

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS



“ Cambios histológicos y bioquímicos asociados al ciclo de maduración de la almeja de sifón, *Panopea globosa* en San Felipe, B.C. México ”

T E S I S

**QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS
PARA OBTENER EL GRADO DE**

**MAESTRO EN CIENCIAS EN ECOLOGÍA MOLECULAR Y
BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA

Santiago José Sánchez León Hing

Ensenada, Baja California, Septiembre de 2012

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS



“ Cambios histológicos y bioquímicos asociados al ciclo de maduración de la almeja de sifón, *Panopea globosa* en San Felipe, B.C. México ”

T E S I S

**QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS
PARA OBTENER EL GRADO DE**

**MAESTRO EN CIENCIAS EN ECOLOGÍA MOLECULAR Y
BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA

Santiago José Sánchez León Hing

Ensenada, Baja California, 01 de septiembre de 2012

**FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS
POSGRADO EN ECOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA**

“Cambios histológicos y bioquímicos asociados al ciclo de maduración de la almeja de
sifón, *Panopea globosa* en San Felipe, B.C. México”

T E S I S

**QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS
PARA OBTENER EL GRADO DE**

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

SANTIAGO JOSÉ SÁNCHEZ LEÓN HING

Aprobada por:



Dr. Zaúl García Ezquivel

Director de tesis



Dra. Fabiola G. Arcos Ortega

Sinodal



Dr. Ivone Giffard Mena

Sinodal

RESUMEN

En el presente trabajo se realizó por primera vez la caracterización histológica, histoquímica y el perfil de diferentes componentes bioquímicos incluyendo el de la proteína tipo vitelogenina/vitelina de diversos tejidos de la almeja de sifón *Panopea globosa* obtenidas en San Felipe, B.C. México, a lo largo de un ciclo reproductivo. Los datos histológicos de la gónada tanto en hembras como en machos demuestran 5 estadios de maduración gonadal claramente evidenciados por las características presentes tanto a nivel de ovocitos como de espermatozoides. Dentro de los primeros estadios de maduración se encontró que tanto machos y hembras en previtelogénesis presentaron gametos en desarrollo primario y un alto contenido de tejido conectivo adipogranular. A medida que avanzó la maduración, estadios como vitelogénesis 1 y 2 presentaron gametos con un nivel más avanzado de maduración y una disminución de las reservas lipídicas. Finalmente en los estadios de posvitelogénesis y desovado ya se encontraron una gran parte de los organismos con pocas cantidades de gametos, acinos más pequeños y una recuperación en cuanto al tejido conectivo adipogranular. Los resultados encontrados mediante los métodos histoquímicos utilizados en el presente estudio proporcionaron una aproximación confiable de la utilización de lípidos y carbohidratos en los procesos de maduración gonadal. Fue evidente la utilización tanto de reservas lipídicas y de carbohidratos como fuentes de energía para los procesos reproductivos tanto en machos como en hembras de esta especie en donde los niveles más elevados de ambos componentes se pudieron observar en estadios tempranos de maduración para posteriormente ir disminuyendo su concentración en estadios más avanzados demostrando así el uso de estos recursos en dichos procesos. Se realizó un análisis bioquímico de proteínas, lípidos, carbohidratos y vitelina/vitelogenina tanto en gónada como en hemolinfa con el fin de establecer si alguna de estas macromoléculas

pueden ser utilizadas como posibles indicadores del grado de madurez de las hembras adultas. Los resultados demuestran que los niveles de vitelogenina y de carbohidratos en hemolinfa pueden ser un indicador del grado de madurez de las hembras adultas de la almeja *Panopea globosa*, lo anterior sustentado por las correlaciones positivas y significativas encontradas entre la concentración de vitelogenina en hemolinfa y el diámetro de ovocitos ($r=0.599$, $P<0.05$) y el área de ovocitos ($r= 0.470$; $P<0.05$); y por las correlaciones positivas y significativas entre las concentraciones de carbohidratos en hemolinfa y el diámetro de ovocitos ($r=0.689$; $P<0.05$) así como para el área de ovocitos ($r=0.544$; $P<0.05$). Y utilizando el método no invasivo de extracción de hemolinfa estandarizado en este trabajo, dichos niveles de componentes bioquímicos en la hemolinfa pueden ser utilizados como indicadores predictivos del grado de madurez de las hembras adultas de la almeja de sifón *Panopea globosa*.

Palabras clave: Almeja de sifón; vitelina/vitelogenina; componente bioquímicos.



Dr. Zaúl García Ezquivel

DEDICATORIA

A mis padres:

Santiago Francisco Sánchez García y María del Pilar León Hing Kujan

A mis hermanos:

Danny Xavier Sánchez León Hing y Eddy Francisco Sánchez León Hing

A mi futura esposa:

Ruth J. Valenzuela Gaxiola

AGRADECIMIENTOS

Primeramente quiero agradecerle a Dios por haberme dado la oportunidad y la capacidad de poder iniciar y de esta manera terminar con este proyecto de vida personal y profesional que empecé hace alrededor de 3 años y que está llegando a su culminación.

Quiero agradecerles a mis padres por haberme dado todo este apoyo tan importante para mi desarrollo profesional, por todo su esfuerzo por darme un mejor futuro y un desarrollo académico tan importante para mi vida. A mis hermanos por darme ánimos y fuerzas para seguir adelante y ser un ejemplo para mí. A mi futura esposa Ruth por haber estado conmigo en todo este proceso y por darme fuerzas para seguir adelante. Gracias a ustedes todo esto fue posible y se los dedico con mucho amor y cariño.

Quiero agradecer de manera muy cordial al Dr. Zaúl García Ezquivel, director del presente trabajo por su paciencia, su confianza y por haberme ayudado a salir adelante en este proceso aun en los momentos más difíciles, brindándome con toda su experiencia las herramientas para hacer todo esto posible.

Un agradecimiento lleno de gratitud a la Dra. Fabiola Arcos Ortega por formar parte de este proyecto, por su amistad, su total ayuda incondicional en todo este proceso, por brindarme su experiencia para poder sacar adelante este proyecto y por todo el apoyo que me brindó a lo largo del mismo que fue indispensable para llegar a la culminación de éste.

Quiero agradecer también a la Dra. Ivone Giffard Mena por formar parte del proyecto, por estar siempre pendiente de mi evolución como estudiante y como tesista, por su apoyo y aportaciones a este trabajo.

Agradezco a la Universidad Autónoma de Baja California y en especial a la Facultad de Ciencias Marinas y al Instituto de Investigaciones Oceanológicas por permitirme llegar hasta esta instancia, por su gran apoyo y por darme la oportunidad de formar parte de esta gran Institución durante muchos años. Un agradecimiento especial al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR) por brindarme su apoyo, facilidades, material y equipo necesario para la realización de mis análisis histológicos, histoquímicos y bioquímicos. Un agradecimiento muy especial a la M.C. Carmen Rodríguez-Jaramillo y a la T. María Eulalia Meza Chávez por ayudarme y prepararme para la realización de los cortes, tinciones y análisis histológicos e histoquímicos. Agradecer también a Roberto Hernández Herrera por toda la preparación, entrenamiento y apoyo para realizar mis análisis bioquímicos.

Agradecer también a la Sra. Consuelo Flores, permissionaria de Campo Nuñez por la donación de las almejas para realizar el presente trabajo. Un agradecimiento muy cordial a Conacyt por haberme dado la oportunidad de poder desarrollarme a nivel personal y profesional, por haber fomentado mi formación durante 2 años y haberme dado la posibilidad de tener una educación de excelencia.

Finalmente quiero agradecerle a toda mi familia en general, tíos/as, primos/as por haber estado conmigo directa o indirectamente pero haber formado parte de mi formación a lo largo de todo este tiempo. A mis amigos y compañeros por su amistad, respeto, cariño y buenos momentos. A todos MIL GRACIAS....

CONTENIDO

RESUMEN	II
DEDICATORIA	IV
AGRADECIMIENTOS.....	V
LISTA DE FIGURAS.....	VIII
LISTA DE TABLAS.....	X
ANTECEDENTES	3
JUSTIFICACIÓN	11
OBJETIVO GENERAL	11
OBJETIVOS PARTICULARES.....	12
HIPÓTESIS	12
METODOLOGÍA	12
MUESTREO MENSUAL DE ORGANISMOS EXPERIMENTALES	12
OBTENCIÓN DE MUESTRAS	13
<i>Extracción de Hemolinfa.</i>	13
<i>Obtención de tejido gonádico.</i>	14
CARACTERIZACIÓN HISTOLÓGICA E HISTOQUÍMICA DE LA GÓNADA DE HEMBRAS Y MACHOS.....	14
CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA HEMOLINFA Y DE LA GÓNADA DE HEMBRAS Y MACHOS	18
ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	20
DETERMINACIÓN DE UN INDICADOR BIOQUÍMICO DEL SEXO Y DEL GRADO DE MADUREZ DE HEMBRAS ..	21
RESULTADOS.....	22
TEMPERATURA.	22
VARIABLES MORFOMÉTRICAS.	23
PROPORCIÓN DE SEXOS.	24
CARACTERIZACIÓN HISTOLÓGICA E HISTOQUÍMICA DE LA GÓNADA DE HEMBRAS Y MACHOS.....	26
CONTENIDO BIOQUÍMICO EN HEMOLINFA Y GÓNADA.	36
VITELOGENINA	45
DISCUSIONES.....	52
EFECTO DE LA EXTRACCIÓN DE HEMOLINFA EN ORGANISMOS EXPERIMENTALES	52
EFECTO DE LA TEMPERATURA EN EL CICLO REPRODUCTIVO	52
CICLO DE GAMETOGÉNESIS	53
COMPONENTES BIOQUÍMICOS EN GÓNADA.....	55
MOVILIZACIÓN DE RESERVAS.....	58
INDICADORES DE MADUREZ Y SEXO EN BIVALVOS MARINOS.....	61
NIVELES DE VITELOGENINA/VITELINA EN HEMOLINFA Y TEJIDO GONÁDICO	63
CONCLUSIONES	65
LITERATURA CITADA	66
APENDICES	74
APENDICE I.....	74

<i>Estandarización de un método no invasivo de extracción de hemolinfa de la almeja Panopea globosa</i>	74
APENDICE II	75
<i>Deshidratación</i>	75
<i>Inclusión</i>	76
<i>Corte</i>	77
<i>Tinción</i>	77
APENDICE III	81
<i>Cuantificación de proteínas totales (PT) en hemolinfa</i>	81
<i>Cuantificación de lípidos totales (LT) en hemolinfa</i>	82
<i>Cuantificación de carbohidratos (CHOS) en hemolinfa</i>	82
<i>Cuantificación de proteínas totales en gónada</i>	83
<i>Cuantificación de lípidos totales en gónada</i>	83
<i>Cuantificación de carbohidratos en gónada</i>	83
APENDICE IV	84

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.- ZONA DE COLECCIÓN DE ORGANISMOS EXPERIMENTALES	13
FIGURA 2.- VARIACIONES PROMEDIO DE LA TEMPERATURA DEL AGUA DURANTE LOS MESES DE MUESTREO DE LA ALMEJA <i>PANOPEA GLOBOSA</i> , EN LA BAHÍA DE SAN FELIPE, BAJA CALIFORNIA, MÉXICO.....	23
FIGURA 3.- FRECUENCIA DE SEXOS ENCONTRADA PARA <i>PANOPEA GLOBOSA</i> EN LOS 4 MESES DE MUESTREO EN SAN FELIPE, BAJA CALIFORNIA, MÉXICO.....	25
FIGURA 4.- FRECUENCIA DE SEXOS DE LA ALMEJA <i>PANOPEA GLOBOSA</i> IDENTIFICADOS MEDIANTE EL ANÁLISIS HISTOLÓGICO PARA CADA UNO DE LOS MESES DE MUESTREO EN SAN FELIPE, BAJA CALIFORNIA, MÉXICO.....	26
FIGURA 5.- COMPARACIÓN DEL PESO TOTAL EN GRAMOS OBTENIDOS DE LOS ORGANISMOS DE CADA SEXO.....	26
FIGURA 6.- FRECUENCIA DE LOS ESTADIOS DE MADUREZ DE HEMBRAS DE <i>PANOPEA GLOBOSA</i> , MUESTREADAS EN SAN FELIPE, B.C. MÉXICO, DURANTE LOS MESES DE MUESTREO.....	29
FIGURA 7.- FRECUENCIA DE LOS ESTADIOS DE MADUREZ DE MACHOS DE <i>PANOPEA GLOBOSA</i> , MUESTREADAS EN SAN FELIPE, B.C. MÉXICO, DURANTE LOS MESES DE MUESTREO.....	30
FIGURA 8.- ESTADIOS DE DESARROLLO GONÁDICO DE ALMEJA DE SIFÓN <i>PANOPEA GLOBOSA</i>	33
FIGURA 9.- ESTADIOS DE DESARROLLO GONÁDICO DE MACHOS DE ALMEJA DE SIFÓN <i>PANOPEA GLOBOSA</i>	34
FIGURA 10.- NIVELES PROMEDIOS DE LAS PROTEÍNAS TOTALES EN HEMOLINFA DE HEMBRAS Y MACHOS DE LA ALMEJA <i>PANOPEA GLOBOSA</i>	37
FIGURA 11.- PROMEDIOS DE LAS CONCENTRACIONES DE LÍPIDOS TOTALES EN HEMOLINFA DE HEMBRAS Y MACHOS DE LA ALMEJA <i>PANOPEA GLOBOSA</i>	38
FIGURA 12.- PROMEDIOS DE LAS CONCENTRACIONES DE CARBOHIDRATOS TOTALES EN HEMOLINFA DE HEMBRAS Y MACHOS DE ALMEJA <i>PANOPEA GLOBOSA</i>	39
FIGURA 13.- PROMEDIOS DE LAS CONCENTRACIONES DE PROTEÍNAS TOTALES EN TEJIDO GONÁDICO DE HEMBRAS Y MACHOS DE LA ALMEJA <i>PANOPEA GLOBOSA</i> ,.....	40

FIGURA 14.- PROMEDIOS DE LAS CONCENTRACIONES DE LÍPIDOS TOTALES EN TEJIDO GONÁDICO DE HEMBRAS Y MACHOS DE ALMEJA <i>PANOPEA GLOBOSA</i>	41
FIGURA 15.- PROMEDIOS DE LAS CONCENTRACIONES DE CARBOHIDRATOS TOTALES EN TEJIDO GONÁDICO DE HEMBRAS Y MACHOS DE ALMEJA <i>PANOPEA GLOBOSA</i>	42
FIGURA 16.- CURVAS PARALELAS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA IDENTIDAD ANTIGÉNICA DE LAS PROTEÍNAS DE LOS TEJIDOS ANALIZADOS LA ALMEJA <i>PANOPEA GLOBOSA</i>	45
FIGURA 17.- CURVA ESTÁNDAR OBTENIDA DE DIFERENTES DILUCIONES DE VITELINA PURA.	48
FIGURA 18.- CONCENTRACIÓN DE VITELOGENINA EN HEMOLINFA PARA LOS DIFERENTES ESTADIOS DE DESARROLLO GONÁDICOS EN HEMBRAS DE LA ALMEJA DE SIFÓN <i>PANOPEA GLOBOSA</i>	49
FIGURA 19.- CONCENTRACIÓN DE VITELINA EN GÓNADA DURANTE LOS DIFERENTES ESTADIOS DE DESARROLLO EN HEMBRAS DE <i>PANOPEA GLOBOSA</i>	50

