA DE:

La Almeja Pismo, Tivela stultorum (Bivalvia:
Pelecypoda).

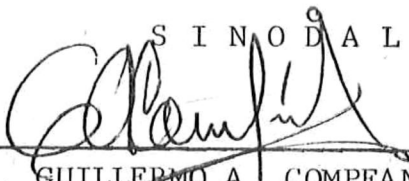
TESIS PROFESIONAL QUE COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

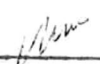
PRESENTA: CLAUDIA MARIA GARCIA CUELLAR

S I N O D A L E S

PRESIDENTE:


DR. GUILLERMO A. COMPEAN JIMENEZ

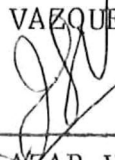
SECRETARIO:


BIOL. MARCELO RODRIGUEZ MERAZ

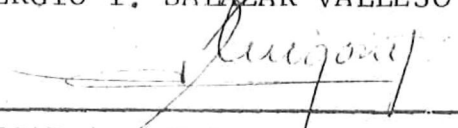
VOCAL:


BIOL. OLIVIA TAPIA VAZQUEZ

SUPLENTE:


BIOL. SERGIO I. SALAZAR VALLEJO

SUPLENTE:


QUIM. CESAR A. MIGONI RAMIREZ

ENSENADA, B.C.

ABRIL, 1984.

Este trabajo fué realizado en el Laboratorio de Histología de la Escuela Superior de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Baja California bajo la Dirección de la Biol. Olivia Tapia Vázquez.

Con mi gratitud, admiración y respeto ...

A mis Padres y Hermanos,

A mis Compañeros y Amigos de la Generación Fundadora,

A la Biol. Olivia Tapia Vázquez,

A mis Maestros,

A mi Escuela,

A todas aquellas personas que de alguna manera contribuyeron a la realización de este trabajo.

C O N T E N I D O

RESUMEN		1
INTRODUCCION		2
ANTECEDENTES		5
OBJETIVO		8
MATERIAL		9
METODOS		10
RESULTADOS		13
DISCUSION		36
CONCLUSIONES		50
LITERATURA CITADA		51

R E S U M E N

Por análisis microscópico, en vivo y en frotis fijados y teñidos de la hemolinfa de 15 ejemplares de la Almeja Pismo, Tivela stultorum; se encontraron 11 tipos celulares. Estos se determinaron siguiendo criterios morfológicos y morfométricos, y se propone la función de cada uno en base a sus características morfológicas y actividad celular. Entre los ejemplares estudiados es notable la variación de porcentajes relativos de los tipos celulares, esto se atribuye al estado fisiológico del organismo.

A B S T R A C T

Through microscopic analysis, live and on dyed fixed smears from the hemolymph of 15 Pismo clam exemplars, Tivela stultorum; 11 cellular types were founds. These were determined following morphologic and morphometric criterious, and the function of each is proposed on theirs morphologic characteristics and cellular activity. Among studied exemplars, is remarkable the variation of relative percentages of cellular types, this is attributed to the phisiological condition of the organism.

I N T R O D U C C I O N

La almeja Pismo, Tivela stultorum, pertenece a la clase Pelecypoda (Bivalvia), familia Veneridae (Keen & Coan 1974). El género Tivela contiene más de 400 especies vivientes en todo el mundo, y solo 14 de ellas, se localizan en la región central del Pacífico, siendo Tivela stultorum monotípica de esta costa. Se distribuye (Fig. 1) desde cerca de San Francisco, Cal., EE.UU. (37°30'N) hasta la Isla Socorro, México (18°46' N). (Fitch 1950).

Es un filtroalimentador de diatomeas, bacterias, flagelados y otros protozoarios, así como gametos de invertebrados, zoosporas de algas, detritus animal y vegetal principalmente. El agua penetra en la cavidad paleal y sale de ella a través de unos órganos tubulares, situados ventral y dorsalmente, llamados sifones, incurrente y excurrente, respectivamente; alcanza su talla comercial a los 127 mm, en 5 a 8 años (Anónimo 1979). Se le encuentra en playas arenosas y de poca pendiente, desde el horizonte intermareal hasta los 26 m de profundidad. (Ferrer & Gastelu 1982).

Tivela stultorum, es un organismo que constituye un recurso de gran importancia regional, debido fundamentalmente a su valor alimenticio, ya que se utiliza para consumo directo, tanto su carne como su jugo, además como producto enlatado y carnada; la concha, es un subproducto que se utiliza en la fabricación de artesanías y botones. La importancia comercial de este recurso, con relación a otros invertebrados marinos, se debe más al volumen de captura que a su cotización en el mercado. La producción en México durante 1977 y 1978 fué de 3 281 580 kg, de este total, la captura en Baja California Norte representa el 80%. (Anónimo 1979).

El valor alimenticio de este organismo es bastante importante, pues se reporta un contenido aproximado de 11.5% de proteínas, 1.2% de lípidos, 1.9% de carbohidratos y 80% de agua (Anónimo 1979). La explotación comercial de este organismo, no esta sujeta a medida alguna de regulación, y esta situación obedece, al menos parcialmente, a la falta de estudios biológicos, pesqueros y socioeconómicos (Searcy 1982).

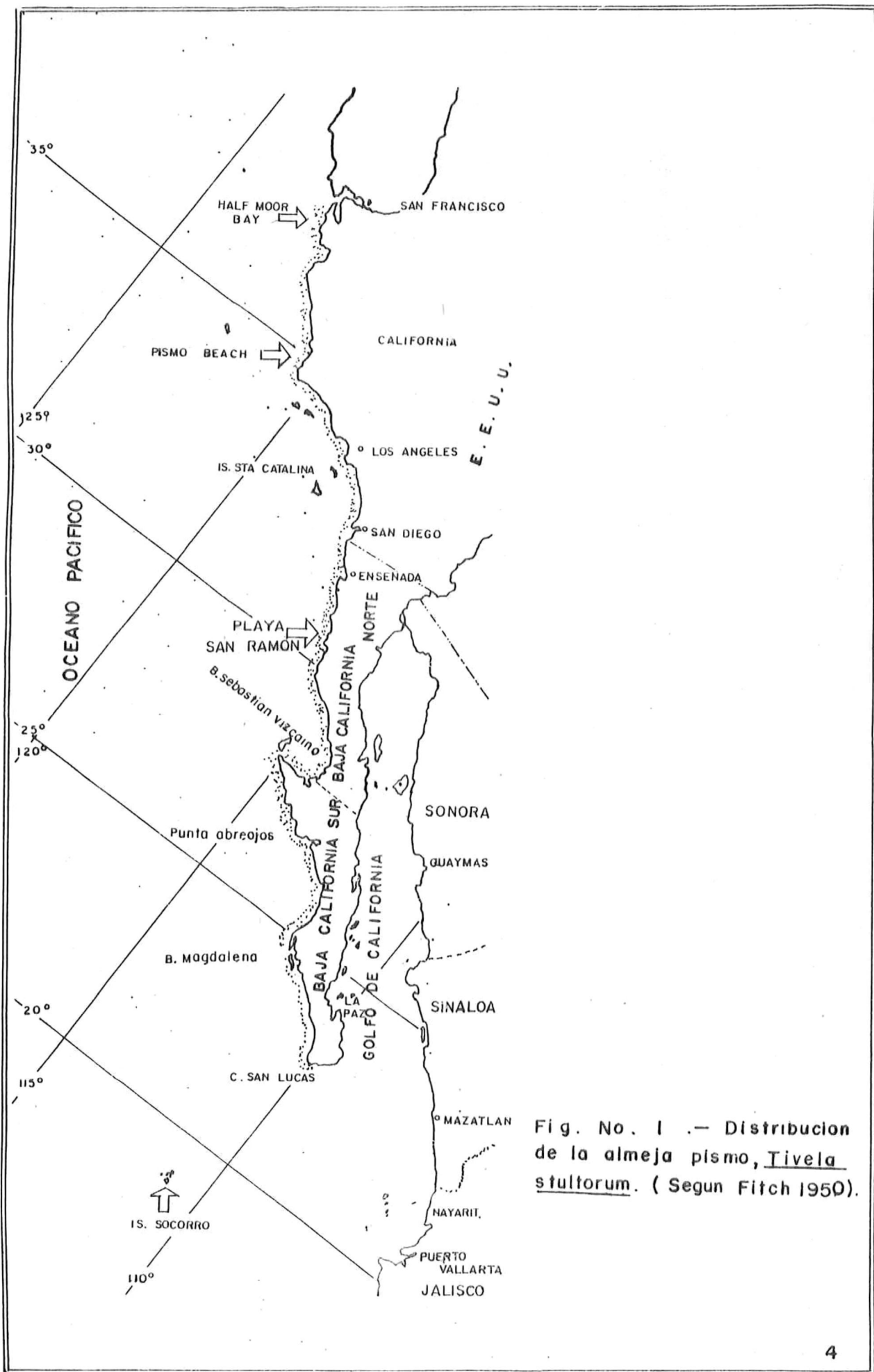


Fig. No. 1 .— Distribucion de la almeja pismo, *Tivela stultorum*. (Segun Fitch 1950).

A N T E C E D E N T E S

Sobre este molusco se ha publicado poco; por tal motivo y dada la importancia de este organismo, se consideró importante contribuir con respecto a su biología, específicamente en lo que se refiere al estudio de la hemolinfa (sangre), ya que es un tejido que entre sus funciones incluye un papel activo en la defensa interna, provocando respuestas de diversa índole contra la invasión de material extraño, biótico y abiótico (Cushing & Campbell 1960; Cheng et al. 1982; Flores 1982; Hernández 1983). Se sabe que la almeja pismo, como cualquier organismo filtroalimentador, lleva consigo el riesgo de acumular material capaz de causarle alguna alteración fisiológica, por lo que el estudio de su hemolinfa y los elementos formes que circulan en ella, permitirán conocer los elementos que intervienen con algún tipo de respuesta contra la invasión de agentes extraños u otro tipo de factores, cosa que cada día es más frecuente, ya que este organismo no está exento del peligro que representa la creciente contaminación de su hábitat.

La clasificación de los tipos celulares presentes en la hemolinfa de los moluscos, ha sido sujeta a mucha especulación, este motivo condujo a la realización del presente trabajo, que contribuirá a formar un criterio acerca de ella.