LISTA DE TABLAS

TABLA I.- ESTADIOS DE MADURACIÓN GONADAL REPORTADOS POR ARAGÓN-NORIEGA ET AL 2007, PARA HEMBRAS DE LA ALMEJA <i>PANOPEA GLOBOSA</i> , COLECTADAS EN SAN FELIPE, B.C., MÉXICO.	16
TABLA II.- SECUENCIAS DE ARNm Y PEPTIDICAS DE VITELINAS, REPORTADAS EN LA BASE DE DATOS LLAMADA “GENBANK”, PARA DIFERENTES ESPECIES DE BIVALVOS MARINOS.	19
TABLA III.- VARIABLES MORFOMÉTRICAS OBTENIDAS DE LOS ORGANISMOS MUESTREADOS EN LOS MESES DE ESTUDIO.	24
TABLA IV.-. DESCRIPCIÓN DE LAS FASES Y LOS ESTADIOS DE DESARROLLO GONÁDICO DE HEMBRAS DE LA ALMEJA DE SIFÓN <i>PANOPEA GLOBOSA</i>	27
TABLA V.- DESCRIPCIÓN DE LAS FASES Y LOS ESTADIOS DE DESARROLLO GONÁDICO DE MACHOS LA ALMEJA DE SIFÓN <i>PANOPEA GLOBOSA</i>	28
TABLA VI.- HISTOLOGÍA CUANTITATIVA DE TEJIDO GONÁDICO REALIZADA PARA LOS ESTADIOS DE MADUREZ GONÁDICA, ENCONTRADOS EN LOS MUESTREOS EN HEMBRAS DE <i>PANOPEA GLOBOSA</i>	36
TABLA VII.- CONCENTRACIONES PROMEDIO DE COMPONENTES BIOQUÍMICOS EN HEMBRAS Y MACHOS DE LA ALMEJA <i>PANOPEA GLOBOSA</i> PARA LOS DIFERENTES ESTADIOS GONÁDICOS	42
TABLA VIII.- CORRELACIONES DE PEARSON’S (R) ESTIMADAS PARA LOS COMPONENTES BIOQUÍMICOS OBTENIDOS EN LA HEMOLINFA Y GÓNADA DE HEMBRAS DE LA ALMEJA DE SIFÓN <i>PANOPEA GLOBOSA</i> Y LAS VARIABLES HISTOLÓGICAS CUANTITATIVAS RELACIONADAS CON EL GRADO DE MADUREZ GONÁDICA DE HEMBRAS.	51
TABLA IX.- RUTINA DE DESHIDRATACIÓN DEL PROCESAMIENTO HISTOLÓGICO.	75
TABLA X.- RUTINA DE INCLUSIÓN EN PARAFINA DEL PROCESAMIENTO HISTOLÓGICO.	76
TABLA XI.- RUTINA DE TINCIÓN HEMATOXILINA–EOSINA.	77
TABLA XII.- RUTINA DE TINCIÓN AZUL ALCIANO–PAS.	79
TABLA XIII.- RUTINA DE TINCIÓN SUDÁN NEGRO.	80

LISTA DE ABREVIATURAS

ARN_m: Acido ribonucleico mensajero

AT: Altura total

ATC: Ancho total de concha

Ch: carbohidratos

CHOS: Carbohidratos totales

CI: Índice de condición (Condition Index).

CIBNOR: Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste

CPG: Ganglio cerebral (Cerebral Pedal Ganglia)

Desov: Desovado

ELISA: Ensayo de inmunoabsorción enzimática (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay).

ES: error estándar

GCA: Área de cobertura gonadal (Gonadal coverage area)

H&E: Hematoxilina-Eosina

HUFA: Ácido grasos altamente insaturados (Highly unsaturated fatty acids)

IIO: Instituto de Investigaciones Oceanológicas

l: Lípidos

LT: Lípidos totales

LTC: Longitud total de concha

n: Núcleo

OD: Densidad óptica (Optic density)

Og: Ovogonias

Om: Ovocitos maduros

Opv: Ovocitos previtelogénicos

Or: Ovocitos residuales

PAS: Ácido periódico Schiff

Postvt: Postvitelogénesis

Presp: Preespermatoogénesis

Prevt: Previtelogénesis

PT: Proteínas totales

r: Coeficiente de correlación de Pearson

SN: Sudán negro

Sp1: Espermatogénesis 1

Sp2: Espermatogénesis 2

TSM: Temperatura superficial del mar

tc: Tejido conjuntivo

UABC: Universidad Autónoma de Baja California

Vt1: Vitelogénesis 1

Vt2: Vitelogénesis 2

Vt: Vitelina

Vtg: Vitelogenina

INTRODUCCIÓN

La almeja de sifón *Panopea globosa* fue reportada en aguas del Golfo de California en la Bahía de San Felipe y la Isla San Marcos a 60 metros de la playa por Keen hace 40 años (Keen, 1971). Debido a que no se encontraron ejemplares vivos, su identificación se basó en conchas vacías que fueron recolectadas por una embarcación pesquera (Hendrickx et al., 2005).

Las características morfológicas de *Panopea generosa*, una especie de la costa Pacífico de Baja California, son muy similares a las de *Panopea globosa*, por lo que suele confundirse fácilmente a estas dos especies. Sin embargo, hay una característica muy peculiar que las diferencia y es referente a una marca de inserción de los músculos sifonales retractores que se conoce como seno paleal. En *P. generosa* su impresión es prácticamente nula, es decir, no hay seno paleal, mientras que en *Panopea globosa* el seno paleal es amplio (Keen, 1971). Las almejas recolectadas en el interior del Golfo de California presentan un seno paleal amplio y son clasificadas como *Panopea globosa* (Arámbula-Pujol et al, 2006; Arámbula-Pujol et al, 2008).

En los últimos años, las dos especies de la almeja *Panopea* han tenido una demanda importante y un valor comercial considerable en el mercado nacional y sobretodo en el internacional, razón por la cual se ha generado en México un incremento en la explotación sustentable de los bancos naturales de estas especies. Los registros de pesca indican que las capturas anuales se encuentran alrededor de las 1,200 toneladas por año lo cual ha generado una ganancia económica de entre 28 a 30 millones de dólares (Anónimo, 2007; Calderón et al., 2010).

Estudios previos han demostrado que México es el único país en donde se han reportado la existencia de las dos especies de *Panopea*. Ambas presentan un crecimiento relativamente lento de 5 años para alcanzar la talla mínima comercial

(Goodwin, 1976; Goodwin y Pease, 1989). Estos organismos no presentan un dimorfismo sexual y sus órganos internos no se encuentran expuestos como la mayoría de los bivalvos, por lo que actualmente la única manera de identificar su sexo es mediante el sacrificio del organismo.

Debido a su lento crecimiento y a la alta densidad de captura en la pesca que se ha venido practicando desde el año 2000, la disponibilidad de esta almeja en los bancos naturales puede afectarse considerablemente y hasta la fecha no se cuenta con una alternativa adecuada para contrarrestar este impacto. Una de las soluciones más viables es la producción de semilla en el laboratorio con fines de acuicultura y repoblamiento por lo que resulta necesario conocer no solamente la tecnología de producción de larvas y semillas, sino también el efecto de factores exógenos sobre la fisiología de los organismos y los mecanismos endógenos asociados a la maduración y reproducción. En cuanto al ciclo reproductivo existen estudios previos reportados para la almeja *Panopea globosa* del Golfo de California (Aragón-Noriega et al., 2007; Calderón-Aguilera et al., 2010) y para la especie *P. generosa* de British Columbia, Canadá (Sloan y Robinson, 2010).

Con los esfuerzos del laboratorio de producción de moluscos bivalvos del Instituto de Investigaciones Oceanológicas se ha logrado madurar a individuos de *Panopea globosa* utilizando un régimen de temperatura y alimentación (García-Ezquivel et al., 2010), y solo recientemente se tiene documentado el esquema de maduración bajo sistemas controlados (García-Ezquivel et al., 2012).

Durante los últimos 3 años se ha producido larva y semilla de ambas especies de *Panopea* en los laboratorio del IIO-UABC a un nivel piloto comercial por lo que resulta importante establecer metodologías y lineamientos que permitan la identificación del sexo mediante métodos no invasivos, es decir, que no impliquen el sacrificio de

organismos y que permitan detectar el grado de madurez, para complementar los esfuerzos del cultivo controlado, así como también el seguimiento de ciclos reproductivos "in situ".

La presente investigación de tesis de Maestría se desarrolló con el fin de analizar la gametogénesis durante un ciclo reproductivo de la almeja sifón, *Panopea globosa* en San Felipe, B.C., México, con un enfoque integral mediante métodos histológicos, histoquímicos y bioquímicos. El punto central es analizar y determinar si existe un posible indicador bioquímico a nivel de hemolinfa del sexo y del grado de madurez de hembras de esta especie.

ANTECEDENTES

Los bivalvos llevan a cabo un ciclo reproductivo anual que incluye un período de gametogénesis seguido por eventos de desove que puede presentarse una sola vez de manera extendida o varias veces durante el ciclo, seguido por un período de restitución gonadal (Gosling, 2003). El ciclo incluye etapas de reposo en la actividad reproductiva, períodos vegetativos de diferenciación celular, de crecimiento citoplasmático, de puesta (liberación de los gametos al medio ambiente), de reabsorción de los restos de gametos que no se han liberado en la puesta y de vitelogénesis (maduración) (Gosling, 2003). *Panopea globosa* tiene un ciclo reproductivo muy corto de 3 a 5 meses y una fase extendida de descanso en donde las almejas no presentan características reproductivas (Calderón-Aguilera et al., 2010).

Panopea globosa sexualmente madura fue descrita en organismos con una talla promedio de 14-15 cm de longitud de la concha (Arámbula-Pujol et al, 2008; Aragón-Noriega et al., 2007). Mediante análisis histológicos gonadales estos autores observaron 5 fases de desarrollo gonádico. La fase 1 o de actividad temprana la gónada se prepara

para iniciar la gametogénesis. En la fase 2 o actividad tardía ya se empieza a observar la formación de los ovocitos, rodeados de células foliculares y lipídicas, los cuales son un indicador del desarrollo gametogénico de las hembras donde hay presencia de ovogonias y ovocitos primarios y en machos se observa la presencia de espermatozoides. En la fase 3 o maduro los ovocitos presentan una forma esférica, algunos de ellos libres dentro del lumen de los folículos alargados y existe una disminución en la abundancia del tejido lipídico, mientras que los espermátides y espermatozoides ocupan un menor volumen del folículo, los ductos de esperma se encuentran expandidos totalmente y se observa muy poco tejido lipídico (Arámbula-Pujol et al., 2008). La cuarta fase o parcialmente agotada los organismos se encuentran parcialmente desovados o totalmente desovados (Aragón–Noriega et al., 2007).

De acuerdo a Aragón-Noriega y colaboradores (2007) quienes realizaron un estudio anual de la almeja *Panopea* en el Golfo de California, a principios de febrero la mayoría de los organismos presentan el estadio agotado, en donde el 90% de estos se encuentran desovados en su totalidad y el 10% restante tienen reabsorbidos sus gametos y se encuentran indiferenciados en cuanto a su estadio. Los organismos colectados de marzo a mayo presentan reabsorbidos sus gametos por lo que no es posible establecer su diferenciación sexual. Durante el período comprendido entre los meses de abril a septiembre, la gónada se prepara para iniciar nuevamente el proceso reproductivo mostrando un alto contenido de células lipídicas.

El desarrollo gametogénico temprano ha sido observado a finales de verano cuando la temperatura superficial del mar (TSM) es alta ($\sim 30^{\circ}\text{C}$). El desarrollo se incrementa con la disminución de la temperatura por lo que a principios de invierno cuando la TSM es de $\sim 20^{\circ}\text{C}$ se han encontrado algunos organismos maduros. Los

desoves ocurren entre enero y febrero (invierno) cuando la TSM es la más baja (~18°C) (Aragón-Noriega et al., 2007).

Típicamente, las actividades reproductivas son cíclicas en moluscos bivalvos y siguen un patrón estacional que incluye: (1) Acumulación de nutrientes para ser usados en la gametogénesis, (2) proliferación de la gónada y diferenciación de gametos, (3) maduración de los gametos, (4) desove y (5) período de reposo. Adicionalmente algunos autores han demostrado que los cambios estacionales en la composición bioquímica de los moluscos dependen de factores ambientales tales como la temperatura y disponibilidad de alimento y factores como el tiempo del ciclo reproductivo y las tasa recuperación de la energía almacenada (Paz Osuna et al., 1993).

Se han estudiado los cambios estacionales de la composición bioquímica en algunas especies de moluscos bivalvos como es el caso de *Mytilus edulis*, *Crassostrea virginica* entre otros en relación a su ciclo reproductivo. De algún modo las concentraciones máximas de carbohidratos y de proteínas están relacionadas con la presencia de una mayor cantidad de individuos en fase de reposo o de postdesove.

Para el caso de las escalopas, la gametogénesis representa un período en donde particularmente existe una alta demanda de energía, tiempo durante el cual la transferencia de proteínas, lípidos y carbohidratos se produce a partir del músculo aductor y la glándula digestiva hacia la gónada. La energía es almacenada como lípidos, proteínas y glucógeno antes del comienzo de la gametogénesis, cuando el alimento es abundante, para posteriormente ser utilizado en la maduración de los gametos cuando la demanda de energía es alta. En *Argopecten irradians* se presume que la energía del metabolismo está basada inicialmente en lípidos pero está cambia a ser basada por carbohidratos una vez que la maduración de ovocitos empieza y para los períodos de desove es basada principalmente en proteínas (Ruiz -Verdugo et al., 2001).

Se conoce que en el ostión existe una relación entre la composición bioquímica proximal y el ciclo gametogénico. Por ejemplo, se ha establecido que la concentración de glucógeno en el ostión japonés *Crassostrea gigas* es mínima después del desove, alcanzando los valores máximos antes de la gametogénesis. La concentración de lípidos y proteínas siguen un patrón muy similar. En algunas poblaciones de ostión las proteínas son el motor para el desarrollo gametogénico pero se ha observado que debido a la pérdida neta de glucógeno durante el invierno se cataboliza lípidos para mantener los requerimientos durante períodos de poca disponibilidad de alimento (Parra et al., 2005).

La acumulación de lípidos en gónada durante la gametogénesis es un importante y documentado proceso que ocurre durante la maduración en moluscos (Gosling, 2003). El rol de los lípidos está principalmente relacionado al almacenamiento de energía en el huevo para el desarrollo embrionario y estadio larval temprano. La reducción de las concentraciones de lípidos puede ser consecuencia de algún tipo de mecanismos de retroalimentación entre el inicio de la vitelogénesis y los procesos metabólicos relacionados de síntesis y acumulación de reservas en gónadas formando ovocitos (Ruiz-Verdugo et al., 2001).

En el ostión japonés *Crassostrea gigas*, el contenido de proteínas de los ovarios demuestra un incremento sincrónico en relación al diámetro de ovocitos durante la maduración sexual. Las proteínas del ovario se acumulan como vitelina asociada a los lípidos, ya que la vitelina aislada ha sido identificada como una glucolipoproteína y el contenido de triglicéridos y fosfolípidos incrementa significativamente durante la ovogénesis. Las proteínas contenidas en la gónada en machos empieza a decrecer desde la formación de la esperma sugiriendo que las proteínas proveen una fuente de material y nutrientes para la espermatogénesis en ostión (Li et al., 2000).

En otros bivalvos tales como *Argopecten irradians concentricus*, *Argopecten purpuratus* y *Mytilus edulis*, se ha determinado que el contenido de glucógeno en ovarios y espermias decrece de manera importante durante la maduración (Li et al., 2000). Al respecto, se cree que este decremento del contenido de glucógeno en la gónada es producto de la escasez de glucógeno almacenado en el tejido conjuntivo vesicular, que depende de la glucogenólisis durante la gametogénesis. Aunque la principal fuente de energía para la maduración de los gametos es similar a la de otros bivalvos, la teoría supone que esto depende de la adaptación a varios ambientes (Li et al., 2000).

Una de las características de mayor importancia, durante la maduración de los ovocitos, es la acumulación de las proteínas las cuales constituyen la fuente más importante de nutrientes para el desarrollo de los ovocitos, así como también para el desarrollo embriológico de los organismos ovíparos (Serrano–Pinto et al., 2003). Una fase en la reproducción de los organismos es la vitelogénesis, la cual involucra la producción de proteínas de la yema (Tsukimura et al, 2000) que actúan como las fuentes más importantes de nutrientes para los embriones en desarrollo (Adiyodi, 1985). La vitelina (Vt), generalmente glucolipoproteína, es la forma común de yema almacenada en los ovocitos.

La vitelogenina (Vtg), es la molécula precursora de la Vt, y es transportada a través de la hemolinfa hacia los ovocitos en desarrollo, de manera que es secuestrada y modificada en Vt mediante la adición de polisacáridos y lípidos (Tsukimura et al, 2000; Chen et al, 2004).

Vitelogenina es el nombre genérico de un grupo de proteínas que son sintetizadas extraováricamente se puede encontrar proteínas similares en todos los animales que den origen a huevos con yema. Gracias a su alta concentración en el huevo

y la relativa facilidad con la que puede ser purificada, estas proteínas son excelente material para el estudio de la regulación de su síntesis desde un punto de vista molecular, de desarrollo y fisiológico (Hagedorn y Kunkel, 1979).

En términos generales la vitelogenina es un complejo glucolipofosfoprotéico que se une al calcio y al hierro, y es precursora de las proteínas del vitelo. En fases avanzadas de la vitelogénesis los ovocitos contienen Vtg, así como pequeños productos derivados de la degradación de la Vtg, tales como la fosfovitelina, lipovitelina y glucovitelina, y una o dos moléculas proteicas más pequeñas (Sarasquete et al., 2002).

Osada et al. (2003) describieron la síntesis de la Vtg en el ovario de la escalopa *Patinopecten yessoensis* producida por la administración de la hormona 17β -estradiol y un factor promotor de la vitelogénesis (VPF) estableciendo que existe una correlación entre ambos componentes y el incremento de Vt en ovarios. La inyección de 17β -estradiol en el ovario de los organismos demostró un incremento significativo en los niveles de Vt en el tejido ovárico, los cuales empezaron con un contenido inicial de 3.9 mg/g de tejido ovárico y terminaron a los 90 días con un contenido final de 8.0 mg/g. Estos resultados sugieren que es posible que factores estrogénicos contribuyan al desarrollo de gametos en la escalopa, que el 17β -estradiol promueva el incremento de la Vt, que la Vt se sintetiza en el interior del ovario y que el 17β -estradiol puede ser un factor principal en el proceso de vitelogénesis.

En otro estudio realizado por Matsumoto et al. (2003) se demostró que muestras cultivadas de Vtg en ovarios con el homogenizado del ganglio cerebral (CPG) mostraron contenidos más altos de Vtg que las muestras administradas con 17β -estradiol y que las muestras combinadas con CPG. Aparentemente el CPG parece estar altamente relacionado con la función de 17β -estradiol y la producción de Vtg.

La vitelina y/o vitelogenina pueden ser detectadas y cuantificadas mediante el uso de un ensayo de inmunoabsorción (ELISA) (Jeremy, 2008). Los anticuerpos se pueden usar como reactivos específicos para la determinación de la cantidad de dichas proteínas. En este método, se utiliza una enzima que reacciona con un sustrato que produce un producto coloreado. La enzima se une covalentemente a un anticuerpo específico que reconoce al antígeno. Si el antígeno está presente, el complejo enzima-anticuerpo se unirá a él, y el componente enzimático del complejo catalizará la reacción que generará un producto coloreado. Así la presencia del producto coloreado indica la presencia del antígeno. Este tipo de ensayo es un método rápido e idóneo para poder detectar una proteína y permite detectar cantidades menores de 1 ng (10^{-9} g) de proteína. El ensayo ELISA puede ser efectuado con anticuerpos monoclonales y/o policlonales, pero el uso de anticuerpos monoclonales generalmente originan resultados más confiables.

Se han realizado diversos estudios en cuanto a la expresión, detección y funcionamiento del proceso de vitelogénesis en invertebrados, específicamente enfatizando las características y funciones de la vitelogenina. Para lograrlo, se han utilizado diferentes técnicas bioquímicas y moleculares que han permitido obtener datos importantes de esta proteína y facilitado su análisis.

En la escalopa *Patinopecten yessoensis* se realizó la identificación inmunológica del sitio de síntesis de la Vtg mediante el uso de un anticuerpo anti-escalopa para Vt (Osada et al., 2003). Este estudio sugiere que la síntesis de la Vtg ocurre en el interior del ovario, especialmente en las células auxiliares (células somáticas presentes en los acinos gonádicos) asociadas al crecimiento de los ovocitos y es regulado por la hormona 17β – estradiol y un factor promotor vitelogenico (VPF) asociado al ganglio cerebral mediante un receptor estrogénico en los ovocitos.

Mediante este tipo de estudios inmunológicos se ha determinado que la vitelogenesis es un proceso necesario para la maduración de los ovocitos, el cual ha sido ampliamente documentado en peces, insectos, bivalvos y algunos invertebrados (Sumpter y Susan, 1995) y se ha determinado que la Vtg es una proteína específica presente de manera abundante en las hembras que puede ser usada de manera indirecta para poder llegar a determinar el sexo de los organismos en estado de madurez. Investigaciones en laboratorio y estudios de impacto ambiental han dado evidencias de que algunos plaguicidas organoclorados son capaces de causar disrupción endocrina (feminización) y alteraciones reproductivas que implican que los machos incrementan estrógenos y producen vitelogeninas (Zapata, 2006)

En un estudio reciente realizado por Arcos et al. (2009), se cuantificó las proteínas de la Vt/Vtg en el ostión de placer *Crassostrea corteziensis* (Hertlein, 1951) con el propósito de ser usado como una herramienta cuantitativa para predecir el grado de madurez de las hembras. En este estudio las características histológicas y los niveles de las proteínas Vt/Vtg de los ovarios fueron analizados durante diferentes estadios de maduración gonadal usando técnicas histológicas cuantitativas e inmunológicas.

En el Instituto de Investigaciones Oceanológicas en la UABC se ha desarrollado un protocolo de maduración y producción a nivel laboratorio de la almeja *Panopea* con resultados exitosos (García-Ezquivel et al., 2012), pero aún es necesario disponer de un indicador del grado de madurez y el sexo de las almejas. Esto debido a que los organismos de este género no presentan dimorfismo sexual, y el manto muscular se extiende entre ambas conchas haciendo imposible la observación directa de las gónadas o de los órganos internos.

JUSTIFICACIÓN

Las capturas realizadas en las costas del Golfo de California y el Pacífico de las especies de *Panopea* estimadas para el 2002 fueron de 49 toneladas. Para el período del 2006 al 2008, cosechas combinadas de ambas costas fue de más de 1200 toneladas por año, representando un ingreso total anual de más de 18 millones de dólares (Calderón-Aguilera et al., 2010). Sin embargo existe poco conocimiento sobre los procesos reproductivos de este recurso económicamente importante. Esto incluye la identificación del sexo por métodos que no impliquen el sacrificio de los organismos, y métodos indirectos para detectar el grado de madurez. El desarrollo de un método de este tipo (indirecto “no invasivo”) para detectar el sexo y grado de madurez de la especie permitirá complementar los esfuerzos de cultivo controlado y poder dar seguimiento a los ciclos reproductivos “*in situ*”.

Para poder desarrollar lo anterior, es importante conocer la morfología de la gónada y los cambios en su composición bioquímica, así como de la hemolinfa, que está involucrada en los procesos reproductivos de esta especie a lo largo de su ciclo de maduración.

OBJETIVO GENERAL

Cuantificar las variaciones histológicas, histoquímicas y bioquímicas de la almeja sifón, *Panopea globosa* y establecer su relación con el grado de madurez y/o sexo de los organismos.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Realizar la caracterización histológica e histoquímica de la gónada de hembras y machos de la almeja sifón *Panopea globosa* durante la gametogénesis en un ciclo reproductivo.
2. Realizar la caracterización bioquímica de la hemolinfa y de la gónada de hembras y machos de la almeja sifón *Panopea globosa*, durante la gametogénesis en un ciclo reproductivo.
3. Establecer si la Vtg o alguno de los componentes bioquímicos puede ser usado como posible indicador bioquímico del grado de madurez y/o del sexo de la almeja de sifón *Panopea globosa*.

HIPÓTESIS

Si los cambios en los niveles de compuestos energéticos mayores (proteínas, lípidos, carbohidratos) y/o la vitelogenina están asociados con el grado de madurez de la almeja de sifón, *Panopea globosa*, entonces estos pueden servir como indicadores del sexo y su grado de madurez.

METODOLOGÍA

Muestreo mensual de organismos experimentales

Para realizar este estudio se obtuvieron de octubre de 2010 a enero 2011 organismos silvestres de la almeja *Panopea globosa* del Campo Núñez, ubicado en Baja California, México. En cada mes de muestreo se analizaron treinta almejas, las cuales fueron etiquetadas y se registraron las siguientes variables morfométricas: longitud total de la concha (LTC), altura total (AT), ancho total de la concha (ATC) y peso total en

gramos (PT). Los organismos experimentales fueron estabilizados durante un período de 24 horas en el Laboratorio de Biotecnología de Moluscos del Instituto de Investigaciones Oceanológicas, en tanques de 1200 litros con agua de mar filtrada a una temperatura constante de 24°C. De los 30 organismos muestreados en cada mes se realizó la extracción de hemolinfa y posteriormente se obtuvo muestra de tejido gonádico como se describe a continuación.

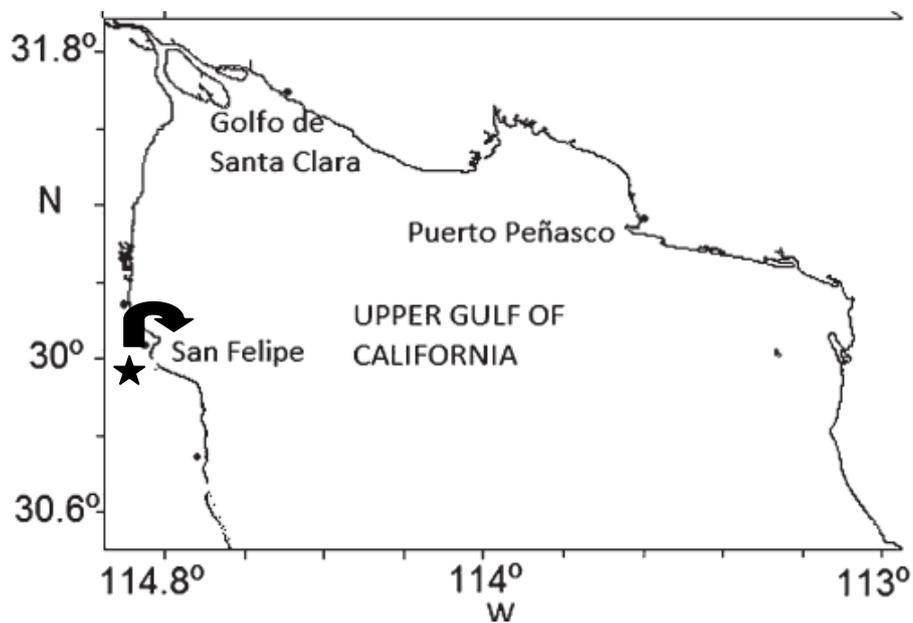


Figura 1.- Zona de colección de organismos experimentales (Calderón et al, 2010)

Obtención de muestras

Extracción de Hemolinfa.

La obtención de hemolinfa de cada almeja se realizó con un método no invasivo de extracción de hemolinfa (ver Apéndice I). De esta forma se tomó un volumen de 300 μ L de hemolinfa directamente de la cavidad pericardial de cada organismo con una jeringa para insulina de 1 ml previamente humedecida con una solución anticoagulante de oxalato de sodio al 5%. Cada muestra fue transferida a tubos eppendorf de 1.5 mL y se centrifugaron a 3600 rpm a 4°C por 10 minutos. Se colectó el sobrenadante y las

muestras fueron almacenadas a -80°C hasta su envío al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR) en la Paz, B.C.S., México, en donde se realizaron los análisis bioquímicos.

Obtención de tejido gonádico.

Se obtuvieron muestras de gónada de aproximadamente 2 cm, de 60 almejas de *Panopea globosa* (15 por cada fecha de muestreo) con una navaja de micrótopo. Cada muestra fue colocada en casetes para el análisis histológico con su etiqueta correspondiente, posteriormente se embebieron en solución Davidson en un recipiente de vidrio de 250 mL y se almacenaron a temperatura ambiente por 24 horas dónde se conservaron hasta ser procesadas. Otras dos porciones de gónada fueron colocadas en tubos eppendorf de 1.5 mL vacíos, limpios, esterilizados y en fresco para los análisis bioquímicos y para la cuantificación de vitelina. Los tubos fueron almacenados a -80°C y posteriormente enviados con hielo seco al CIBNOR para su análisis. Las muestras procesadas en alcohol se transportaron también, pero a temperatura ambiente.

Caracterización histológica e histoquímica de la gónada de hembras y machos

Con el fin de cumplir el objetivo particular 1, se analizaron las porciones de gónadas embebidas en solución Davidson de los 60 organismos de *Panopea globosa*, las cuales se procesaron mediante técnicas histológicas e histoquímicas ya establecidas en el laboratorio de Histología del CIBNOR, las cuales de manera general consisten en:

Realizar el proceso de deshidratación de cada muestra con una serie de alcoholes de menor a mayor concentración, después de este proceso realizar el proceso de inclusión en parafina de cada muestra y al terminar realizar cortes de cada muestra en el micrótopo automático (Leica RM 2155), con un grosor de 4 micras. Cada uno de los cortes se extendió en un baño de teflón con agua destilada a 40°C en parafina y a

temperatura ambiente en resina (marca Lab-Line 26103). Dichos cortes se tiñeron y se montaron en portaobjetos para su análisis al microscopio.

Las tinciones que se realizaron fueron:

Hematoxilina–Eosina para observar estructuras celulares y determinar el sexo y el estadio de madurez gonádica (Humanson, 1977), Azul Alciano PAS (Sheehan Hrapchak, 1980) para la identificación de carbohidratos y Sudán Negro (Bayliss, 1984) para la identificación de lípidos (protocolo detallados en Apéndice II).

Las laminillas obtenidas de los análisis histológicos e histoquímicos de cada muestra, fueron observadas y las imágenes capturadas en un sistema de análisis de imágenes ImagePro Plus versión 6.0, en un microscopio de fluorescencia Olympus BX41.

Las imágenes de gónada de machos fueron capturadas con un objetivo de 4X y las de hembras con un objetivo de 20X. En el caso de las hembras, el conteo y medición de cada tipo de ovocitos se realizó con el software SigmaScan Pro, versión 5.0.

La identificación de los estadios de desarrollo gonadal para machos y hembras se realizó en base a la clasificación propuesta por Aragón-Noriega et al. (2007), considerando los siguientes estadios de desarrollo gonádico de las hembras: 1) Previtelogénesis; 2) Vitelogénesis primaria; 3) Vitelogénesis secundaria; 4) Desove y 5) Postvitelogénesis (Tabla I).

Tabla 1.- Estadios de maduración gonadal reportados por Aragón-Noriega et al 2007, para hembras de la almeja *Panopea globosa*, colectadas en San Felipe, B.C., México.

FASE	ESTADIO	DESCRIPCIÓN	DIAMETRO
1.-Actividad Temprana	<i>En desarrollo</i>	La gónada se prepara para el inicio de la gametogénesis	S/D
2.-Actividad Tardía	<i>Previtelogénesis</i>	Formación de ovocitos rodeados de células foliculares y lipídicas	25.5 ± 2.09
3.- Madurez	<i>Vitelogénesis Primaria</i>	Formación de ovocitos, presencia de ovogonias y ovocitos primarios	51.9 ± 0.82
	<i>Vitelogénesis Secundaria</i>	Ovocitos de forma esférica, en estado libre dentro del lumen y disminución de gotas lipídicas	$70. \pm 15.26$
4.- Desove	<i>Desovado</i>	Porcentaje de organismos parcialmente desovados y algunos totalmente desovados, aumento de tejido lipídico, acinos vacíos.	22.8 ± 7.02
5.-Post-Desove	<i>Post-vitelogénesis</i>	Organismos desovados en su totalidad, reabsorción de gametos	

Después de identificar el estadio de desarrollo gonádico de cada hembra se realizó un análisis cuantitativo de los cortes histológicos teñidos con Hematoxilina–Eosina y se obtuvieron las siguientes medidas de los ovocitos: Área y diámetro. Y se calculó el

diámetro teórico (μm) de los ovocitos mediante la fórmula de la circunferencia propuesta por Saout et al. (1999):

$$D_T = \sqrt{4A/\pi}$$

donde,

D_T = diámetro teórico

A = área

π = 3.1416

Los cortes de tejido gonádico obtenidos mediante las tinciones histoquímicas (Azul Alciano PAS y Sudán negro) se capturaron con un objetivo de 20X tanto en machos como hembras. La cuantificación se realizó con el software ImagePro Plus versión 6.0.