Para bivalvos, se menciona un aparato circulatorio típicamente abierto, constituido por corazón, senos tisulares, nefridios y branquias (Bayne et al. 1976; Barnes 1977). La hemolinfa está formada por células en un plasma incoloro, sin pigmentos respiratorios,

y con una capacidad de acarreo de oxígeno muy baja (Bayne et al. 1976). El volúmen de hemolinfa en bivalvos es grande, para Mytilus californianus, es del 50.8% del peso neto del cuerpo, excluyendo la concha (Bayne et al. 1976). Para Mercenaria mercenaria, se reporta una insignificante correlación entre las dimensiones del animal entero y el conteo diferencial del volúmen celular (Foley & Cheng 1974). El promedio del conteo, de todos los hemocitos circulantes de Tapes semidecussata, es aproximadamente de 1650 células por cada 180 m^3 de hemolinfa (Cheney 1971).

Las células de la hemolinfa de moluscos, han sido referidas como: Hemocitos, amibocitos, leucocitos, linfocitos y fagocitos. Pero estos términos son sinónimos (Bayne et al. 1976).

Hill & Welsh (1966) mencionaron la naturaleza fagocítica de estas células, basandose en la capacidad de poder ingerir partículas del colorante Indigo. Los hemocitos son células con capacidad de movimiento independiente que desempeñan un papel importante en la digestión, excreción, regeneración, transporte de nutrientes y defensa interna (Bayne et al. 1976; Brehelin et al. 1976). Se ha sugerido que, estas células, provienen del tejido epitelial y de la glándula digestiva (Holland et al. 1965; Bayne et al. 1976).

La clasificación de las células de la hemolinfa de moluscos, ha estado sujeta a mucha especulación, aunque en general, se basa en la presencia o ausencia de gránulos citoplásmicos, afinidad a diversos colorantes, características de movilidad y actividad fagocítica (Hill & Welsh 1966; Cheney 1971; Foley 1974; Moore & Eble 1977).

Hill & Welsh (1966) mencionaron una clasificación donde contemplan dos categorías bien diferenciadas: Amibocitos, que se presentan en todos los moluscos y Eritrocitos, que se presentan en algunos bivalvos que poseen hemoglobina. Cheney (1971) elaboró una tabulación, e hizo comparaciones entre la morfología y funciones conocidas de leucocitos en varios Phyla de invertebrados con especial atención a los leucocitos de Tapes semidecussata (almeja de Manila), que son similares morfológicamente a los leucocitos de otros moluscos, descritos por algunos investigadores. Moore & Eble (1977), reportaron tres tipos de hemocitos en Mercenaria mercenaria: agranulocitos, granulocitos pequeños y granulocitos grandes, y mencionaron la posibilidad de que estos tipos celulares corresponden a diferentes estados de desarrollo de una sola línea celular, basandose en la apariencia morfológica similar en los núcleos de estos tipos celulares, en el grado de variación que presentan en la movilidad y actividad fagocítica. Foley & Chen (1974) propusieron una clasificación de las células de la hemolinfa de Mercenaria mercenaria, basandose en características cualitativas y cuantitativas, tanto en preparaciones en vivo, como fijadas, distinguiéndose tres tipos de leucocitos: granulocitos, fibrocitos y hialinocitos.

O B J E T I V O

El objetivo fundamental de este trabajo, es identificar y describir las características morfológicas de las células de la hemolinfa de Tivela stultorum, y relacionarlas con la posible función que desempeñen en ella, ya que esto es obviamente esencial como preliminar para estudios posteriores, sobre la función específica, que desempeña cada tipo celular, relacionada con aspectos de defensa interna del organismo.

M A T E R I A L

Se trabajo con 15 ejemplares adquiridos con intervalos de 8 a 15 días aproximadamente, de la playa del Ejido Santa María en San Quintín, Baja California y cuando las condiciones climatológicas no lo permitieron, se adquirieron en carros ambulantes de la localidad, obteniéndolas vivas y conservándolas en bandejas con agua de mar y arena, tratando de mantener al animal en condiciones similares a las de su habitat natural y evitar al máximo alteraciones fisiológicas significativas para el desarrollo del trabajo. En la mayoría de los casos, se examinaron en menos de 24 h, salvo en dos ocasiones en que se trabajaron a las 48 h, y en estos casos se colocaron en un refrigerador. Se tomaron datos como fecha, talla, procedencia, y se les asignó un número para control.

M E T O D O S

La extracción de la muestra de hemolinfa se hizo por medio de una punción en la cavidad pericárdica, con una aguja hipodérmica, succionandose con una jeringa para tuberculina de plástico, con capacidad de lcc. La aguja se introdujo en el extremo inferior de la charnela, en una posición lateral teniendo cuidado de no hacerlo profundamente, para no perforar otras cavidades. La muestra obtenida, se depositó en recipientes de vidrio y plástico, debido a que, algunos tipos celulares, tienen la particularidad de adherirse al material de vidrio, dificultándose su observación. En algunos casos, se utilizó solución Ringer (Humason 1972), para conservarla más tiempo en buenas condiciones, pero en la mayoría de los casos la muestra se trabajó inmediatamente. Se tomaron datos como color, actividad celular y presencia de microorganismos.

Las muestras se trabajaron tanto en vivo como en preparaciones fijas. El estudio en vivo se realizó para hacer observaciones microscópicas de los elementos formes en un estado cercano al que presentan normalmente. Se analizó la hemolinfa, utilizando muestras en estado fresco, sin utilizar reactivos modificadores, y utilizando técnicas de coloración supravital. Las observaciones se hicieron con un microscopio de contraste de fases American Optical (Mod. One-Ten) con un micrómetro ocular calibrado, para efectuar la medición de las células. (Casartelli 1968; Barthelemy et al. 1975).

Una parte de la muestra de hemolinfa obtenida (0.5 ml), fué puesta en contacto durante 20 minutos, con una solución de tinta china al 1% en agua de mar (Hernández 1979), para comparar la existencia de algunas modificaciones celulares con respecto a la muestra natural. Para efectuar las observaciones se colocó una pequeña gota de la muestra entre un portaobjetos y cubreobjetos, sellando con parafina para evitar la desecación, pero este procedimiento se eliminó al notar cambio en la actividad celular debido al efecto de la temperatura. Se observó con un microscópio de contraste de fases American Optical (Mod. One-Ten).

De cada tipo celular, se tomaron datos como forma, tamaño, movimiento, características de las membranas citoplásmica y nuclear, citoplasma y núcleo, aspectos básicos, que fueron necesarios para la interpretación posterior, estos datos fueron resumidos en tablas.

Paralelamente al trabajo con material en vivo, se elaboraron frotis, que fueron colocados en vasos coplin y fijados con metanol, por un tiempo mayor de 10 minutos, posteriormente se les aplicó técnicas de coloración como Giemsa (Gaviño et al. 1977) y Wright (Fernández et al. 1979; Humason 1972). Con una solución buffer, de fosfatos de sodio, evidenciando estructuras que con otras técnicas no es posible apreciar (Ham 1983).

En el material fijado, se tomó en cuenta aspectos como forma, tamaño de la célula y núcleo, presencia de nucleolos, características morfológicas del citoplasma, núcleo y nucleolos, además la tendencia a formar conglomerados. Se efectuó con mayor precisión la cuenta de los elementos presentes, para establecer el porcentaje de cada tipo celular, haciendolo en dos frotis de cada ejemplar estudiado, llevando a cabo en cada uno de ellos, tres veces el conteo

diferencial de los tipos celulares presentes. Se elaboraron los cálculos correspondientes para cada tipo celular en cada ejemplar y finalmente el porcentaje total en todos los organismos. Se utilizaron tablas para resumir los resultados.

Posteriormente, se seleccionaron las laminillas y los tipos celulares representativos, a los cuales se tomaron microfotografías, utilizando un fotomicroscópio Carl Zeiss con luz polarizada (Mod. 14).

R E S U L T A D O S

Los 15 ejemplares con los que se trabajó, tuvieron las características que en forma resumida se presentan en la Fig. 2; Estos datos fueron de suma importancia ya que con ellos se hicieron relaciones en cuanto a la presencia y porcentaje relativo (Fig. 3) que presentaron los diferentes tipos celulares que se encontraron. El tamaño promedio de los tipos celulares se presenta en la Fig. 4.

Se encontraron 11 tipos celulares, que se clasifican dentro de dos categorías bien definidas: Granulocitos y Agranulocitos, dependiendo de la presencia o ausencia de gránulos citoplásmicos. Estos tipos celulares serán nombrados utilizando la letra G para los Granulocitos, y la letra A para los Agranulocitos, siguiendo una secuencia numérica de acuerdo al porcentaje global (Fig. 5) que presentaron.

Fig. 2.- Datos para el control de los ejemplares estudiados y características de su hemolinfa.

EJEMPLAR	FECHA	LONG X ANCH (CM.)	PROCEDENCIA	COLORACION DE LA HEMOLINFA	ACTIVIDAD CELULAR	PRESENCIA DE BACTERIAS	PRESENCIA DE OTROS ORGANISMOS
1	11-IV-83	10 X 7	SAN QUINTIN	CLARA	NORMAL	BAJA	NEMATODOS
2	25-IV-83	9.5 X 6	II	II	ALTA	ALTA	—
3	9-IV-83	15 X 11	II	II	NORMAL	II	—
4	17-V-83	13 X 9	II	II	NORMAL	II	—
5	18-V-83	9 X 6	ENSENADA	AMARILLENTA	ALTA	ALTA	PROTOZOA NEMATODOS
6	6-VI-83	8 X 5	II	CLARA	NORMAL	BAJA	—
7	20-VI-83	8 X 5.5	SAN QUINTIN	II	II	II	—
8	21-VI-83	10.5 X 7	II	AMARILLENTA	BAJA	II	PROTOZOA
9	27-VI-83	10 X 7.5	II	CLARA	ALTA	ALTA	PROTOZOA NEMATODOS
10	29-VII-83	13.5 X 11.5	II	II	NORMAL	BAJA	—
11	19-VIII-83	12.5 X 10.5	II	II	II	II	—
12	29-VIII-83	9 X 6	II	ANARANJADA	BAJA	ALTA	PROTOZOA NEMATODOS
13	6-IX-83	14 X 12	ENSENADA	CLARA	ALTA	II	II
14	19-IX-83	8 X 5	II	II	II	II	II
15	20-IX-83	9 X 6	II	II	II	II	II

Fig. 3.- Porcentajes relativos y globales presentados por los tipos celulares de la hemolinfa de Tivela stultorum.