En el caso de las tinciones con Sudán Negro el programa identificó los tonos oscuros y negros cuantificando mediante la suma de píxeles, el área ocupada por estos tonos de color, correspondientes a los triglicéridos. Para el caso de las tinciones con reactivo Schiff, el programa identificó tonalidades de azul cuantificando mediante la suma de píxeles, el área de cobertura que ocuparon estas tonalidades de color correspondientes a la presencia de mucopolisacáridos ácidos, neutro y sustancias cartilaginosas presentes en tejido gonádico, para obtener el porcentaje de cada uno de los componentes histoquímicos.

Todas las mediciones realizadas tanto para lípidos, carbohidratos y proteínas, se registraron en una hoja de cálculo en Excel.

Los datos fueron calculados a partir de mediciones que se realizaron en 5 campos por corte de un área determinada dada en μm^2 .

Caracterización bioquímica de la hemolinfa y de la gónada de hembras y machos

Con el fin de cumplir con el segundo objetivo particular, se descongelaron las 120 muestras de hemolinfa y las 60 muestras de tejido gonadal para cuantificar los siguientes componentes bioquímicos: proteínas totales (PT) mediante el método de BCA (Sigma-Aldrich), lípidos totales (LT) mediante el método de sulfosfosvainillina (Barnes and Blackstock, 1973) y carbohidratos totales (CHOS) mediante el método de Antrona (Roe, 1955). (Apéndice III).

Para el caso del tejido gonádico, las 60 muestras de tejido gonadal fueron homogenizadas en un liofilizador Lyo-Centre Virtis por un período de 24 horas aproximadamente. Una vez terminado el proceso, se pesó la muestra seca y se colocó 0.1 g tubos limpios previamente etiquetados. Posteriormente las muestras se hidrataron con 10% de agua destilada y se colocó unas esferas de cerámica en los tubos con un poco de arena con el fin de mejorar el proceso de homogenización y se colocaron en un homogenizador de tejidos FAST PREP-24 por 1 minuto. Se eliminó la arena y posteriormente se realizaron las cuantificaciones de los componentes bioquímicos antes mencionados.

Para poder cuantificar la cantidad de vitelogenina/vitelina en hemolinfa y en tejido gonadal respectivamente de la almeja *Panopea globosa*, primero se realizó un alineamiento de los ARN mensajeros (ARNm) que codifican para la vitelina y se hizo una comparación de las secuencias peptídicas de vitelina reportadas en la base de datos llamada Genbank, para algunas especies de bivalvos marinos (Tabla II). Se compararon las secuencias peptídicas con el fin de evaluar la factibilidad de uso de un anticuerpo policlonal anti-vitelina desarrollado para el ostión *Crassostrea corteziensis* generado por Arcos et al., 2009.

Una vez que se corroboró una alta similitud entre las secuencias y la posibilidad de utilizar los anticuerpos policlonales existentes, la cuantificación de la vitelogenina y vitelina se realizó mediante un ensayo tipo ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) indirecto o no competitivo, (estandarizado por Vázquez–Boucard et al., 2002 y Arcos et al., 2009) (Apéndice IV).

Tabla II.- Secuencias de ARNm y peptídicas de vitelinas, reportadas en la base de datos llamada “Genbank”, para diferentes especies de bivalvos marinos.

ESPECIE	ADNc	SECUENCIA DE ARNm (ID Genbank)	SECUENCIA PEPTIDICA (ID Genbank)	REFERENCIA
<i>Mytilus edulis</i>	P(713bp)	AY679116.1	AAT72932.1	Puinea y Rotchell, 2006
<i>Crassostrea gigas</i>	C(5023bp)	AB084783.1	BAC22716.1	Matsumoto et al., 2002
<i>Pecten Maximus</i>	P(1290bp)	AM943022.1	CAQ06469.1	Mauriz et al., 2008
<i>Chlamys farreri</i>	C(7604bp)	GQ227743.1	ADE05540.1	Qin et al., 2009
<i>Mizuhopecten yessoensis</i>	P(1698bp)	AB055960.1	BAB63260.1	Osada et al., 2004

C= Secuencia completa

P= Secuencia parcial

Análisis estadísticos

Se utilizó la prueba Kolmogorov-Smirnov para corroborar la normalidad de todas las mediciones histológicas, histoquímicas y bioquímicas realizadas. En el caso de los datos que no presentaron normalidad se realizaron transformaciones para normalizarlos, empleando el \log_{10} y para el caso de los datos expresados en porcentajes el arcoseno (Zar, 1999):

$$p' = \arcsin\sqrt{p}$$

donde:

p' = medida transformada (en radianes)

\arcsin = coseno del ángulo deseado cuyo valor debe estar entre 1 y -1

p = medida original

Con los datos normalizados se realizaron los siguientes análisis:

Un análisis de varianza de una vía (ANOVA) para cada uno de los siguientes factores: tiempo (meses de muestreo), sexo (machos y hembras) y estadio de madurez gonadal, en donde las variables dependientes fueron:

a) Las concentraciones de los diferentes componentes bioquímicos obtenidos en hemolinfa y tejido gonádico: Proteínas totales, lípidos totales, carbohidratos y vitelogenina/vitelina)

b) Las medidas obtenidas de los ovocitos (área y diámetro teórico) y las cuantificaciones histoquímicas de lípidos y carbohidratos realizadas en tejido gonádico.

Un análisis de varianza de dos vías, donde los factores de prueba considerados fueron el tiempo (mes de muestreo) y el sexo, y las variables dependientes fueron las consideradas en el análisis de varianza de una vía (incisos a y b).

El nivel de significancia considerado fue del 95% a una $P < 0.05$. En los casos donde se encontraron diferencias significativas se realizó un análisis “a posteriori” de comparación múltiple de promedios, usando la prueba de Tukey-Kramer (Zar, 1999).

Todos los análisis se realizaron mediante los programas de cómputo Statistica (versión 10) usando la sección GLM (General Lineal Model) y el programa SigmaSTAT (versión 3.5)

Determinación de un indicador bioquímico del sexo y del grado de madurez de hembras

Con el fin de lograr el tercer objetivo particular, se realizaron análisis de correlación lineal simple de Pearson (r , Snedecor y Cochran, 1989) entre las siguientes variables:

- a) Componentes bioquímicos de la hemolinfa (proteínas totales, lípidos totales, carbohidratos y vitelogenina) de las hembras y aquellas variables asociadas con el grado de madurez gonádica: el diámetro y área de los ovocitos.
- b) Componentes bioquímicos analizados en la gónada (proteínas totales, lípidos totales, carbohidratos y vitelogenina) de las hembras y aquellas variables asociadas con el grado de madurez gonádica: diámetro y área de los ovocitos.

Un valor de $P < 0.05$ fue considerado como estadísticamente significativo.

Todos los análisis estadísticos se realizaron con el software STATISTICA versión 10.0, usando la sección GLM (General Lineal Model).

RESULTADOS

Extracción de hemolinfa

El método de extracción de la hemolinfa utilizado en el presente estudio no afectó significativamente a los organismos experimentales, pues estos mantuvieron inalterados su consumo de alimento (APENDICE I) y no sufrieron mortalidad alguna, aún al coleccionar hasta 500 µl de hemolinfa. Estos mismos organismos fueron capaces de producir gónadas maduras y gametos viables. Este método estandarizado puede ser utilizado en el futuro como una forma no invasiva (que no causa daño ni muerte de los organismos) de extracción de hemolinfa para evaluar el estado fisiológico de los organismos (APENDICE I).

Temperatura.

En la figura 2 se muestran las temperaturas del agua que se presentaron en la Bahía de San Felipe, Baja California, México, durante el periodo de muestreo. Durante los primeros días del mes de noviembre la temperatura alcanzó valores de 22°C y a finales de este mes empezó a decrecer gradualmente hasta llegar a los 19°C. Durante todo el mes de diciembre la temperatura del agua se mantuvo fluctuando entre los 18.5 a 19 °C y hasta la última semana de este mes empezó a decrecer hasta los 17.5 °C. En el mes de enero se presentaron las temperaturas más bajas, al inicio del mes fluctuaron alrededor de los 16°C y durante el transcurso del mes disminuyeron hasta alcanzar los 15.5 °C.

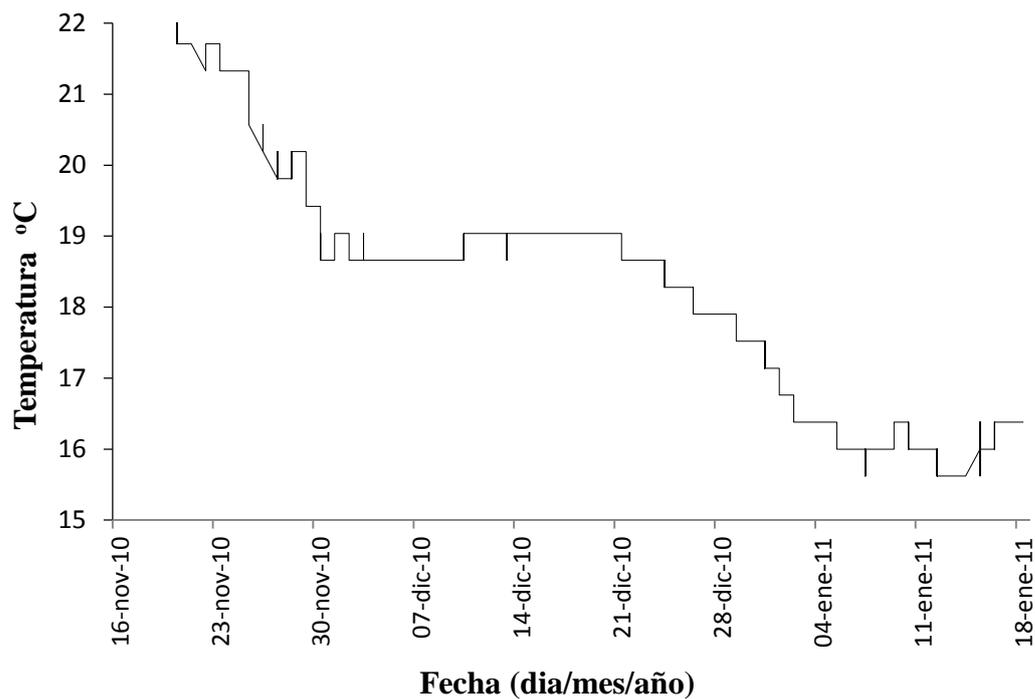


Figura 2.- Variaciones promedio por día de la temperatura del agua durante los meses de muestreo de la almeja *Panopea globosa*, en la Bahía de San Felipe, Baja California, México.

Variables morfológicas.

Las biometrías realizadas para los 120 organismos de cada uno de los muestreos se presentan en la Tabla III. Los valores promedio de los 120 organismos se encontraron en el rango de los 15-17 centímetros de longitud total de la concha (LTC), 7 centímetros de ancho de la concha (ATC), y 11-12 centímetros de altura de la concha (AT).

En relación al peso total se obtuvieron organismos con valores de 865-870 gramos para el mes de octubre y posteriormente se presentó un incremento en el peso de los organismos para los meses subsecuentes con valores promedio entre los 1100-1200 gramos.

Tabla III.- Variables morfométricas obtenidas de los organismos muestreados en los meses de estudio. Se analizaron 30 organismos en cada mes. Peso total, LTC= longitud total de la concha, ATC= ancho total de la concha, AT= altura de la concha. Media \pm error estándar.

Variables morfométricas	MESES DE MUESTREO				ANOVA
	Octubre	Noviembre	Diciembre	Enero	P-valores
Peso total (gramos)	868.0 \pm 3.3 ^a	1115 \pm 6.5 ^b	1179 \pm 4.4 ^c	1213 \pm 4.8 ^d	<0.01
(LTC, cm)	15.0 \pm 0.03 ^a	15 \pm 0.07 ^a	15 \pm 0.02 ^a	17 \pm 0 ^b	<0.01
(ATC,cm)	11.0 \pm 0.03 ^a	12 \pm 0.04 ^b	11 ^a	11 \pm 0.02 ^a	0.01
(AT, cm)	7.0 \pm 0.02	7.0 \pm 0.03	7	7	0.38

Proporción de sexos.

Al identificar el sexo de cada organismo mediante los análisis histológicos se encontró una mayor frecuencia de machos (63.66%) con respecto a las hembras (36.67%), traduciéndose en una proporción macho:hembra de 1.72:1 (Figura 3). En el caso particular del presente estudio solo se utilizaron 15 organismos para cada mes en el análisis histológico del tejido gonádico por lo que no fue posible identificar el sexo de los 120 organismos muestreados.

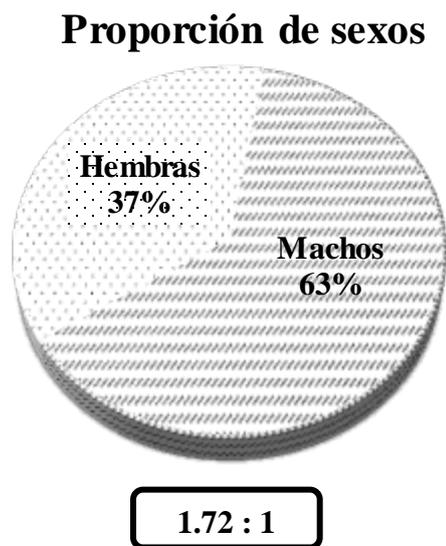


Figura 3.- Frecuencia de sexos encontrada para *Panopea globosa* en los 4 meses de muestreo en San Felipe, Baja California, México.

Quando analizamos la proporción de hembras y machos de cada mes de muestreo se observó una mayor cantidad de machos para los meses de octubre, diciembre y enero, mientras que para el mes de noviembre se encontró una mayor proporción de hembras (Figura 4). No se observó individuos en proceso de cambio de sexo (protandrisma).

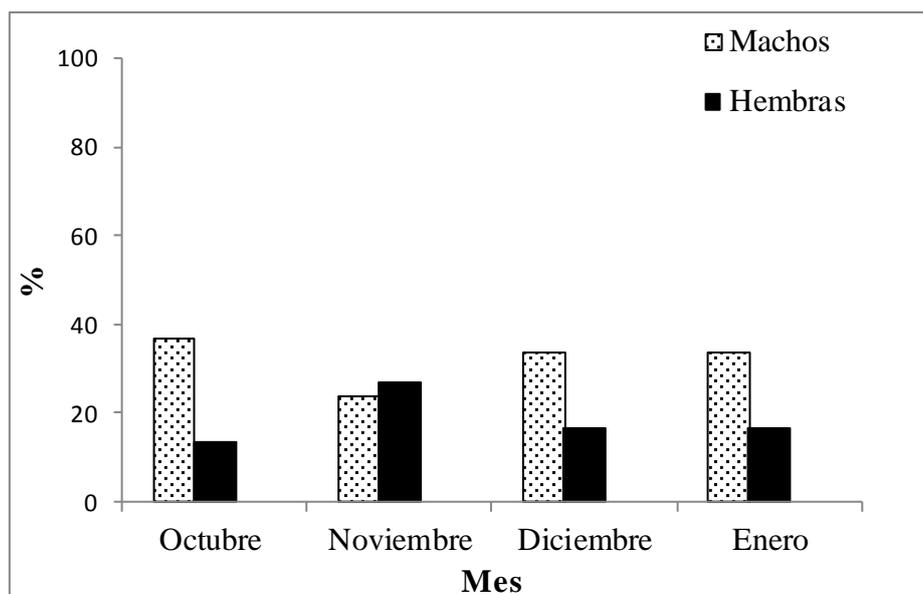


Figura 4.- Frecuencia de sexos de la almeja *Panopea globosa* identificados mediante el análisis histológico para cada uno de los meses de muestreo en San Felipe, Baja California, México. El número total de individuos analizados en cada mes fue de 15.