EJEMPLAR Nº	TIPO CELULAR										
	1G	2G	3G	4G	5G	6G	1A	2A	3A	4A	5A
1	18.04	—	10.74	—	2.46	—	58.16	10.60	—	—	—
2	37.70	—	5.51	6.08	5.88	—	29.52	15.26	—	—	—
3	45.69	5.85	4.26	5.40	2.15	—	31.86	4.77	—	—	—
4	31.03	1.95	4.23	6.87	5.31	—	41.20	9.36	—	—	—
5	29.16	17.14	3.35	7.22	6.09	—	22.23	14.30	—	—	—
6	53.10	9.68	4.03	3.51	—	—	22.71	6.97	—	—	—
7	43.91	11.31	—	4.09	1.35	—	33.71	4.26	—	1.35	—
8	25.72	3.69	4.16	2.03	—	—	60.11	—	—	4.28	—
9	17.72	2.72	4.32	2.68	1.26	6.90	42.87	19.19	—	—	2.34
10	61.71	2.92	3.21	3.79	—	—	26.35	2.01	—	—	—
11	56.29	4.83	3.51	1.48	—	—	31.39	2.49	—	—	—
12	44.45	8.71	1.42	3.56	2.02	—	29.64	10.20	—	—	—
13	35.78	3.63	2.81	2.69	—	—	23.96	11.66	19.47	—	—
14	39.01	2.41	3.61	3.97	2.23	—	21.53	14.14	13.10	—	—
15	44.91	5.21	8.70	4.93	2.31	—	17.35	16.59	—	—	—
% GLOBAL	38.94	5.33	4.25	3.88	2.07	0.46	32.83	9.48	2.17	0.37	0.15

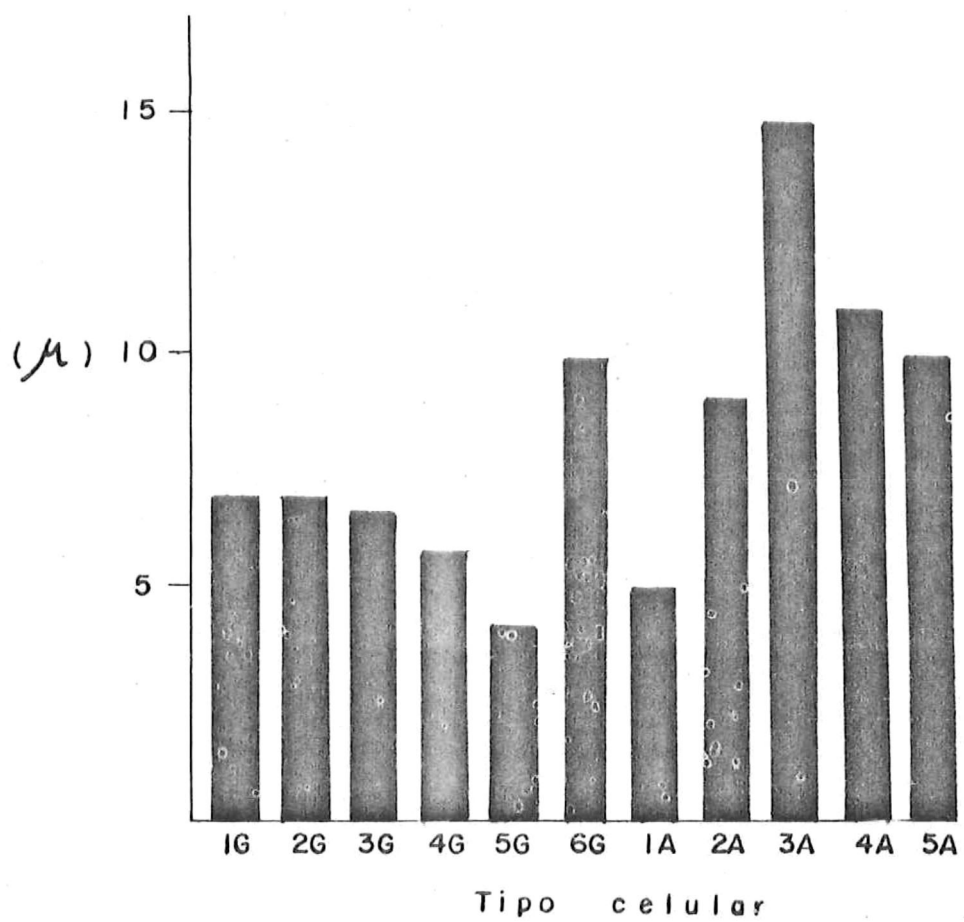


Fig. 4.- Tamaño de los tipos celulares de la hemolinfa de Tivela stultorum.

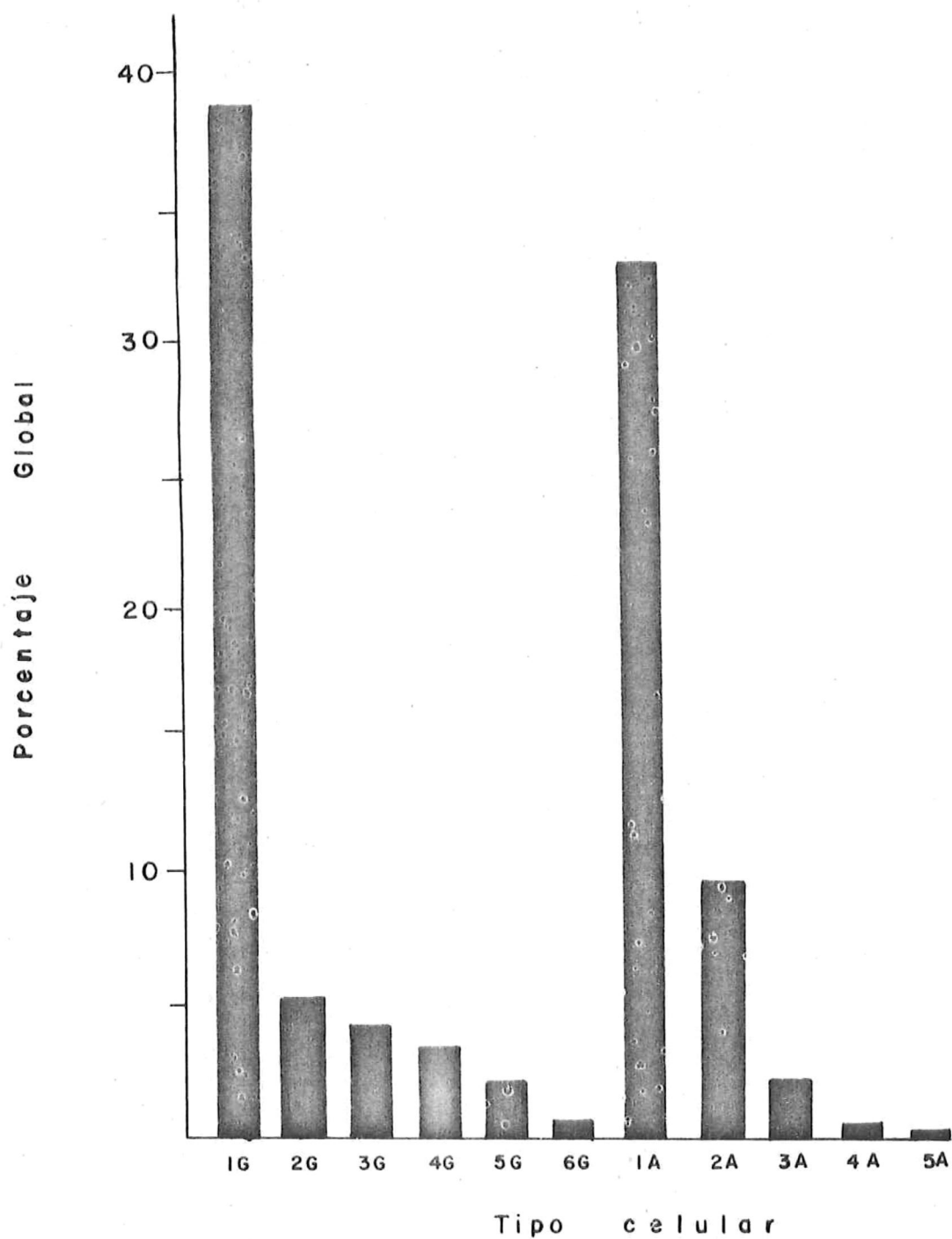


Fig. 5.- Porcentajes globales que presentan los tipos celulares de la hemolinfa de Tivela stultorum.

GRANULOCITOS

Dentro de los granulocitos, tenemos los siguientes tipos celulares, determinados en base a sus características morfológicas, actividad y coloración.

TIPO 1G.

Este tipo celular fué observado con un porcentaje de 38.94% tiene un tamaño de 6 a 8 μ , su forma es redonda, aunque es frecuente observar deformaciones de la membrana citoplásmica, dándole a la célula un aspecto irregular.

En frotis teñidos con Giemsa y Wright, el citoplasma tiene una coloración ligeramente basófila, con gránulos neutrófilos, heterogéneos en tamaño y no muy abundantes, generalmente localizados hacia la periferia, dando un aspecto más oscuro a esa zona. En ocasiones los gránulos llenan casi todo el citoplasma.

El núcleo, tiene un tamaño de 4.5 a 5 μ , la membrana es evidente y basófila, su forma es un poco ovoide y su posición es excéntrica, tiene coloración basófila, ocasionalmente con un nucleolo muy basófilo, desplazado hacia un extremo.

En vivo, el citoplasma tiene una coloración grisácea opaca tanto los gránulos citoplásmicos como el núcleo se observan oscuros. Se noto la formación de filopodios, localizados en un extremo de la célula, los cuales se bifurcan formando ramificaciones, que en conjunto dan la apariencia de un penacho que tiene un movimiento de tipo rotativo.

La membrana citoplásmica presenta evidentes deformaciones,

que provocan la constitución de prolongaciones cortas y gruesas a manera de pseudópodos. Los gránulos citoplásmicos tienen un constante movimiento de ciclósis, concentrándose en las áreas donde se forman pseudópodos, dándoles un aspecto oscuro. El núcleo también presenta un claro movimiento de tipo contráctil, con formación de ondulaciones verticales, y a veces se observa la aparición de una escotadura que le dá un aspecto reniforme.

En las muestras a las que se añadió colorante vital, se observó incorporación de éste, formandose manchones oscuros en el citoplasma, además de que el movimiento en las células se intensificó, siendo más evidente la formación de pseudópodos y el movimiento nuclear.

Estas células tienen un movimiento lento, y hay una clara tendencia a formar conglomerados, de tamaño y número de células variables. Por la presencia de colorante vital incorporado, y por el tipo de movimiento observado, se podría considerar a este tipo celular como fagocítico. (Fig. 6).

TIPO 2G.

Este tipo celular solo fué observado en frotis teñidos, con un porcentaje de 5.33%, tiene un tamaño de 6 a 8 μ , su forma es redonda aunque frecuentemente hay deformación de la membrana citoplásmica, dándole a la célula un aspecto irregular.

El citoplasma es ligeramente basófilo, con pocos gránulos basófilos y grandes, localizados hacia la periferia, ocasionalmente llenan todo el citoplasma.

El núcleo tiene un tamaño de 4.5 a 5 μ , con una membrana evidente un poco oscura, su forma es ovoide y tiene posición bastante excéntrica, la coloración es ligeramente basófila, no homogénea. En algunas células se observó un nucleolo, oscuro y desplazado hacia un extremo.

Existe tendencia a formar conglomerados, y en las muestras a las que se les añadió colorante vital, no fué evidente la incorporación de éste. Este tipo celular presenta bastantes similitudes con el tipo 1G, siendo diferente únicamente en la coloración que presenta, tanto el citoplasma y sus gránulos como el núcleo, por lo que en vivo no se logró diferenciarlos claramente. Aunque no fué muy evidente la incorporación de colorante vital, por la presencia de gránulos, se le atribuye una función fagocítica. (Fig. 7).

TIPO 3G.

Este tipo celular, fué observado con un porcentaje de 4.25% apareciendo en la mayoría de los organismos estudiados, sin importar el estado de la hemolinfa, tiene un tamaño de 5 a 8 μ , forma es redonda, y ocasionalmente se observa ligera deformación de la membrana citoplásmica, con aspecto de ondulaciones.

En frotis teñidos, el citoplasma tiene una coloración basófila con gránulos muy finos y oscuros, distribuídos homogéneamente.

El núcleo es lobulado, presentando de 2 a 3 lóbulos unidos por una banda sumamente delgada, cada lóbulo mide aproximadamente

1.5 μ , sin una posición definida, ya que la orientación de los lóbulos es variable. La coloración es basófila, y en algunas células se observó un nucleolo pequeño y oscuro en cada lóbulo.

En vivo, el citoplasma tiene una coloración grisácea opaca los gránulos se observan como puntos muy finos, y el núcleo tiene una coloración oscura no homogénea.

En algunas muestras a las que se les añadió colorante vital, se observó ligera incorporación de éste, además se notó un visible incremento en el tamaño de las células que se encontraban en hemolinfa con una coloración amarillenta, considerada como anormal, debido a la escasa actividad celular y al alto índice de bacterias y otros organismos.

El movimiento que presentan estas células es lento, además se observó un leve movimiento contráctil tanto en el núcleo como en la célula.

Debido a que se observó incorporación de colorante vital, y al tipo de movimiento que presenta, se puede considerar a este tipo celular como fagocítico. (Fig. 8).

TIPO 4G.

Este tipo celular fué observado con un porcentaje de 3.88% tiene un tamaño de 5 a 8 μ , su forma es redonda, la membrana citoplásmica no es evidente y no se observa deformación en ella.

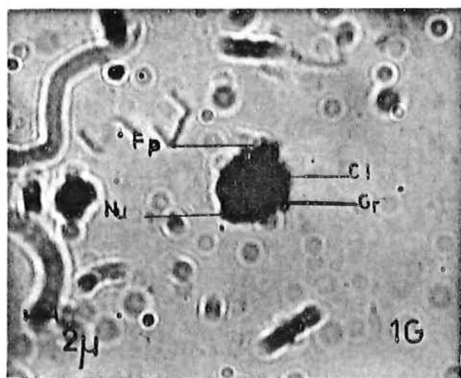


Fig. 6

Tipo celular 1G.- Citoplasma basófilo, con gránulos neutrófilos. Núcleo basófilo y excéntrico. Presenta filopodios. Téc. de Wright. (100X).

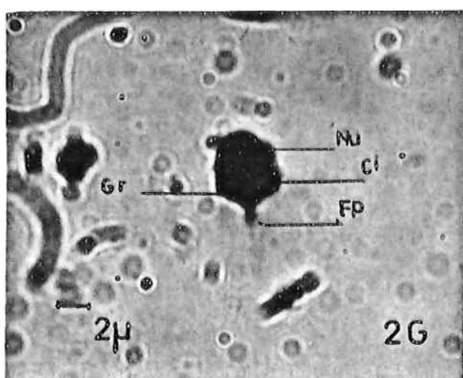


Fig. 7

Tipo celular 2G.- Citoplasma basófilo, con gránulos basófilos. Núcleo basófilo y excéntrico. Presenta filopodios. Téc. de Wright. (100X).

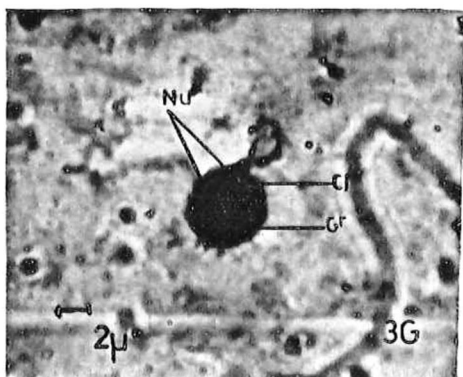


Fig. 8

Tipo celular 3G.- Citoplasma basófilo, con gránulos oscuros muy finos. Núcleo basófilo y lobulado. Téc. de Giemsa. (100 X).

Citoplasma (Ci); Núcleo (Nu); Gránulos (Gr); Filopodios (Fp).

En frotis teñidos, el citoplasma es ligeramente basófilo, en ocasiones muy pálido, tiene gran cantidad de gránulos eosinófilos, redondos y homogéneos.

El núcleo por lo general no se observa, ya que se encuentra enmascarado por los gránulos citoplásmicos, solamente se logra ver un poco utilizando contraste de fases, con lo que se aprecia a manera de manchones basófilos, localizados en el centro de la célula.

En vivo, el citoplasma se observa con una coloración pálida y refringente, con los gránulos claros y brillantes. En las muestras donde se utilizó colorante vital, no se notó ningún cambio importante.

Presentan movimiento de tipo circular, además de desplazamiento lento. Por la presencia de gránulos, se puede considerar a este tipo celular como fagocítico, aunque no puede afirmarse con certeza, ya que no hubo otras evidencias como incorporación de colorante vital o movimiento característico de células fagocíticas. (Fig. 9).

TIPO 5G.

Este tipo celular fué observado únicamente en frotis, con un porcentaje de 2.07%, se presentó en la mayoría de los organismos estudiados, tiene un tamaño de 3 a 5 μ , la membrana citoplásmica no es evidente, y no se observa deformación.

El citoplasma es ligeramente basófilo, haciéndose notar la presencia de abundantes gránulos grandes, con una coloración basófila, distribuidos en todo el citoplasma.

El núcleo generalmente no se observa, ya que se encuentra enmascarado por los gránulos del citoplasma, solamente se logra ver un poco utilizando contraste de fases, apreciándose como una región central más densa.

No puede precisarse su función debido a que, las observaciones fueron escasas y no en vivo, aunque la presencia de abundantes gránulos, nos indica una función fagocítica. (Fig. 10).

TIPO 6G.

Este tipo celular solamente fué observado en frotis teñidos, con un porcentaje de 0.46%, en un solo organismo, con la característica de presentar un alto índice de bacterias en la hemolinfa. Su tamaño es de 10 a 14 μ , tiene una forma oval. La membrana citoplásmica es evidente y se observa deformación en ella.

El citoplasma es abundante, acidófilo, con gran cantidad de gránulos eosinófilos, redondos y homogéneos, localizados hacia la periferia; en algunas células llenan casi todo el citoplasma, dejando libre de ellos, una región alrededor del núcleo.

El núcleo tiene un tamaño de 4.4 μ , la membrana es evidente, ligeramente más oscura que el núcleo, el cuál es basófilo, redondo y excéntrico. Se observa cromatina dispuesta de una manera radial, con una apariencia de hilos delgados y oscuros.

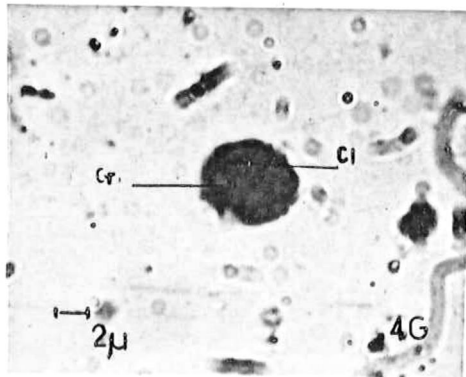


Fig. 9

Tipo celular 4G.- Citoplasma basófilo, con gránulos eosinófilos, enmascarando el núcleo.
Téc. de Wright. (100X).

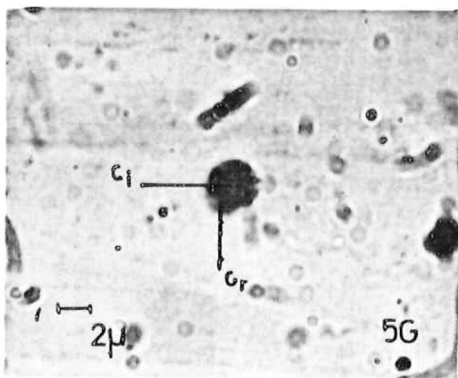


Fig. 10

Tipo celular 5G.- Citoplasma ligeramente basófilo con abundantes gránulos basófilos enmascarando al núcleo.
Téc. de Wright. (100X).

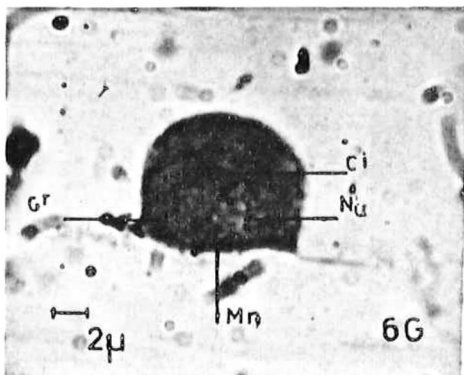


Fig. 11

Tipo celular 6G.- Citoplasma acidófilo, con gránulos eosinófilos. Núcleo basófilo con cromatina radial. Membrana nuclear evidente.
Téc. de Wright. (100X).