Estableciendo un análisis comparativo en función del sexo entre las variables morfométricas evaluadas para el total de los organismos analizados histológicamente, se observó que no existe una diferencia importante en cuanto a los valores de AT ni ATC. Sin embargo, para el caso de las hembras se obtuvieron valores significativamente más altos ($P < 0.05$) de peso total en relación a los machos (Figura 5).

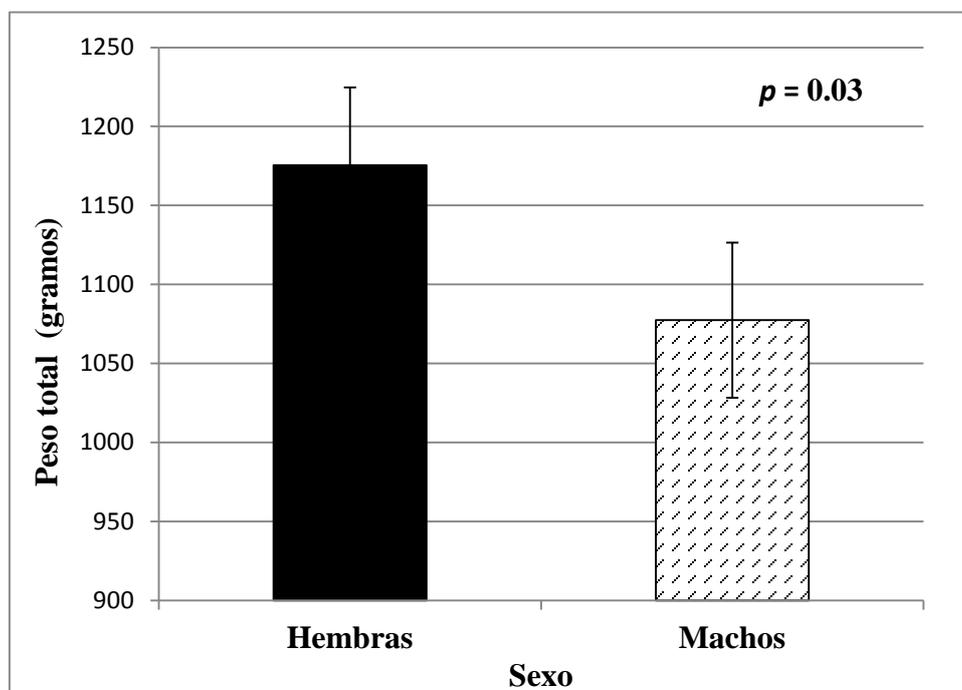


Figura 5.- Comparación del peso total en gramos obtenidos de los organismos de cada sexo.

Caracterización histológica e histoquímica de la gónada de hembras y machos.

Los análisis histológicos realizados en las muestras de gónada de hembras y machos permitieron corroborar la existencia de 5 estadios de madurez gonadal en cada sexo, de los cuales en las tablas IV y V se resumen las características histológicas.

Tabla IV.-. Descripción de las fases y los estadios de desarrollo gonádico de hembras de la almeja de sifón *Panopea globosa*.

Fases de desarrollo	Estadios de desarrollo	Características histológicas HE-Parafina-40X	Referencia
Estadio 1 o activo temprano	Previtelogénesis	Abundancia en tejido conjuntivo adipogranular y acinos pequeños con oogonias.	Calderón et al (2010), Aragón et al (2007)
Estadio 2 o activo tardío	Vitelogénesis 1	Menor cantidad de tejido conjuntivo adipogranular. Acinos más grandes con la presencia de ovocitos primarios, algunos secundarios y uno menor cantidad de oogonias existentes.	Calderón et al (2010), Aragón et al (2007)
Estadio 3 o maduro	Vitelogénesis 2	Poca cantidad de tejido conjuntivo adipogranular. Acinos grandes con la presencia de una buena cantidad de ovocitos maduros en el lumen y algunos ovocitos secundarios aun adheridos en las paredes.	Calderón et al (2010), Aragón et al (2007)
Estadio 4 o parcialmente desovado	Posvitelogénesis	Reincorporación de tejido conjuntivo adipogranular. Acinos con cantidades casi nula de ovocitos maduros en el lumen.	Calderón et al (2010), Aragón et al (2007)
Estadio 5 o desovado	Desovado	Disminución considerable de tamaño de gónada, desorganizada, reabsorción de gametos sobrantes, procesos de fagocitosis visibles y tejido conectivo empezaba a incrementar entre los acinos.	Calderón et al (2010), Aragón et al (2007)

Tabla V.- Descripción de las fases y los estadios de desarrollo gonádico de machos la almeja de sifón *Panopea globosa*.

Fases de desarrollo	Estadios de desarrollo	Características histológicas HE-Parafina-40X	Referencia
Estadio 1 o activo temprano	Espermatogénesis Temprana	Abundancia de tejido conjuntivo adipogranular y acinos pequeños con espermatogonias.	Calderón et al (2010), Aragón et al (2007)
Estadio 2 o activo tardío	Espermatogénesis Tardía	Disminución parcial de tejido conjuntivo adipogranular. Acinos más alargados y la presencia de espermátidas y esperma.	Calderón et al (2010), Aragón et al (2007)
Estadio 3 o maduro	Espermioagénesis	Limitada cantidad de tejido conjuntivo adipogranular. Acinos largos con un volumen considerable de esperma.	Calderón et al (2010), Aragón et al (2007)
Estadio 4 o parcialmente desovado	Postespermatogénesis	Reincorporación de tejido conjuntivo adipogranular. Encogimiento de los acinos con poca cantidad de gametos maduros en su interior.	Calderón et al (2010), Aragón et al (2007)
Estadio 5 o desovado	Desovado	Aumento evidente de tejido adipogranular, procesos de reabsorción de gametos y acinos prácticamente vacíos.	Calderón et al (2010), Aragón et al (2007)

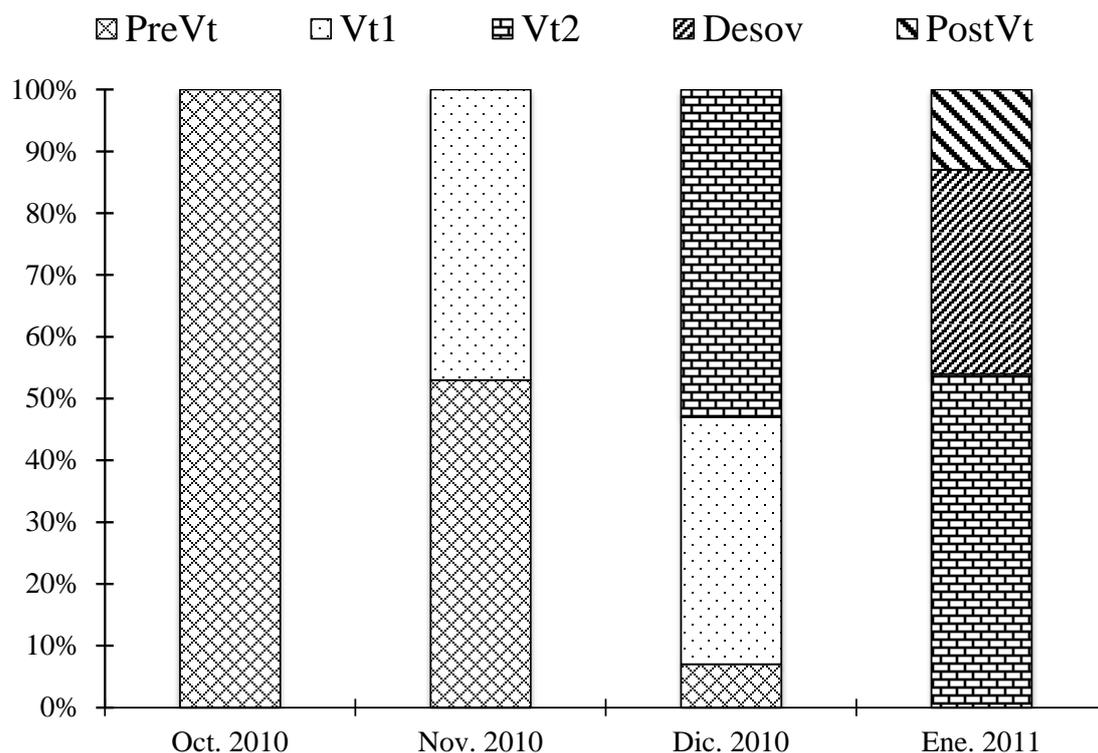


Figura 6.- Frecuencia de los estadios de madurez de hembras de *Panopea globosa*, muestreadas en San Felipe, B.C. México, durante los meses de muestreo. Prevt = Previtelogénesis; Vt 1 = Vitelogénesis Primaria; Vt 2 = Vitelogénesis Secundaria; Desov = Desovado; Posvt = Posvitelogénesis.

Para el mes de octubre se encontró que un 100% de las hembras se encontraban en desarrollo previtelogénico (Figura 6). Para el mes de noviembre se encontró un 53% de hembras en estadio previtelogénico y un 47% en estadio de vitelogénesis primaria. Para el mes de diciembre la mayoría de los organismos se encontraban en estadio de vitelogénesis secundaria (53%), un 40% en estadios de vitelogénesis primaria y un menor porcentaje de organismos en previtelogénesis (7%). En lo que corresponde al mes de enero se observó que un 54% de las hembras se encontraban en vitelogénesis secundaria (Figura 6), un porcentaje considerable (33%) de hembras estaban en estadio desovado y un menor porcentaje de hembras en estadio posvitelogénicos (13%).

En relación a los machos (Figura 7) se pudo observar que 100% de los organismos muestreados se encontraron en estadio de espermatogénesis temprana (preespermatogénesis) en octubre. Para el mes de noviembre se encontró que el 100% de los machos se encontraban es estadio de espermatogénesis tardía (espermatogénesis 1). Para el mes de diciembre un 50% de los machos aún se encontraban en estadio de espermatogénesis tardía, sin embargo el otro 50% se encontraban en estadio de espermiogénesis (espermatogénesis 2). Para el mes de enero se observó que un 50% de los machos aún se encontraban en espermiogénesis, un 30% de los machos se encontraron desovados y un 20% de los mismos en estadio de postespermatogénesis (Figura 7).

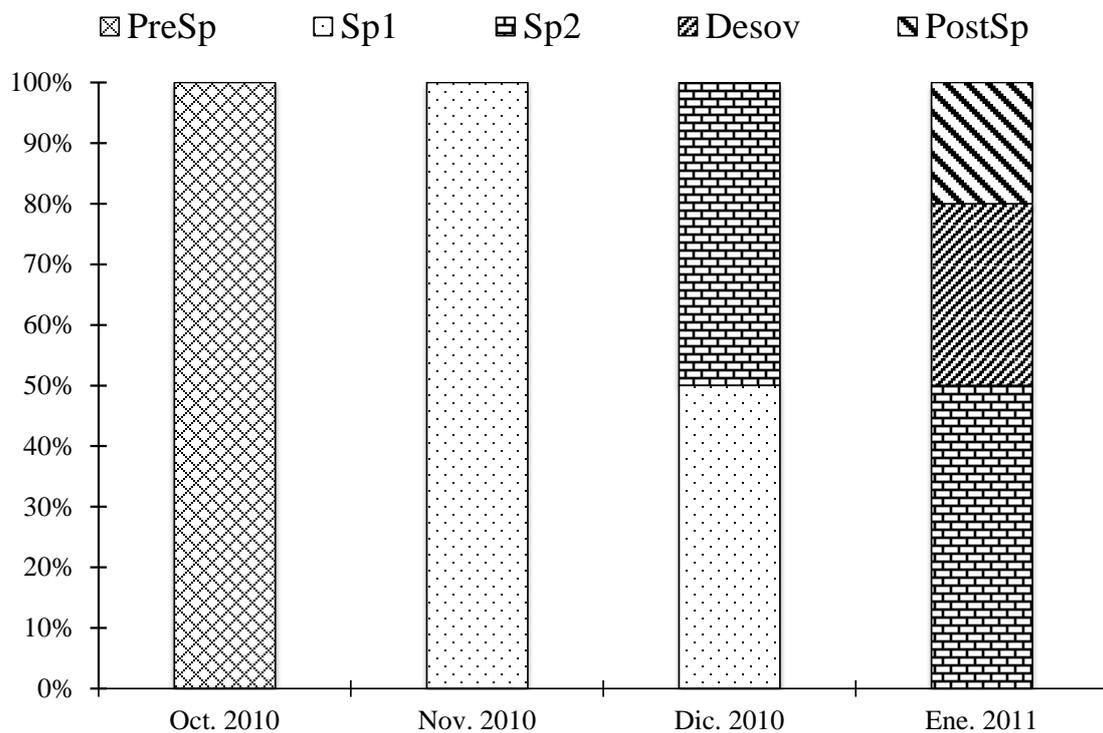


Figura 7.- Frecuencia de los estadios de madurez de machos de *Panopea globosa*, muestreadas en San Felipe, B.C. México, durante los meses de muestreo. PreSp = Preespermatogénesis; Sp1 = Espermatogénesis Primaria; Sp2 = Espermatogénesis Secundaria; Desov = Desovado PostSp = Postespermatogénesis.

En cuanto a las características morfo-histológicas de la gónada de hembras y machos se observó que para el mes de octubre ambos sexos presentaron una abundancia en tejido conjuntivo adipogranular y acinos pequeños con oogonias y espermatogonias respectivamente, lo cual corresponde a organismos en el estadio I de previtelogénesis para el caso de las hembras y preespermatogénesis para los machos (Figura 8-A y 9-A).

Para el mes de noviembre las gónadas se caracterizaron por una menor cantidad de tejido conjuntivo adipogranular siendo más evidente en hembras (Figura 8-D) que en machos (Figura 9-D). Los machos con acinos más alargados y la presencia de espermatidas y esperma lo cual corresponde a organismos en el estadio II de espermatogénesis avanzada (Figura 9-D).

En el caso de las hembras también se observan acinos más grandes con la presencia de ovocitos primarios, algunos secundarios y menor cantidad de oogonias existentes, lo cual corresponde a organismos en el estadio II de vitelogenesis primaria (Figura 8-D).

Para el mes de diciembre se encontraron gónadas con poca cantidad de tejido adipogranular tanto en machos como en hembras. En el caso de los machos se observó acinos grandes con un volumen considerable de esperma, lo cual corresponde a organismos en estadio III de espermiogénesis o madurez (Figura 9-G) y en cuanto a las características de las hembras fueron acinos grandes con la presencia de ovocitos maduros en el lumen y algunos ovocitos secundarios aun adheridos en las paredes de éste, lo cual corresponde a organismos en estadio III de postvitelogenesis (Figura 8-G).

Para el mes de enero se observó una reincorporación de tejido conjuntivo adipogranular tanto en el caso de hembras y machos (Figura 8-H y Figura 9-H). En los machos se presentó una disminución del tamaño de los acinos con poca cantidad de esperma en su interior, lo cual corresponde a organismos en estadio IV de desove

parcial (Figura 9-H). Para el caso de las hembras se observaron acinos con muy poca cantidad de ovocitos maduros en el lumen, lo cual corresponde a organismos en estadio IV de desove parcial (Figura 8-H). En el caso de los organismos desovados (estadio IV) fue evidente un aumento de tejido adipogranular, procesos de reabsorción de gametos y acinos prácticamente vacíos tanto en el caso de hembras como de machos (Figura 8-H y Figura 9-H). En algunos organismos analizados en el mes enero se pudo observar un proceso de postdesove (estadio V) tanto en hembras como en machos, en donde se evidenció una reabsorción de gametos importante, con una gran cantidad de acinos vacíos y un aumento en la cantidad de gotas lípidicas en el lumen (Figuras 8-K y 9-K). Con base a todos los resultados anteriores podemos establecer que el pico reproductivo para la almeja de sifón *Panopea globosa* se encuentra a inicios del invierno en donde las temperaturas oscilan entre los 15 y 16°C.