Citoplasma (Ci); Núcleo (Nu);
Gránulos (Gr); Membrana nuclear
(Mn).

Debido a la presencia de gránulos, podría considerarse que este tipo celular es fagocítico, sin precisarlo definitivamente ya que no contamos con suficientes evidencias para hacerlo . (Fig. 11).

AGRANULOCITOS

De acuerdo a sus características morfológicas, actividad y reacciones de coloración, se han clasificado como Agranulocitos a los siguientes tipos celulares.

TIPO 1A.

Este tipo celular fué observado con un porcentaje de 32.83% presentándose en todos los organismos estudiados. El tamaño que tiene es de 2 a 6 μ , su forma es esférica, y la membrana citoplásmica no es muy evidente.

En frotis teñidos se observa que el citoplasma es escaso, encontrándose como un anillo delgado en la periferia, y ocasionalmente formando un pequeño casquete, no tiene gránulos y su coloración es basófila.

El núcleo tiene un tamaño de 3.5 a 4.5 μ , su membrana no es evidente. Ocupa la mayor parte de la célula, generalmente es redondo, pero en ocasiones presenta una escotadura que le dá un aspecto reniforme, se localiza centralmente, y en algunas células completamente desplazado hacia un extremo, su coloración es basófila y no se observan nucleolos.

En vivo el citoplasma tiene una coloración pálida, refringente, el núcleo se observa oscuro. No se notó cambios importantes en las muestras a las que se les añadió colorante vital.

Tienen un movimiento lento. En algunas de las muestras, se observaron modificaciones importantes, como deformación de la célula, hasta alcanzar una forma completamente ovoide tanto en el núcleo como en la célula, además de la presencia de vesículas pequeñas y refringentes, distribuidas en hileras en la periferia. También se observó la formación de un filamento largo, muy delgado con apariencia rígida, y en su parte terminal presenta un abultamiento que sufre evidentes transformaciones, que van desde una forma completamente esférica, hasta una forma alargada con apariencia de lanza; en el interior de esta estructura, hay un movimiento continuo de material, observándose la aparición y desaparición de zonas oscuras.

Posiblemente hay flujo de material desde el cuerpo de la célula hacia el abultamiento, a través del filamento, y posteriormente haya un desprendimiento de una sección del filamento que lleva consigo el abultamiento, después el filamento se va retrayendo poco a poco y el abultamiento va tomando una forma esférica de aproximadamente 4 μ , originándose una nueva célula, por lo que parece ser un proceso de gemación.

Este tipo celular no se considera fagocítico, debido a que no presenta gránulos citoplásmicos, además no se observó incorporación de colorante vital, y el tipo de movimiento no corresponde al de células de este tipo. (Figs. 12, 13, 14 y 15).

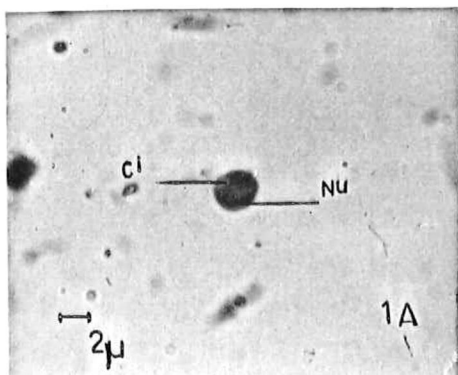


Fig. 12

Tipo celular 1A.- Citoplasma periférico, basófilo y agranular. Núcleo basófilo, ocupando la mayor parte de la célula. Téc. de Wright. (100X).

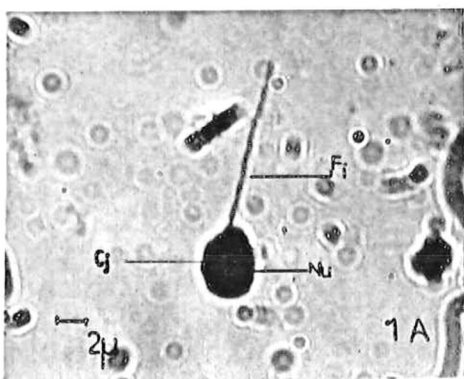


Fig. 13

Tipo celular 1A (modificación).- Citoplasma y Núcleo muy basófilos, se observa la presencia de un filamento rígido. Téc. de Wright. (100X).

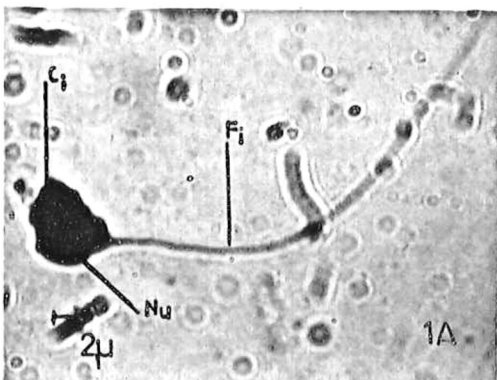


Fig. 14

Tipo celular 1A (modificación).- Citoplasma y Núcleo muy basófilos. Se observa en detalle un filamento muy alargado. Evidente deformación de la célula. Téc. de Wright. (100X).

Citoplasma (Ci); Núcleo (Nu); Filamento (Fi).

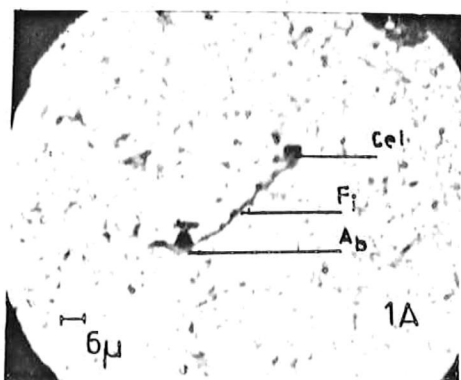


Fig. 15

Tipo celular 1A (modificación).- Célula con un filamento, en cuyo extremo tiene un abultamiento. Téc. de Giemsa. (40X).

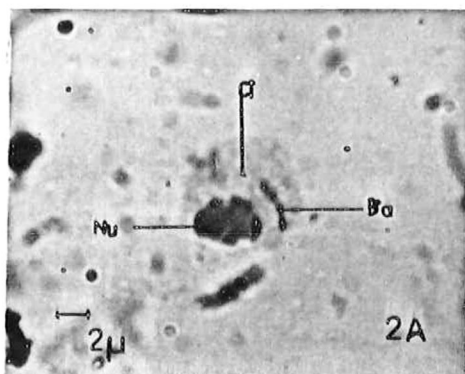


Fig. 16

Tipo celular 2A.- Citoplasma abundante, vesiculoso, ligeramente acidófilo, con bacterias. Núcleo basófilo, con aspecto granuloso, excéntrico. Téc. de Wright. (100X).

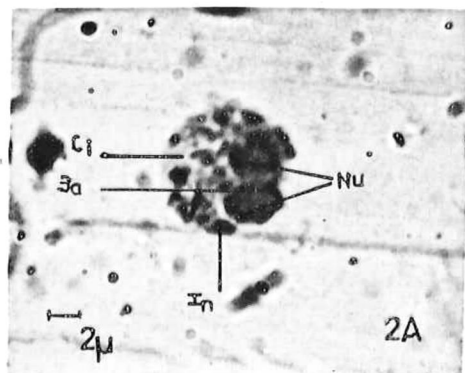


Fig. 17

Tipo celular 2A (modificación).- Citoplasma lleno de bacterias y otras inclusiones. Se observan dos núcleos. Téc. de Wright. (100X).

Citoplasma (Ci); Núcleo (Nu); Célula (Cel); Filamento (Fi); Bacterias (Ba); Inclusiones (In).

TIPO 2A.

Este tipo celular fué observado con un porcentaje de 9.48% siendo evidente un incremento del porcentaje relativo, en las muestras de hemolinfa donde la presencia de bacterias y nemátodos fué notable, tiene un tamaño de 8 a 12 μ , su forma es esférica, aunque debido a deformaciones de la membrana citoplásmica, frecuentemente adopta una forma irregular, la membrana citoplásmica es evidente, ligeramente basófila.

En frotis teñidos se observa un citoplasma abundante con aspecto vesiculoso, con coloración ligeramente acidófila, no se nota la presencia de gránulos, aunque no debe descartarse por completo. En algunas células se nota la presencia de pequeñas estructuras en su interior, con apariencia de ser bacterias, ya que su forma y tamaño es similar a las que se observaron en la hemolinfa, no se determinó a que especie correspondan, pero morfológicamente son tipo bacilos.

El núcleo tiene un tamaño de 5 μ , la membrana es evidente y a veces presenta partículas oscuras adheridas. La forma varía de redonda a ovoide, su posición es excéntrica, con una coloración basófila no homogénea, notándose ocasionalmente un aspecto granuloso, no se observaron nucleolos.

En vivo el citoplasma es claro, no homogéneo, con aspecto grumoso, el núcleo se observa oscuro con regiones más densas. En las muestras a las que se les añadió colorante vital, fué posible ver que en ocasiones hubo incorporación de éste, notándose un evidente aceleramiento de la actividad celular, manifestándose por un movimiento de ciclósis, además, el desplazamiento de la célula se intensificó, notándose este incremento aún más en aquellos organismos en los cuales la hemolinfa presentó un alto índice de bacterias y otros microorganismos.

mos.

El movimiento y la actividad fagocítica de estas células es muy evidente, se observó un desplazamiento muy rápido y clara fagocitosis de bacterias, efectuado mediante la emisión de pseudópodos cortos y gruesos. En el interior de la célula hay gran actividad de los organismos ingeridos, los cuales provocan la formación de grandes abultamientos en la membrana citoplásmica.

Se considera que hay suficientes evidencias, como es la incorporación de colorante vital, tipo de movimiento, clara ingestión de bacterias, que permiten afirmar que este tipo celular tiene función fagocítica, aunque no se observó la presencia de gránulos, característica común a aquellas células con función fagocítica. (Figs. 16 y 17).

TIPO 3A.

Este tipo celular solamente fué observado en frotis teñidos, con un porcentaje de 2.17%, su tamaño es muy variable, se presenta con un rango de 8 a 25 μ , no tiene una forma definida pues se observa gran cantidad de prolongaciones sumamente delgadas.

El citoplasma es abundante, con un aspecto vacuolado, la coloración es acidófila y no se observan gránulos.

El núcleo tiene un tamaño promedio de 7 μ , sin forma definida, ya que al igual que el citoplasma, presenta prolongaciones muy delgadas, que inclusive, en ocasiones parecen

sobresalir de la célula. La posición es central y su coloración es acidófila.