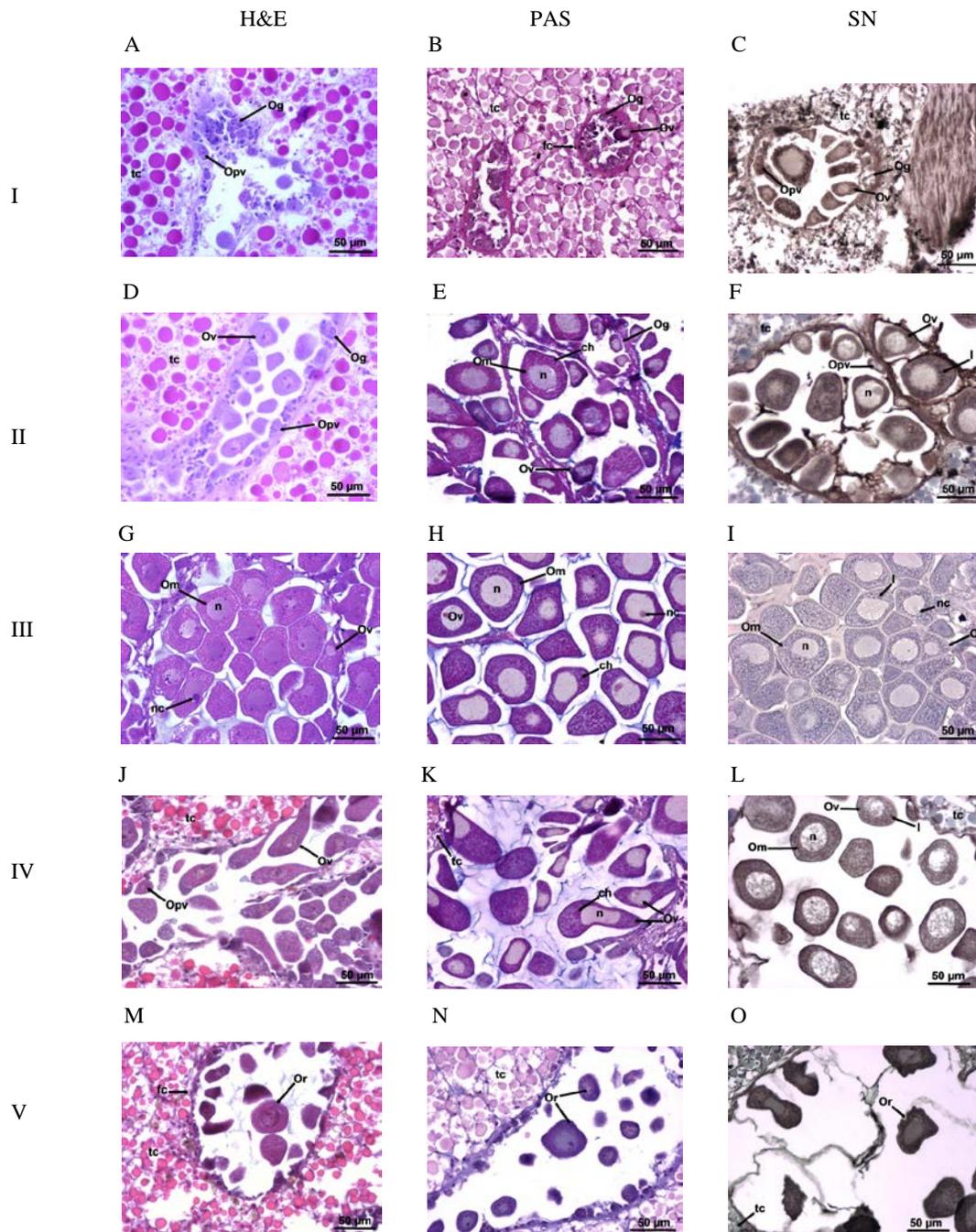


Figura 8.- Estadios de desarrollo gonádico de almeja de sifón *Panopea globosa*. Estadio I, previtelogénesis; Estadio II, vitelogénesis; Estadio III, postvitelogénesis; Estadio IV, Desove parcial; Estadio V, Postdesove. Ovogonias, Og; ovocitos previtelogénicos, Opv; ovocitos maduros o postvitelogénicos, Om; ovocitos residuales o atresicos, Or; tejido conjuntivo,tc; núcleo, n; nucléolo, nc; lípidos, l; carbohidratos, ch; H&E, hematoxilina-eosina; PAS, ácido periódico Schiff; SN, sudán negro.

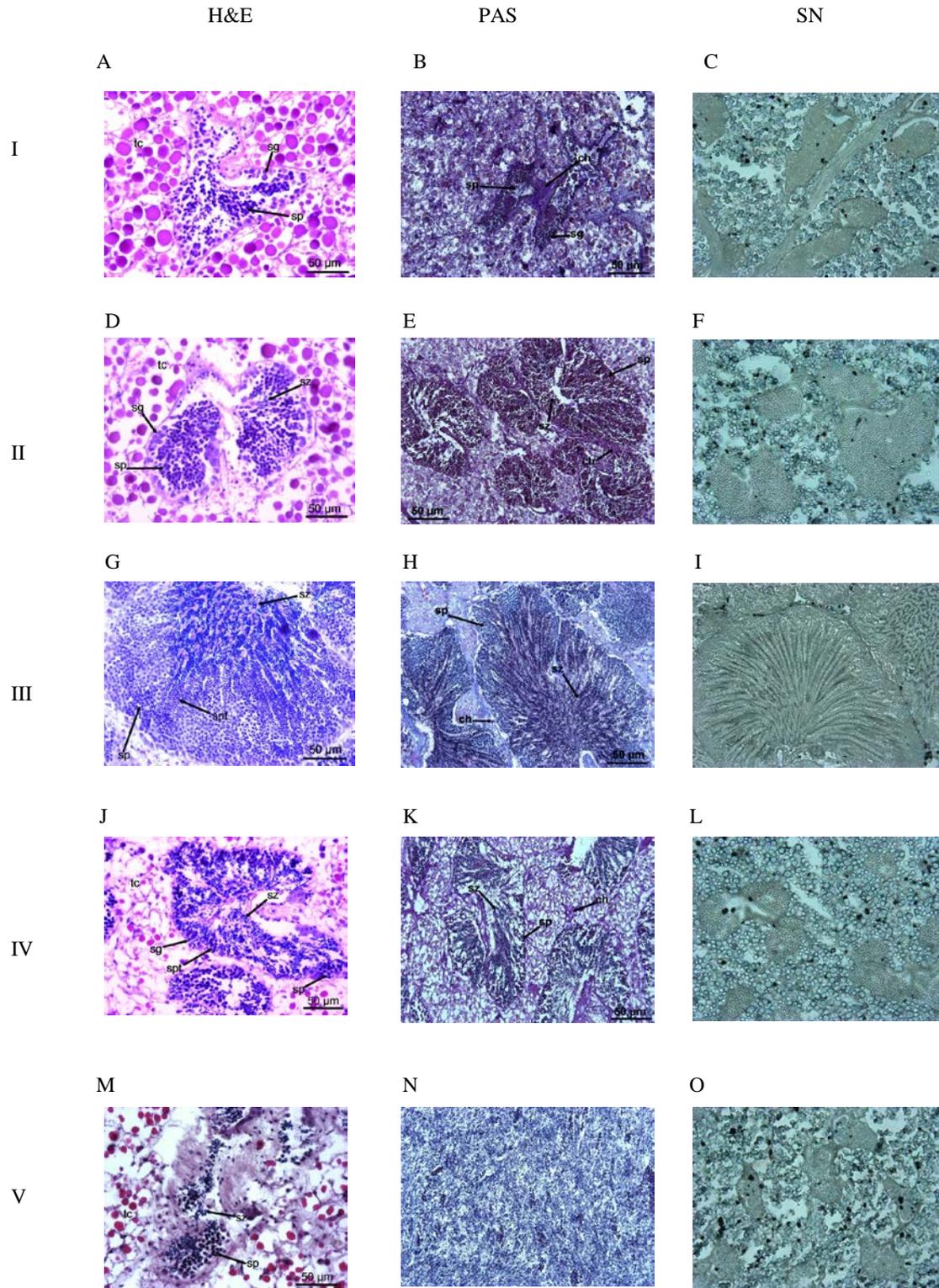


Figura 9.- Estadios de desarrollo gonádico de machos de almeja de sifón *Panopea globosa*. Estadio I, espermatogénesis temprana; Estadio II, espermatogénesis avanzada; Estadio III, espermiogénesis o madurez; Estadio IV, Desove parcial; Estadio V, Postdesove. Espermatogonias, sg; espermatocitos primarios y secundarios, sp;

espermátidas, spt; espermatozoos, sz; tejido conjuntivo, tc; carbohidratos, ch; lípidos, l. H&E, hematoxilina-eosina; PAS, ácido periódico Schiff; SN, sudan negro.

Histología cuantitativa e Histoquímica

Los resultados obtenidos del análisis histológico cuantitativo realizado en las gónadas de las hembras se presentan en la tabla VI, en donde se puede observar los valores promedio de área de ovocitos, diámetro de ovocitos, así como, el contenido histoquímico de lípidos y de carbohidratos. Para las hembras muestreadas en el mes de octubre (previtelogénesis) se obtuvo el menor valor promedio del área de ovocitos (570 μm) y para el mes de noviembre (vitelogénesis secundaria) se obtuvo el valor promedio más alto (3700 μm). En cuanto al diámetro de ovocitos se presentó un comportamiento similar, obteniéndose el valor más alto (75.6 μm) para el mes de noviembre y el valor promedio más bajo (22.3 μm) para el mes de octubre.

El contenido histoquímico de las gónadas se reporta en la Tabla VI. En hembras se observó un aumento de los valores promedios de lípidos a partir de la previtelogénesis (33.1%) (Figura 8-C) hacia la vitelogénesis primaria (Figura 8-F) y secundaria (Figura 8-I), en donde se alcanzan los valores más altos (87.8% – 91.4%). Para los carbohidratos el comportamiento encontrado fue un aumento en los valores a partir de la previtelogénesis (21.6%) (Figura 9-B) hacia la vitelogénesis primaria (49.3%) (Figura 9-E), posteriormente se reporta una disminución de este componente (28.9%) en vitelogénesis secundaria (Figura 9-H) para nuevamente incrementar sus niveles (40.4%) en organismos desovados (Figura 9-K, N).

Tabla VI.- Histología cuantitativa de tejido gonádico realizada para los estadios de madurez gonádica, encontrados en los muestreos en hembras de *Panopea globosa*.

VARIABLES	ESTADIOS DE MADUREZ				ANOVA
	Previtelogénesis	Vitelogenesis primaria	Vitelogenesis secundaria	Desovado	<i>P</i> -valor
Área de ovocitos (μm)	570 ± 24.7^a	2390 ± 80.7^b	3700 ± 70.3^c	1520 ± 32.2^d	0.002
Diámetro de ovocitos (μm)	22.3 ± 3.96^a	51.1 ± 2.0^b	75.6 ± 16.7^c	28.0 ± 6.32^a	0.003
Lípidos (% area)	33.1 ± 1.4^a	87.8 ± 4.7^b	91.4 ± 4.8^b	38.14 ± 1.3^a	0.010
Carbohidratos (%area)	21.6 ± 1.2^a	49.3 ± 4.3^b	28.9 ± 4.3^a	40.4 ± 1.0^b	0.005

Contenido bioquímico en hemolinfa y gónada.

En términos generales los promedios obtenidos para los niveles de proteínas totales en hemolinfa de hembras y machos fueron bajos para todos los meses de muestreo. Los valores mas altos se de proteínas solubles se observaron durante octubre-noviembre (0.30 a $0.45 \mu\text{g/mL}$) y los mas bajos (0.25 a $0.27 \mu\text{g/mL}$) en diciembre-enero (Figura 10).

En cuanto a los machos, la concentración de proteínas totales presentes en hemolinfa presentó un comportamiento muy similar a lo observado en las hembras, con valores ligeramente menores, pero no significativos (Figura 10).

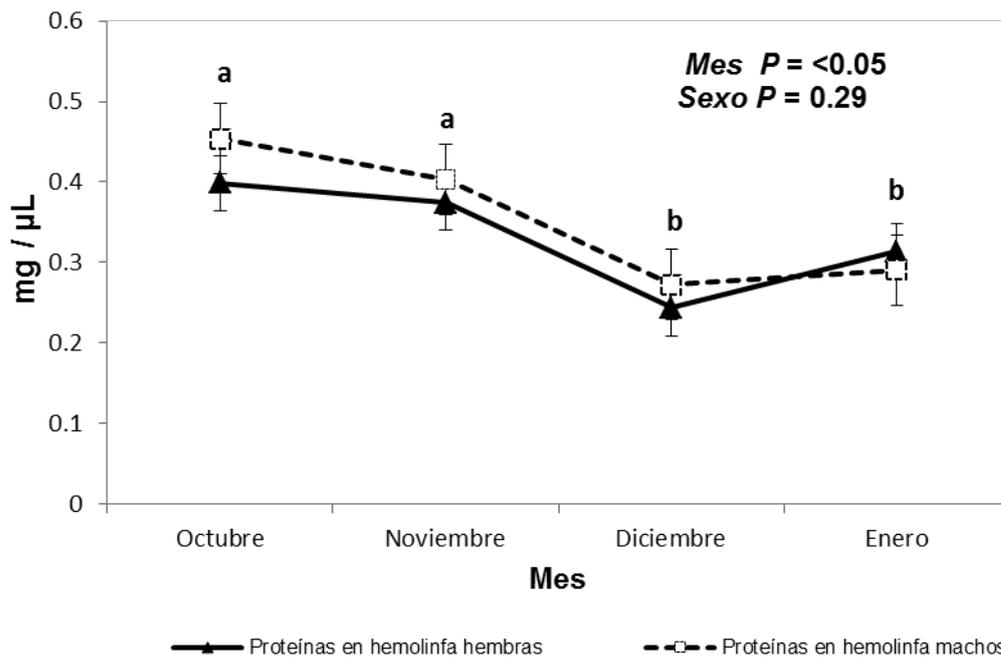


Figura 10.- Niveles promedio de las proteínas totales en hemolinfa de hembras y machos de la almeja *Panopea globosa*, durante los meses de muestreo. Media \pm Error estándar (ES). N=60.

En cuanto a los niveles de lípidos totales en hemolinfa fueron bajos para ambos sexos (Figura 11). Los niveles se mantuvieron constantes durante el período octubre - diciembre (0.26 mg/μL – 0.29 mg/μL) y disminuyeron significativamente en enero (0.14 mg/μL).

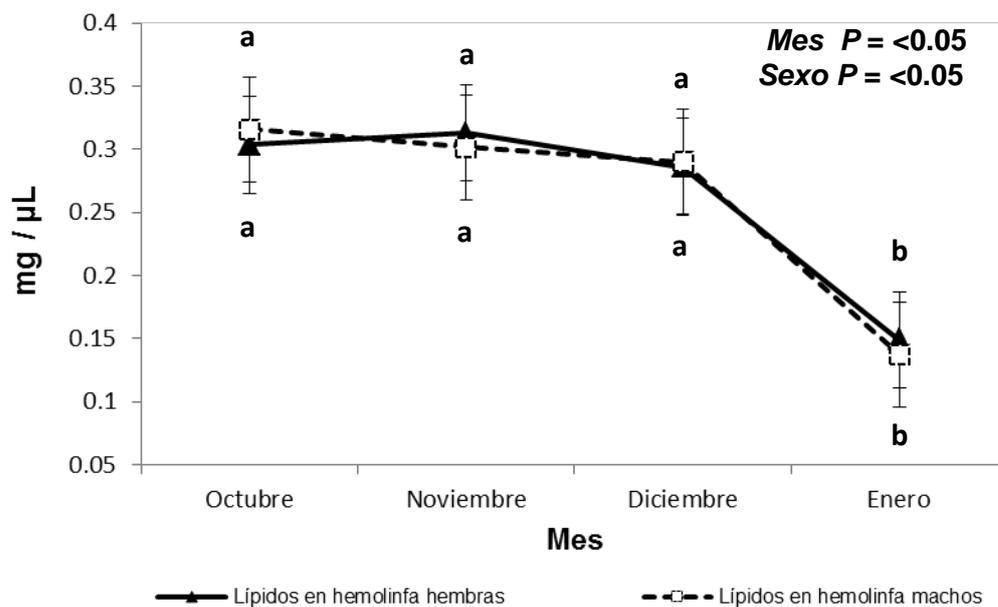


Figura 11.- Niveles promedio de los lípidos totales en hemolinfa de hembras y machos de *Panopea globosa*, durante los meses de muestreo. Media \pm Error estándar (ES). N=60.

Los niveles de carbohidratos totales obtenidos en hemolinfa disminuyeron paulatinamente en función del tiempo (Figura 12), En ambos sexos se evidenció un decremento de carbohidratos de octubre a noviembre (0.10 μ g/mL, 0.09 μ g/mL). A partir de ese mes se los niveles de carbohidratos se mantuvieron relativamente constantes (Figura 12).

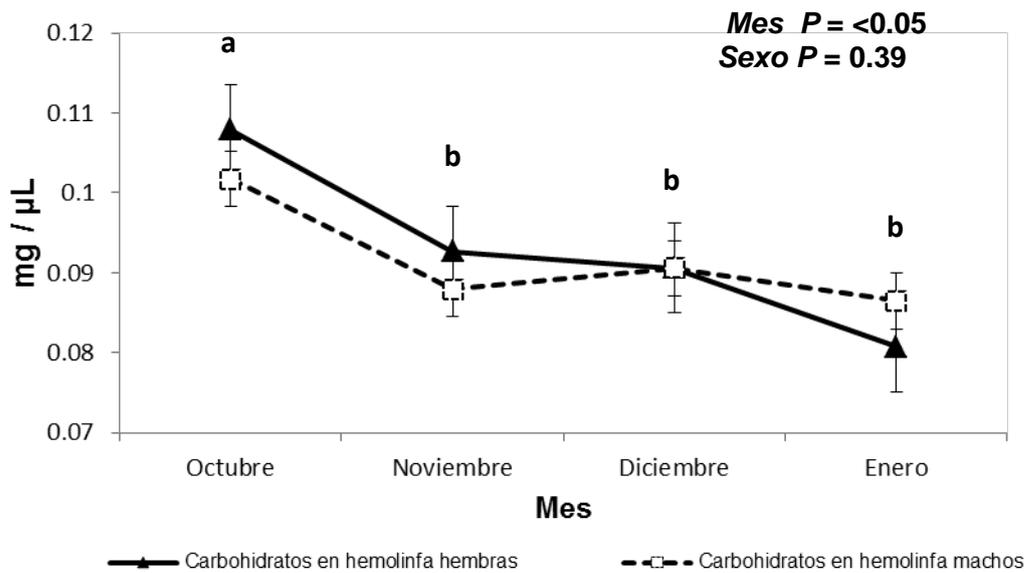


Figura 12.- Promedios de las concentraciones de carbohidratos totales en hemolinfa de hembras y machos de almeja *Panopea globosa*, durante los meses de muestreo. Media \pm Error estándar (ES). N=60.

En cuanto a los niveles de proteínas totales en tejido gonádico de hembras y machos, se observó que existen diferencias importantes temporales y sexo-específicas (Figura 13). En hembras se observó un ligero incremento en la concentración de proteínas totales a partir del mes de octubre (514.26 $\mu\text{g/g}$) hacia el mes de noviembre (541.74 $\mu\text{g/g}$). Posteriormente se observó una disminución importante para el mes diciembre (488.63 $\mu\text{g/g}$) y posteriormente un ligero aumento para el mes de enero (517.83 $\mu\text{g/g}$). (Figura 13).

Con respecto a los machos la concentración de proteínas totales en gónada presentó cambios importantes para los 4 meses de muestreo. Se observó un incremento en la concentración de este componente para los 3 primeros meses de muestreo con valores de 478.47 $\mu\text{g/g}$ para el mes de octubre, 649.99 $\mu\text{g/g}$ para el mes de noviembre y 741.18 $\mu\text{g/g}$ para el mes de diciembre. Posteriormente se presentó una disminución en la

concentración de este componente para el mes de enero con un valor de 568.71 $\mu\text{g/g}$ (Figura 13).

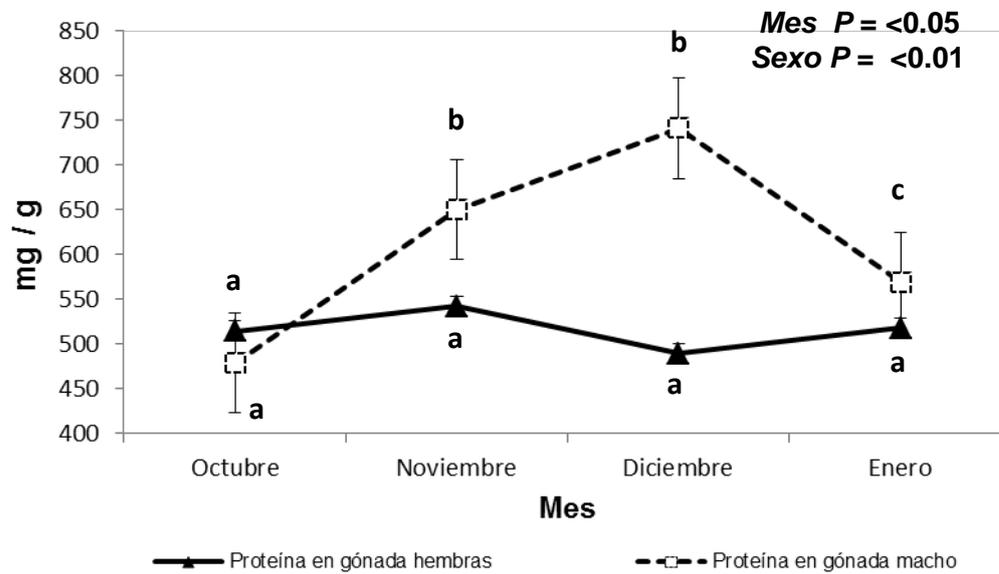


Figura 13.- Promedios de las concentraciones de proteínas totales en tejido gonádico de hembras y machos de la almeja *Panopea globosa*, durante los meses de muestreo. Media \pm Error estándar (ES). N=60

La concentración de lípidos totales en tejido gonádico de hembras presentó niveles relativamente constantes para los 4 meses de muestreo. El valor máximo reportado se encontró en el mes de noviembre (117.74 mg/g) mientras que el valor mínimo se observó para el mes de enero (89.09 mg/g) (Figura 14).

Para machos el valor máximo se observó para el mes de octubre con un valor de 241.98 $\mu\text{g/g}$ seguido de un decremento significativo para los meses de noviembre a enero (100.53 $\mu\text{g/g}$ a 94.31 $\mu\text{g/g}$) (Figura 14).

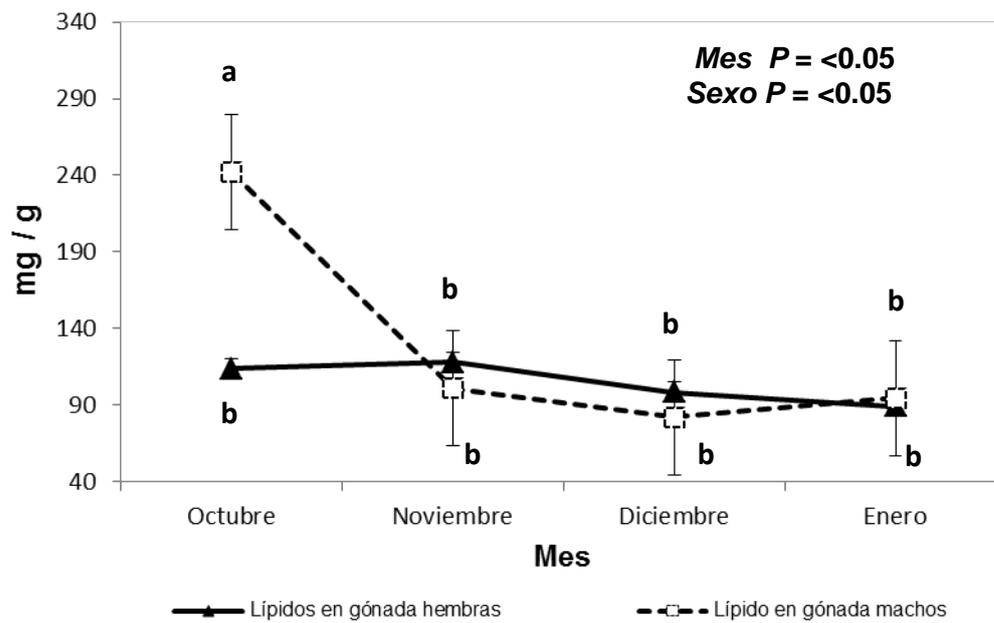


Figura 14.- Promedios de las concentraciones de lípidos totales en tejido gonádico de hembras y machos de almeja *Panopea globosa*, durante los meses de muestreo. Media \pm Error estándar (ES). N=60.

El patrón de comportamiento y los niveles de carbohidratos fué similar en hembras y machos (Fig. 15). Los máximos valores se observaron en octubre (108- 89 mg/g) y los mínimos en noviembre-diciembre (27.31 a 35.49 mg/g) seguido de un aumento importante para el mes de enero con un valor de 82.01 a 92.72 a mg/g (Figura 15).

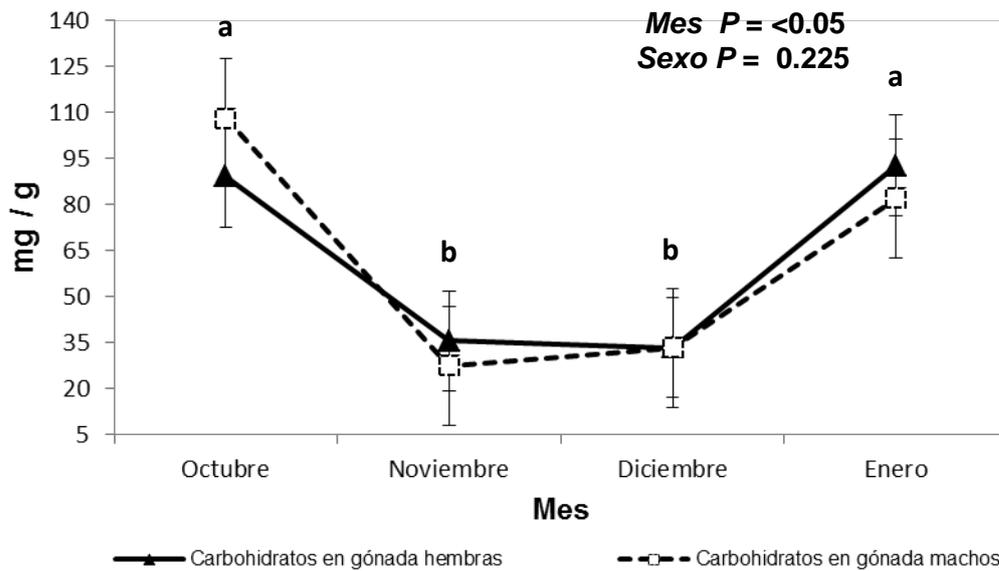


Figura 15.- Promedios de las concentraciones de carbohidratos totales en tejido gonádico de hembras y machos de almeja *Panopea globosa*, durante los meses de muestreo. Media \pm Error estándar (ES). N=60.

Al analizar los cambios en la composición bioquímica de la hemolinfa y la gónada de machos y hembras con respecto a los diferentes estadios de madurez se observó que existen diferencias significativas en algunos de los componentes (Tabla VII). En cuanto a la hemolinfa de hembras se obtuvieron diferencias significativas en los niveles de proteínas totales.

En cuanto a la gónada se obtuvieron diferencias significativas en los niveles de lípidos totales y carbohidratos (Tabla VII).

Tabla VII.- Concentraciones promedio de componentes bioquímicos en hembras y machos de la almeja *Panopea globosa* para los diferentes estadios gonádicos determinados para los 4 meses de muestreo.

	VARIABLES Hembras	ESTADIOS DE MADUREZ				ANOVA P-valor
Hemolinfa		Previtelogénesis	Vitelogénesis Primaria	Vitelogénesis Secundaria	Desovado	
	Proteínas totales (mg/μL)	0.40±0 ^a	0.37±0 ^b	0.24±0.02 ^c	0.31±0 ^a	0.001
	Lípidos totales (mg/μL)	0.30±0	0.31±0	0.28±0.04	0.15±0.03	0.763
	Carbohidratos (mg/μL)	0.01±0	0.09±0	0.09±0.01	0.08±0	0.479
Tejido Gonádico	Proteínas totales (mg/g)	514.26±19.94	541.74.77±0	488.63±28.84	517.83±53.78	0.792
	Lípidos totales (mg/g)	113.46±5.58 ^a	117.74±0 ^b	98.16±3.49 ^a	89.09±2.47 ^c	0.001
	Carbohidratos (mg/g)	53.34±9.10	34.99±0	37.49±4.38	23.30±6.99	0.062

...Tabla VII (continuación)

	VARIABLES MACHOS	ESTADIOS DE MADUREZ				ANOVA P-valor
Hemolinfa		Espermatogénesis Temprana	Espermatogénesis Tardía	Espermiogénesis	Desovado	
	Proteínas totales (mg/ μ L)	0.45 \pm 0.05 ^a	0.40 \pm 0.03 ^b	0.27 \pm 0.02 ^c	0.29 \pm 0.02 ^d	0.009
	Lípidos totales (mg/ μ L)	0.32 \pm 0.03 ^a	0.30 \pm 0.02 ^b	0.29 \pm 0.03 ^c	0.14 \pm 0 ^d	0.004
	Carbohidratos (mg/ μ L)	0.10 \pm 0.01	0.09 \pm 0.01	0.09 \pm 0	0.08 \pm 0.01	0.705
Tejido Gonádico	Proteínas totales (mg/g)	478.47 \pm 24.43 ^a	649 \pm 34.46 ^b	714.18 \pm 47.71 ^c	568.72 \pm 27.1 ^d	0.042
	Lípidos totales (mg/g)	241.99 \pm 0.03 ^a	100.54 \pm 0.02 ^b	82.08 \pm 0.03 ^c	94.31 \pm 0 ^d	0.004
	Carbohidratos (mg/g)	108.05 \pm 0.01	27.31 \pm 0.01	33.17 \pm 0	82.01 \pm 0.01	0.705

Se observaron diferencias significativas en la concentración de proteínas totales y de lípidos totales en hemolinfa para los estadios gonádicos de los machos. También se observaron diferencias significativas en la concentración de proteínas totales y lípidos totales para los diferentes estadios gonádicos determinados en este estudio (Tabla VII).

Vitelogenina

Los resultados de la estandarización del inmunoensayo ELISA en tejido gonádico de *Panopea globosa* mostró que la sensibilidad de los anticuerpos anti-vitelina para vitelina pura, hemolinfa y ovario de la almeja *Panopea globosa* fue similar. En los tres casos las curvas de respuesta fueron paralelas, lo que demuestra la identidad antigénica de los anticuerpos con las proteínas de los tejidos estudiados (hemolinfa y ovario). Aunque en el caso de la hemolinfa se observó una señal baja, el comportamiento es el mismo sin interferencia aparente de otras proteínas circulantes (Figura 16).