Este tipo celular solo se observó en dos organismos, pero con un porcentaje relativo alto. Los organismos en los que se encontró, fueron conservados por más de 48 horas retirados de su habitat antes de tomar la muestra de hemolinfa; además presentaron alto índice de bacterias, protozoarios y nemátodos.

No se puede indicar con precisión la posible función que desempeñe este tipo de células, ya que no se observó en vivo, además, las características de su citoplasma no están muy definidas, solo la presencia de gran cantidad de prolongaciones, podría sugerir actividad fagocítica, sin afirmarlo definitivamente. (Fig. 18).

TIPO 4A.

Este tipo celular solo fué observado en frotis teñidos, con un porcentaje de 0.37%, en dos organismos únicamente, uno considerado con hemolinfa normal, y otro con hemolinfa con un color amarillento y escasa actividad celular, y gran cantidad de microorganismos.

El tamaño observado fué de 11 μ , su forma es esférica, la membrana citoplásmica es evidente y tiene una coloración basófila, se observa ligera deformación a manera de pequeñas ondulaciones.

El citoplasma es abundante, con aspecto vesiculoso, su coloración es basófila, no homogénea, y no se observa la presencia de gránulos.

El núcleo tiene un tamaño de 4 μ , es pequeño con relación al citoplasma, su posición es central, aunque en ocasiones es excéntrico, la coloración es basófila, no homogénea, notándose regiones más oscuras en el centro.

Tal vez, no tenga función fagocítica, ya que no se observaron evidencias que lo indiquen, aunque las observaciones no fueron suficientes para poder afirmarlo. (Fig. 19).

TIPO 5A.

Este tipo celular, solo se observó en frotis teñidos, con un porcentaje de 0.15%, en un solo organismo, con la característica de presentar un alto índice de bacterias en la hemolinfa. Su tamaño es de 10 μ , tiene una forma esférica, la membrana citoplásmica es evidente, con una coloración basófila y no presenta deformación. El citoplasma es abundante, con coloración ligeramente basófila y homogénea, no hay presencia de gránulos.

El núcleo tiene un tamaño promedio de 4.5 x 5.5 μ , es reniforme, con posición excéntrica, la coloración es acidófila, observándose la presencia de gránulos basófilos y redondos.

No hay evidencias para considerar este tipo celular como fagocítico, a reserva de hacer mayor número de observaciones, ya que como se indicó, se observó con un porcentaje sumamente bajo que no permitió hacerlas ampliamente. (Fig. 20).

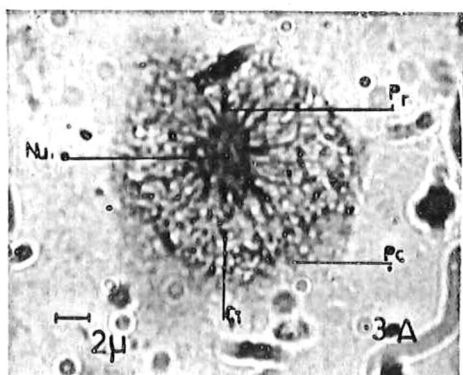


Fig. 18

Tipo celular 3A.- Citoplasma acidófilo, con gran cantidad de prolongaciones. Núcleo eosinófilo, con aspecto estrellado y prolongaciones. Téc. de Wright. (100X).

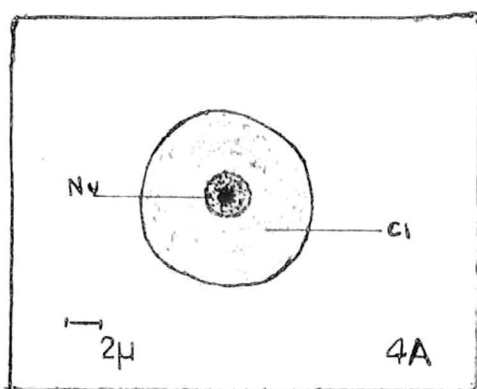


Fig. 19

Tipo celular 4A.- Citoplasma basófilo, vesiculoso. Núcleo basófilo, pequeño con relación al citoplasma. Téc. de Wright. (100X).

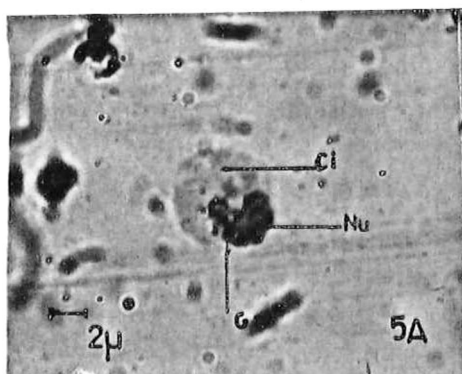


Fig. 20

Tipo celular 5A.- Citoplasma basófilo. Núcleo acidófilo y reniforme, con gránulos basófilos. Téc. de Wright. (100X).

Citoplasma (Ci); Núcleo (Nu); Gránulos (Gr); Prolongaciones citoplásmicas (Pc); Prolongaciones nucleares (Pr).

D I S C U S I O N

La diversidad de células presentes en la hemolinfa de Tivela stultorum, quedaría comprendida en una clasificación general, que considera dos tipos celulares básicos (Cheney 1971; Foley & Cheng 1974; Moore & Eble 1977; Flores 1982; Hernández 1983). Estos tipos celulares, por la presencia o ausencia de gránulos en su citoplasma, son llamados Granulocitos y Agranulocitos. Dentro de esta clasificación básica, se presentaron variedades, de acuerdo a diferencias en cuanto a características morfológicas y tipo de actividad. La clasificación y nomenclatura utilizada para nombrar a estas variedades morfológicas, se puede decir que es muy variable, ya que cada autor, aún siguiendo un criterio básico, utiliza diferentes términos para referirse a un mismo tipo, encontrándose que no existe una clasificación completamente establecida, que incluya a los diferentes tipos celulares de la hemolinfa de moluscos.

En cuanto a la función que se le puede atribuir a cada tipo celular dentro de la hemolinfa, no debe tomarse a la ligera, ya que para poder identificar un tipo celular y determinar la función que desempeña, se deben tomar en cuenta gran cantidad de factores que podrían ser causa de variaciones morfológicas y funcionales. Además de características morfológicas y morfométricas, tanto de las células como de sus estructuras, es importante el estudio en vivo de estos elementos, para poder determinar su comportamiento. El

estado fisiológico del organismo, las características de su habitat y las variaciones de cualquier índole que en él ocurran, son factores importantes, ya que pueden provocar cambios, tanto en la frecuencia de los tipos celulares como cambios morfofisiológicos.

En este trabajo, se ha intentado cubrir todos estos aspectos, para sentar un antecedente que permita posteriormente, determinar con mayor precisión, los tipos celulares y su función dentro de la hemolinfa de Tivela stultorum.

Se sabe que todo sistema de leucocitos funciona para defender al organismo contra cuerpos extraños (Hillman 1977). Esta defensa contra cuerpos extraños, incluye dos mecanismos generales que son: Fagocitosis de una sustancia reconocida como extraña y Desarrollo de una respuesta inmunitaria contra sustancias extrañas (Hillman 1977; Hernández 1983). La naturaleza de estas reacciones dependerá del tipo y características de agente extraño, observandose una reacción general de las células, y en ocasiones en mayor grado, de determinado tipo de células.

Los tipos celulares 1G, 2G, 3G y 2A, se consideraron fagocíticos debido a que hubo incorporación de colorante vital, por su movimiento y fagocitosis de bacterias. En los tipos clasificados como 4G, 5G, 6G y 3A, no se encontraron suficientes evidencias para afirmar que desempeñan una función fagocítica, pero se observa cierta tendencia a ello. Los tipos 1A, 4A y 5A, no son fagocíticos y se desconoce la respuesta que puedan dar como mecanismo de defensa, u otro tipo de función que desempeñen.

Los tipos 1G y 2G son similares morfológicamente, pero presentan diferentes reacciones de coloración con las técnicas utilizadas, por lo que puede considerarse que sus estructuras internas, producen diferente tipo de sustancias. Entre estos dos tipos no se pudo establecer una clara diferencia al ser observados en vivo. Se observó incorporación de colorante vital, pero no se pudo ver el mecanismo de incorporación, ya que el tipo de partículas que forman el colorante son muy finas. La deformación que sufre este tipo de células y la formación de pseudópodos, son evidencias de su función fagocítica; Estas células presentan semejanzas con las reportadas como granulocitos por Foley & Cheng (1974), o granulocitos con pseudópodos filamentosos, por Cheney (1971).

Estos tipos celulares tienen la particularidad de adherirse a material de vidrio por lo que se hace difícil, a pesar de su abundancia, la observación en vivo. Si durante el manejo de la muestra de hemolinfa, esta es extraída con material de plástico y se coloca en el portaobjetos directamente, después de 20 minutos aproximadamente, es posible observar estas células adheridas al sustrato sólido y ver la formación de filopodios que se extienden y contraen constantemente, estas estructuras desaparecen por completo al detenerse la actividad celular, por lo que en frotis fijados, es muy difícil observarlos. Según Foley & Cheng (1974), este tipo de comportamiento ha sido significativo para la identificación y clasificación de estas células.

Ha sido particularmente notable, la tendencia de estas células a formar conglomerados. En frotis teñidos, se han observado conglomerados formados por un solo tipo de células

(1G) y por dos tipos de células (1G y 2G). El número de células que forman estos conglomerados es muy variable, se observaron desde dos células a varias decenas, formando una gran masa sin forma definida y este tipo de comportamiento ha sido mencionado por George & Ferguson (1950) y por Foley & Cheng (1974).

Hillman (1977) afirmó que la tendencia a formar asociaciones de células, es con el fin de poder ingerir partículas de mayor tamaño. No se pudo observar esta particularidad, aunque no se descarta la posibilidad debido a que en algunos conglomerados, se observó ocasionalmente en la membrana de las células, partículas oscuras adheridas a ella.

En el tipo 3G, la presencia de gránulos y una ligera incorporación de colorante vital en algunas células, indican fagocitosis, aunque no pudieron ser observados los mecanismos de ella. En los trabajos de Flores (1982) y Hernández (1983) se reporta un tipo celular con cierta semejanza a él. Ellos describen un tipo celular al que llaman células granulares I ó células cafés, que presenta un núcleo lobulado, aunque la descripción que se hace de los gránulos, es diferente, ya que en este trabajo se han descrito como gránulos muy finos y neutrófilos, y ellos hablan de gránulos ovoides o irregulares, pigmentados y basófilos. En cuanto al tipo de movimiento, hay coincidencia entre nuestra descripción y la de Hernández (1983) ya que se menciona la presencia de pequeñas ondulaciones que aparecen y desaparecen.

Flores (1982) y Hernández (1983), anotaron que estas células, son las más abundantes, aunque sus apreciaciones fueron aproximadas, ya que no se reportan haber efectuado cuenta de células en frotis fijados, el porcentaje que mencionan es de un 85% del total de los tipos celulares de Anadara tuberculosa. Nosotros reportamos en frotis fijados, un porcentaje de 4.25% en Tivela stultorum, por lo que apreciamos una gran diferencia en los porcentajes.

En cuanto a tamaño, Flores (1982), dice que en promedio miden de 14 a 16 μ , Hernández (1983) solo menciona que son muy grandes, nosotros reportamos que en promedio miden 6.6 μ , aunque cabe hacer mención de que en una de las muestras de hemolinfa con una coloración amarillenta, actividad celular casi nula, y alto índice de bacterias, se observó la presencia de este tipo celular con un tamaño de 12 a 14 μ . En general, tomando como base las comparaciones hechas en cuanto a este tipo celular como fueron, características de coloración de los gránulos, frecuencia y tamaño, consideramos que son tipos celulares diferentes, a reserva de realizar comparaciones más específicas, puesto que Flores (1982) y Hernández (1983), lo reportan en Anadara tuberculosa y nosotros en Tivela stultorum, por lo que se debe considerar diversos factores, tanto físicos como biológicos, para poder determinar si son tipos celulares similares o no.

El tipo 4G, podría considerarse potencialmente fagocítico, debido a la presencia de abundantes gránulos; Este tipo coincide morfológicamente, con la descripción hecha por Hernández (1983) para el tipo celular nombrado como células granulares III (esferulocitos), pero no se reportan datos de tamaño ni coloración, además, no se encontró en la bibliografía disponible ninguna otra referencia.

Presenta cierta semejanza con el tipo clasificado por nosotros como 1G, aunque los gránulos son más notables, con una coloración eosinófila y muy abundantes. Se piensa que podría tratarse de un estado de maduración diferente, hecho que no puede afirmarse, ya que hacen falta más observaciones y otro tipo de técnicas para comprobarlo.

El porcentaje con que se presentó este tipo de células, fué relativamente bajo (3.88%), aunque se observa un ligero incremento del porcentaje, en las muestras tomadas de almejas con alto índice de bacterias y nemátodos, factor que podría servir de apoyo para pensar que, se trata de un estado de maduración diferente del tipo clasificado como 1G, puesto que este tipo es considerado fagocítico, y al haber un incremento de material extraño en el organismo podrían desencadenarse mecanismos de formación de nuevas células, para contrarrestar los efectos que pudiera provocar el material extraño. A reserva de comprobar lo expuesto, se considerará a este tipo celular como diferente.

El tipo 5G, es parecido al tipo 4G, difiriendo en tamaño de la célula y reacciones de coloración de los gránulos, ya que en este tipo son basófilos.

Al igual que en el tipo 4G, se observa un incremento importante de este tipo celular, en aquellas muestras tomadas de almejas con alto índice de bacterias y nemátodos.

De la misma manera que el tipo 4G, se puede considerar, debido a la presencia de gran cantidad de gránulos, potencialmente fagocítico

y cabe pensar que, de igual manera, podría tratarse de un estado fisiológico diferente del tipo 1G, exponiéndose las mismas razones que en el tipo anterior, para no afirmarlo definitivamente.

El tipo 1A, no lo consideramos fagocítico o la menos, no encontramos evidencias de ello. La descripción que se hace de él, de acuerdo a las características observadas, coincide con el tipo celular descrito como agranulocitos por Moore & Eble (1977), células tipo I, semejantes a linfocitos por Flores (1982) y como células agranulares semejantes a linfocitos por Hernández (1983).

En este tipo celular, fué observado un comportamiento, del cual no encontramos referencia en otros trabajos. Podría tratarse de un mecanismo mediante el cuál, se forman nuevas células, este mecanismo solo fué observado en dos ejemplares, obtenidos en una época en la que hubo un incremento en la temperatura de su habitat, debido a la influencia de una corriente marina, no común en esta región, por lo que, esto pudo haber sido un factor importante en este peculiar comportamiento, pero evidentemente, para llegar a una conclusión, es necesario considerar más ampliamente una serie de factores como son: Cambios de temperatura, hábitos alimenticios, salinidad del medio, presencia y cantidad de microorganismos en la hemolinfa y observar en que condiciones específicamente, aparecen estas modificaciones, ya que Akberali (1980), menciona que la concentración de iones en la hemolinfa, varía paralelamente con la concentración del medio, y Foley & Cheng (1974) proponen la tesis de que se pueden producir cambios cuantitativos y cualitativos en los leucocitos, influenciados por variaciones en alimentación, cambios de intensidad de luz, temperatura y salinidad, ó por la presencia de materia orgánica, y que estos factores en conjunto, pueden provocar una variación de los leucocitos circulantes, atribuídos al estado fisiológico del individuo.

En nuestro trabajo, el porcentaje para este tipo celular es bastante elevado (32.83%), lo cual no corresponde al porcentaje mencionado por Moore & Eble (1977) que es de un 2%, y por Flores (1982) que sin precisar un porcentaje, indica que son las menos abundantes en la hemolinfa, por lo que pensamos, que esta gran diferencia podría deberse a diversas causas como son factores físicos del medio en que vive el organismo.

Si según sus características morfológicas, este tipo celular, fuese realmente un linfocito y tuviera las funciones de dicha célula, entre ellas, según Hillman (1977), la de reaccionar formando anticuerpos e iniciar una respuesta de tipo inmunitario que protegería al organismo contra agentes patógenos ambientales, se relacionaría el alto porcentaje cuantificado, como una respuesta a agentes extraños, ya que la mayoría de los organismos estudiados, tuvieron un alto grado de incidencia de microorganismos, que aunque no se precisó si son patógenos, se encontraron en una cantidad anormal.

Este tipo de respuesta aún no es bien conocida en invertebrados, aunque Cheng & Sullivan (1983) citan un trabajo de Acton & Evans (1968), en donde indujeron por medio del colifago T2, una respuesta de este tipo en moluscos bivalvos, específicamente en Crassostrea virginica.

Nosotros no pudimos determinar la función de este tipo celular, pero morfológicamente, al igual que los autores Flores (1982) y Hernández (1983), los seguiremos considerando tipo linfocitos, a reserva de verificar si su función es similar.

El tipo 2A, lo consideramos fagocítico. Las evidencias para ello son suficientes porque, tanto en vivo como en frotis fijados, se observó la presencia de bacterias en su interior, además de que fué posible ver el mecanismo de fagocitosis, que se realizó por medio de la formación de pseudópodos cortos y gruesos, que captan rápidamente las bacterias, quedando estas atrapadas en el interior de la célula.

Moore & Eble (1977) mencionan haber observado ocasionalmente fagocitosis de bacterias, efectuada por células de tipo granulocítico y nunca en agranulocíticos. El tipo celular clasificado por nosotros como 2A, se consideró como agranulocítico, pues como se describe en los resultados, no presenta gránulos o al menos no fueron observados, aunque cabe la posibilidad de que los contenga, pero no se hicieron evidentes con las técnicas de coloración utilizadas. Según Flores (1982) hay algunos tipos de gránulos que no son notables con las técnicas de coloración comunes, por lo que habría que comprobar, utilizando técnicas más específicas, si en realidad corresponde a un tipo agranulocítico.

Foley & Cheng (1974) mencionan un tipo con semejanza a este, y lo llaman hialinocito, describiendo que contienen algunos cuerpos vermiformes, vacuolas y cuerpos refráctiles situados cerca del núcleo, características observadas en las células que mencionamos.

Es importante hacer notar que, estas células, presentan una frecuencia elevada, que se modifica considerablemente, incrementándose al haber un número elevado de bacterias en la hemolinfa del organismo, además se observa un aumento en la movilidad de la célula, por lo que puede decirse que el porcentaje y actividad de estas células, depende en gran medida, de la influencia de agentes extraños en la hemolinfa.

Los tipos 6G, 3A, 4A y 5A, son tipos que aún, con no ser predominantes o representativos, puesto que su porcentaje fué muy bajo ó en su defecto alto, pero en muy pocos de los ejemplares estudiados, fueron tomados en cuenta considerando que posiblemente sean modificaciones morfológicas de alguno de los tipos predominantes, ó tipos que se presenten al haber alguna condición que provoque su presencia, y que para nosotros es desconocida. Sobre estos tipos, no se encontró referencia alguna en la bibliografía disponible, por lo que se carece de fundamentos sólidos para efectuar una discusión acerca de ellos, sin embargo, se tratará de proponer una posible función para ellos, en la hemolinfa, en base a sus características y condiciones en que fueron observadas. Cabe mencionar que las observaciones que se hicieron de ellos, fueron escasas, pues en general sus porcentajes fueron sumamente bajos.

El tipo 6G, es un tipo al que puede considerarse fagocítico, debido a que presenta gran cantidad de gránulos en su citoplasma. No es un tipo común, puesto que solo se observó en un ejemplar, con un porcentaje muy bajo (0.46%); El ejemplar en el cual se encontró presente, se caracterizó por tener gran cantidad de bacterias, factor que debe considerarse importante, pues fué el factor común que estuvo presente junto con estos tipos celulares, considerados como no predominantes.

En la bibliografía consultada, no se encontró ninguna referencia que pudiese ayudar a establecer, con precisión la función que desempeña este tipo y condiciones en que se presente.

El determinar la función específica que desempeñen estas células en la hemolinfa, solo logrará hacerse con un mayor número de observaciones y en condiciones controladas, para poder determinar cuando aparece este tipo celular.

El tipo 3A, está representado por células que fueron observadas únicamente en dos organismos estudiados, el porcentaje que presentaron fué alto (2.17%) con relación a otros tipos celulares que se presentaron en mayor número de organismos. Se hace notar que en las muestras tomadas, se observó una gran cantidad de bacterias, además los ejemplares fueron adquiridos en carros ambulantes de la zona, por lo que no puede precisarse el tiempo que hayan estado retirados de su habitat, ni el manejo que se hizo de ellos.

En la bibliografía disponible, no se encontró referencia alguna que pudiese ser comparada con estas células.

El citoplasma se observa con gran cantidad de filopodios sumamente delgados, lo cuál no permitió observar detalles estructurales de él, y no se pudo precisar la presencia de gránulos, por lo cuál se clasificó como agranulocito.

Se puede considerar como un tipo fagocítico, en base a la presencia de gran número de prolongaciones citoplásmicas que tiene, aunque no fue posible determinarlo debido a que no hubo observaciones en vivo que permitieran tener mayores bases.

Es posible que este tipo, se presente únicamente en determinadas condiciones, pero para poder conocerlas, es necesario diseñar mecanismos experimentales que permitan establecer cuales son estas condiciones.

Se supone que algún factor físico es el que induce su aparición, ya que la presencia de microorganismos, fué común a la mayoría de los ejemplares estudiados, y estas células solo se observaron en dos de ellos, que como ya se mencionó, se desconocía si hubo algún factor que pudiera haber provocado alteraciones fisiológicas, debido a que su procedencia y manejo no estuvo controlada.

El tipo 4A, está constituido por células que fueron observadas con un porcentaje muy bajo (0.37%) únicamente en dos organismos, uno de ellos con hemolinfa considerada como anormal, por presentar una coloración amarillenta y escasa actividad celular. No se consideró fagocítico, puesto que además de no observarse la presencia de gránulos, no hubo otras evidencias que así lo demostraran, pero podría pensarse en base a características morfológicas de su citoplasma, que pueda tratarse de alguna variedad morfológica del tipo clasificado como 2A, el cuál, sin haber sido posible determinar la presencia de gránulos, por otro tipo de evidencias, fué ampliamente determinado como fagocítico. Ambos tipos, presentan semejanzas morfológicas, sobre todo a nivel de citoplasma, ya que en ambos tiene un aspecto vesiculoso y es abundante; en el tipo 4A la relación núcleo-citoplasma, no es común a la observada en otros tipos, ya que el núcleo es bastante pequeño en relación con la cantidad de citoplasma, hecho que llevó a considerarlo como un tipo diferente, además de la coloración que presentó el núcleo.

Para poder determinar las condiciones en que se presenta este tipo celular, y la función que desempeña, es necesario, igual que en los casos anteriores, hacer mayor número de observaciones, en condiciones controladas.

En la bibliografía consultada, no se encontró ninguna referencia con la cual pudiera hacerse comparaciones. A reserva de verificar si su naturaleza es fagocítica o no, y si es una modificación del tipo 2A, se considerará como no fagocítico y tipo celular diferente.

El tipo 5A, se considera como no fagocítico, debido a que no presenta gránulos en el citoplasma, ni alguna otra evidencia para afirmar lo contrario. Es el tipo celular con el más bajo porcentaje (0.15%), únicamente se encontró en un organismo con la característica de contener gran cantidad de bacterias en su hemolinfa. En la bibliografía consultada, no se encontró ninguna referencia acerca de él.

Se desconoce la función que pudiera desempeñar ya que no hubo observaciones en vivo de este tipo, aunque debido a la ausencia de gránulos en su citoplasma, se sugiere que se trate de un tipo no fagocítico. Se considera que se deben realizar mayor número de observaciones y bajo condiciones controladas, para poder determinar la función que desempeña y condiciones en que se presenta.

Es evidente, al analizar los porcentajes relativos que presentan los tipos celulares de la hemolinfa de Tivela stultorum, que estos no son constantes, sino que varían notablemente, sobre todo en aquellos organismos que de alguna manera se notó alguna alteración en la hemolinfa, siendo preponderante la alta incidencia de microorganismos, como factor determinante en la variabilidad de los porcentajes; otro tipo de factores que pueden influir, son factores físicos del medio, y esto es mencionado por Foley & Cheng (1974).

Evidentemente, las células de la hemolinfa desempeñan un papel importantísimo, dentro de lo que se considera mecanismos de defensa, entre otras funciones, ya que dentro de la hemolinfa son ellas las que directamente reaccionan contra los diferentes impactos a los que se encuentra sometido el organismo, provocando respuestas de diverso tipo, como es la fagocitosis de material extraño; otro tipo de respuesta como serían inmunológicas, se desconoce si se presentan y de que magnitud, ya que los estudios sobre estos mecanismos en invertebrados son escasos, sin embargo, como todo organismo expuesto a constantes cambios ambientales y alteraciones por contaminantes, sugiere una capacidad de adaptación y defensa para sobrevivir en ese medio.

CONCLUSIONES

Se encontraron dos categorías celulares básicas, y dentro de ellas, varios tipos con características propias para considerarlos diferentes. Las categorías se clasificaron siguiendo el criterio de presencia o ausencia de gránulos citoplásmicos; y los tipos, de acuerdo al porcentaje global que tuvieron en los organismos estudiados.

Se considera que la presencia de algunos tipos (6G, 3A, 4A y 5A), es influenciada por factores que no fué posible su determinación.

Es evidente que, el estudio y clasificación de los tipos celulares presentes en la hemolinfa de Tivela stultorum, presenta bastante dificultad, sobre todo en su interpretación, ya que se encontró gran variedad morfológica, incluso dentro de un mismo tipo celular.

Este trabajo debe ser tomado como un estudio preliminar, que establece cuales son los tipos celulares más comunes en la hemolinfa de Tivela stultorum y su posible función; además se mencionan algunos tipos no comunes, que pueden tratarse de modificaciones morfológicas de algún tipo predominante, ó que se presenten bajo determinadas condiciones.

Se sugiere la función que realizan los diferentes tipos celulares en la hemolinfa, puesto que para definirla, se debe tener en cuenta que es indispensable el análisis bioquímico, citoquímico y ultraestructural en organismos controlados, para poder llegar a una conclusión con respecto a la función específica de cada tipo celular; esto proporciona a la vez un camino más para conocer factores inmunológicos que puedan ser utilizados por el hombre.

L I T E R A T U R A C I T A D A

- Akberali, B. H. 1980. Problems of haemolymph sampling in bivalve molluscs. Mar. Biol. Let., 1:161-166.
- Anónimo. 1979. Proyecto "Bivalvos de Baja California: Sección almeja pismo". Reporte UABC, 221 pp.
- Barnes, R. 1977. Zoología de los Invertebrados, 3a. ed., Edit. Interamericana, Mex., 681 pp.
- Barthelemy, E. R., J.R. Dawson y A. E. Lee. 1975. Técnicas para el laboratorio de Biología. CECSA, Mex., 148 pp.
- Bayne, B. L., J. Widdows & R. J. Thompson. 1976. Circulation. In Marine mussels: Their ecology and physiology, Cambridge Univ. Press, 207-212.
- Brehelin, M., D. Zachary & J. A. Hoffman. 1976. Fonctions des granulocytes typiques dans la cicatrisation chez l'orthoptère Locusta migratoria. J. Microsc. Biol. Cell., 25: 133-136.
- Casartelli, J.D. 1968. Microscopía teórico-práctica. Edit. Urmo, Barcelona., 132 pp.
- Cushing, J.E. y D.H. Campbell. 1960. Principios de Inmunología. Edit. Acribia, Zaragoza., 371 pp.
- Cheney, D.P. 1971. A summary of invertebrate leucocyte morphology; with emphasis on blood elements of the Manila clam, Tapes semidecussata. Biol. Bull., 140: 353-358.

- Cheng, T.C., H.K. Holland & J. T. Sullivan. 1982. Enhanced reduction of T4D and T7 coliphage titrers from Biomphalaria glabrata (Mollusca) haemolymph induced by previous homologous challenge. Biol. Bull., 164: 418-427.

- Fernández, A.H., O.V. Tapia y G.E. Uria. 1979. Manual para el curso de Histología Animal. IPN, Mex., 126 pp.

- Ferrer, C.L., y A.M. Gastelu. 1982. Estudio de repoblamiento de almeja pismo, Tivela stultorum (Mawe, 1823), Tes. prof. Esc. Sup. de Cienc. Mar., UABC, 142 pp.

- Fitch, J. E. 1950. The pismo clam. Cal. Fish Game, 36: 285-312.

- Flores, E.I. 1982. Estudio de los elementos formes presentes en la hemolinfa de Anadara (Anadara) tuberculosa. Sowerby, 1833. Tes. Prof. Esc. Nal. de Cienc. Biol., IPN., 149 pp.

- Foley, D.A. & T.C. Cheng. 1974. Morphology, hematologic parameter and behavior of hemolymph cells of quahog clam, Mercenaria mercenaria. Biol. Bull., 146: 343-356.

- Gaviño, T.G., C. L. Juárez y H. T. Figueroa. 1972. Técnicas selectas de laboratorio y campo. Edit. Limusa, Mex., 251 pp.

- George, W.C. & J. H. Ferguson. 1950. The blood of gastropod molluscs. J. Morphol., 86: 315-324.

- Hernández, S.A. 1979. Estudio morfológico "In vivo" de las células de la hemolinfa de Anadara (Anadara) tuberculosa. Sowerby 1833, Examen por áreas, Esc. Nal. de Cienc. Biol. IPN., 11 pp.

- Hernández, S.A. 1983. Estudio morfológico "In vivo" de las células de la hemolinfa de Anadara (Anadara) tuberculosa. Sowerby 1833, Tes. Prof. Esc. Nal. de Cienc. Biol., IPN., 58 pp.

- Hill, B.R. & J. H. Welsh. 1966. Blood Cells. In Physiology of Mollusca, Vol. II, Academic press N.Y., 162-167.

- Hillman, S.R., C. A. Finch, D. R. Boogs, A. Winkelstein y L. A. Harker. 1977. Manual de Hematología, Edit. El Manual Moderno, Mex., 317 pp.

- Holland, D. N., J. H. Phillips Jr. & A. C. Giese. 1965. An autoradiographic investigation of coelomocyte production in the purple sea urchin (Strongylocentrotus purpuratus). Biol. Bull., 128: 259-270.

- Humason, G. L. 1972. Animal tissue techniques, 4a. ed., W. H. Freeman, 661 pp.

- Keen, A. M. & E. Coan. 1974. Marine Molluscan Genera. of Western North America: An illustrated key, 2a. ed. Stanford Univ. press. 208 pp.

- Moore, A. C. & Eble. 1977. Cytochemical aspects of Mercenaria mercenaria hemocytes. Biol. Bull., 152: 105-119.

- Searcy, R. 1982. Evaluación preliminar sobre la pesquería de almeja pismo, Tivela stultorum (Mawe, 1823), Tes. Prof. Esc. Sup. de Cienc. Mar., UABC, 48 pp.