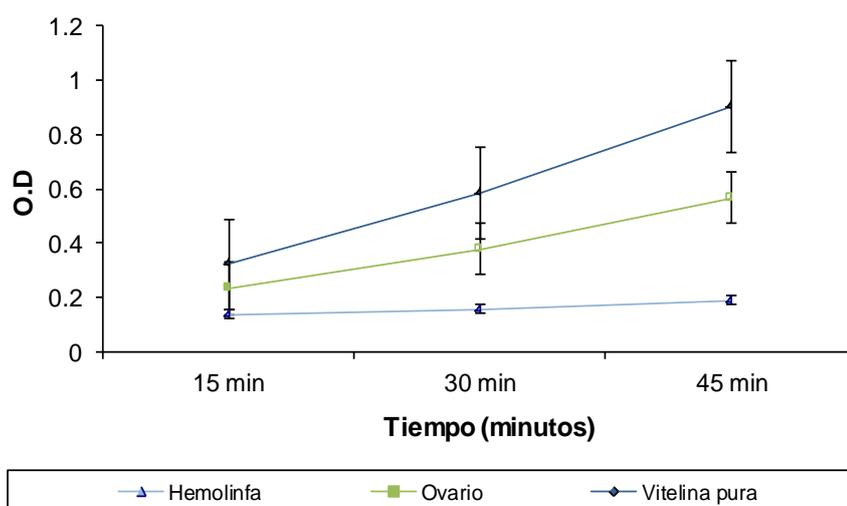


Figura 16.- Densidad óptica (O.D) de los anticuerpos anti-vitelina de los tejidos analizados la almeja *Panopea globosa*.

Al evaluar la afinidad de los anticuerpos mediante ensayos de titulación utilizando diluciones diferentes, se obtuvo que diluciones de anticuerpos de 1/10000 reaccionaran con el antígeno.

Después de probar la afinidad de los anticuerpos con los diferentes tejidos de la almeja *Panopea globosa*, se realizó la validación del inmunoensayo ELISA para poder asegurarnos de la especificidad y precisión del ensayo, para lo que se realizaron una serie de pruebas determinándose en primer término las concentraciones adecuadas del antígeno (vitelogenina y vitelina) y del anticuerpo antivitelinas (1^{er} anticuerpo). Esto se realizó variando la concentración de cada uno de los tejidos analizados y utilizando diluciones de las muestras con base a su contenido de proteínas totales, hasta obtener la concentración necesaria que produjera valores de densidad óptica por debajo de 2. Después de varios ensayos se determinó que la concentración de 100µg /ml de proteínas totales (en hemolinfa y ovario) de muestra asociada a una dilución de 1:3000, del primer anticuerpo produjo resultados satisfactorios. Posteriormente, las diluciones óptimas del segundo anticuerpo fueron de 1/5000. En esta etapa se determinó la importancia de las diluciones de ambos anticuerpos, debiendo ser ajustados al mínimo necesario para evitar el llamado “ruido de fondo” ocasionado por uniones no específicas.

Fue muy importante utilizar el mismo lote del 2^{do} anticuerpo para todas las muestras a analizar ya que se pueden producir fuertes variaciones debidas a una diferente calidad de la enzima.

Por otra parte fue necesario determinar la concentración de proteínas no reactivas con el anticuerpo anti-vitelina, así como del agente de lavado (Tween 20), con el fin de disminuir las uniones no específicas de otras proteínas diferentes a las moléculas de nuestro interés.

Se determinó que 1 hora fue suficiente para saturar los sitios libres, así mismo se determinó que el uso de Tween 20, mejora mucho el bloqueo de sitios de fijación, ya que su función es prevenir las interacciones hidrófobas entre las proteínas agregadas a la fase sólida sin interferir con la unión antígeno-anticuerpo.

El número de lavados fue limitado a cuatro en cada incubación debido a que un número superior ocasionó el desprendimiento parcial del ligante antigénico absorbido a la microplaca, el cual una vez liberado puede comportarse como competidor. Este número de lavados fue suficiente para la obtención de blancos correctos con una densidad óptica que fue de 0 a 0.09 nm. Así mismo, se observó que la etapa de lavado que se realiza después de la adición del 2º anticuerpo es de las más importantes, ya que si no se realiza correctamente puede disminuir la especificidad y la sensibilidad del ensayo.

Para determinar la reproductividad “intra” y “entre” ensayos, se analizaron 5 muestras de concentraciones conocidas de vitelina pura, los resultados nos indicaron un coeficiente de variación de 4.8%. Para medir la variabilidad entre diferentes ensayos se realizaron 4 ensayos con diferentes diluciones de vitelina pura, y el porcentaje de variación fue de 9%. Los dos coeficientes se encuentran dentro de los límites aceptables para este tipo de métodos.

Desde el punto de vista cinético, la elección de la fijación de los antígenos (hemolinfa y ovario) a baja temperatura 4 °C nos permitió determinar la estabilidad de las condiciones del ensayo, ya que los coeficientes de variación obtenidos no fueron estadísticamente diferentes, siendo este factor muy importante ya que la reproducibilidad de la fijación depende de la sensibilidad del ensayo.

La curva estándar del antisuero obtenida con vitelina purificada mostró una relación lineal significativa en un intervalo de 12 a a 250 μg vitelina/ μL (Figura 17). Con menos de 12 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ el análisis no fue sensible.

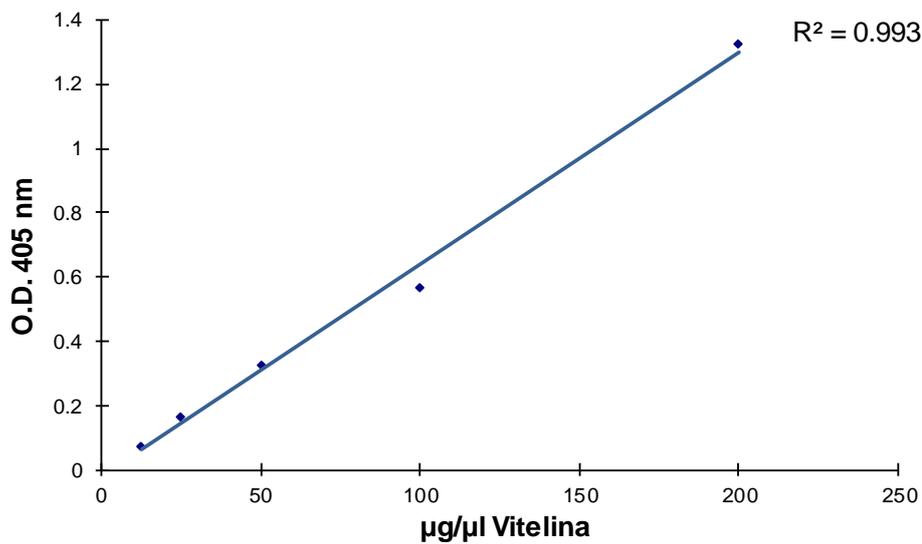


Figura 17.- Curva estándar de vitelina pura. O.D.= Densidad óptica.

Los valores encontrados de vitelogenina/vitelina en la almeja *Panopea globosa* se muestran para la hemolinfa (Figura 18) y tejido gonádico (Figura 19). Los valores de vitelogenina en la hemolinfa son bajos comparados con los encontrados en tejido gonádico

La concentración de vitelogenina en hemolinfa presentó un incremento significativo de la previtelogénesis (16.43 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) a la vitelogénesis primaria y secundaria (27.8 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ – 47.8 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) $P < 0.05$. A partir de este último estadio se observó que los niveles de vitelogenina disminuyen significativamente para organismos desovados (35.15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) (Figura 18).

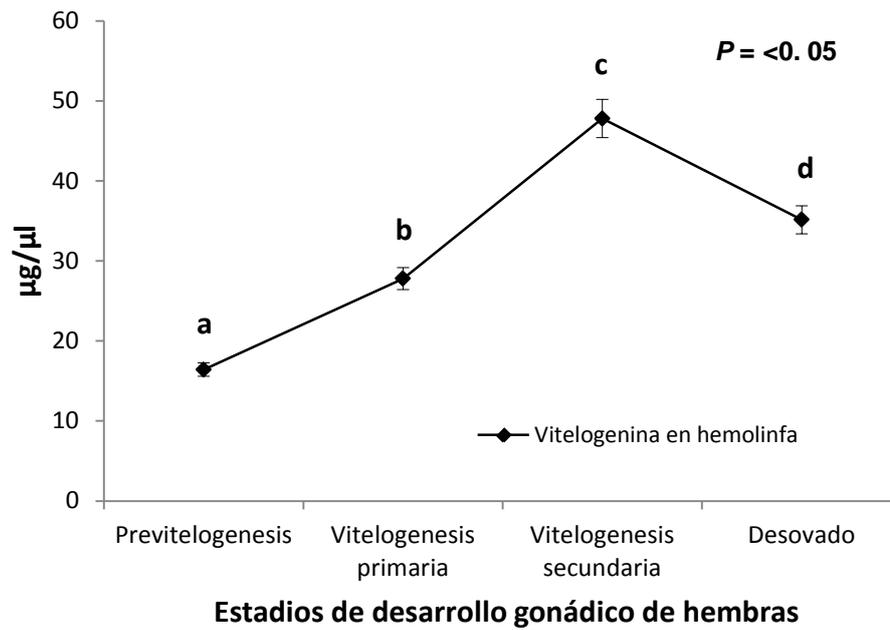


Figura 18.- Concentración de vitelogenina en hemolinfa para los diferentes estadios de desarrollo gonádicos en hembras de la almeja de sifón *Panopea globosa*.

Las concentraciones de vitelina en el tejido gonádico de hembras con relación a los diferentes estadios gonádicos encontrados en el presente trabajo, se observaron diferencias significativas (Figura 19). Se observó una disminución significativa en la concentración de vitelina en la vitelogénesis primaria (510 µg/g) seguida de un incremento evidente en la vitelogénesis secundaria manteniéndose altos en los organismos desovados (550 µg/µg – 570 µg/g).

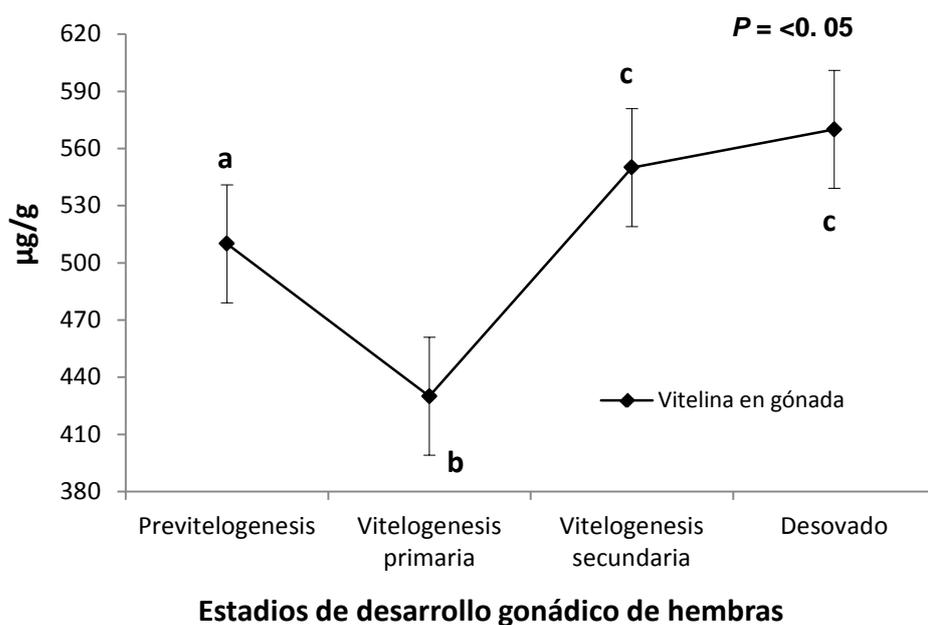


Figura 19.- Concentración de vitelina en gónada durante los diferentes estadios de desarrollo en hembras de *Panopea globosa*.

En cuanto a los machos, los resultados obtenidos de los niveles de vitelina en hemolinfa y tejido gonádico fueron cercanos a cero y similares a los valores obtenidos para los blancos.

Los análisis de correlación entre los componentes bioquímicos de la hemolinfa y el diámetro o área de los ovocitos se muestran en la Tabla VIII.

Tabla VIII.- Coeficientes de correlación de Pearson (r) entre los componentes bioquímicos de la hemolinfa/gónada de hembras de la almeja de sifón *Panopea globosa* y las variables histológicas cuantitativas relacionadas con el grado de madurez de hembras (diámetro y área de ovocitos). *= correlación significativa a un $\alpha= 0.05$.

TEJIDO	COMPONENTES BIOQUÍMICOS	DIÁMETRO DE OVOCITOS	ÁREA DE OVOCITOS
Hemolinfa de hembras	Vitelogenina	0.599*	0.470*
	Proteínas totales	-0.512	-0.485
	Lípidos totales	0.372	0.264
	Carbohidratos	0.689*	0.544*
Gónada de hembras	Vitelina	0.892*	0.789*
	Proteínas totales	0.383	0.337
	Lípidos totales	0.354	0.386
	Carbohidratos	0.261	0.286

*Correlaciones estadísticamente significativas

Los resultados indicaron que existe una correlación positiva y significativa entre la concentración de vitelogenina en hemolinfa y el diámetro de ovocitos ($r=0.599$, $P<0.05$) y el área de ovocitos ($r= 0.470$; $P<0.05$), así como entre los niveles de carbohidratos y el diámetro ($r=0.689$; $P<0.05$) y el área de ovocitos ($r=0.544$; $P<0.05$).

También se encontró una correlación positiva y significativa entre la concentración de vitelina de la gónada y el diámetro ($r=0.892$; $P<0.05$) o el área de los ovocitos ($r=0.789$; $P<0.05$).

Para el resto de los componentes analizados en la gónada las correlaciones obtenidas no fueron estadísticamente significativas (Tabla VIII).

Discusiones

Efecto de la extracción de hemolinfa en organismos experimentales

Los organismos experimentales utilizados para procesos de desove posterior a la extracción de hemolinfa fue una manera cualitativa de rectificar que efectivamente no existe ningún daño en la fisiología reproductiva de organismos maduros de *Panopea globosa*. Machos y hembras maduros obtenidos en los períodos de muestreo del mes de noviembre y diciembre fueron sometidos a un proceso de extracción de hemolinfa para la obtención de muestras y posteriormente fueron utilizados para procesos de desove con resultados exitosos. Este es un claro indicador de que la metodología utilizada fue la adecuada ya que nos permitió obtener las muestras requeridas sin comprometer la salud de los organismos.

Considerando que las pruebas de extracción de hemolinfa se realizaron obteniendo diferentes volúmenes (100, 150, 200, 250 y 300 μL), podemos establecer que aún volúmenes altos de extracción no generan un efecto negativo importante en los organismos y que se puede realizar directamente realizando un punción en la cavidad pericardial, procedimiento sencillo en el cual no se genera ningún daño en el tejido de los organismos y en donde estos no generan ningún tipo de resistencia.

Efecto de la temperatura en el ciclo reproductivo

En la actualidad no existe información que nos indique la relación que existe con respecto al efecto de la temperatura en el ciclo reproductivo de la almeja *Panopea*

globosa. Sin embargo los estadios de madurez que se encontraron en el presente trabajo presentan diferencias en relación a lo que se encuentra reportado para esta especie con variaciones estacionales normales de temperatura para la zona correspondiente a San Felipe, Baja California (Calderón, et al.2010).

La temperatura es considerada unos de los factores más importantes en la regulación de procesos de maduración sexual y eventos reproductivos en organismos bivalvos. Los organismos obtenidos en el presente estudio demostraron cambios importantes en los estadios de madurez sexual que estuvieron relacionado con la disminución de las temperaturas registradas para los 4 meses de muestreo, evidenciando el inicio de la gametogénesis cuando el promedio de la temperatura se encontraba alrededor de los 21.5°C, eventos de maduración y desoves principalmente en el mes de diciembre cuando la temperatura se mantuvo relativamente constante (18.5 - 19°C) y eventos de desoves totales y procesos de reabsorción de gametos relacionados con el decremento de la temperatura hasta alcanzar los 15.5 °C aproximadamente para el mes de enero.

Ciclo de gametogénesis

Los diferentes estadios de gametogénesis encontrados en el presente estudio demostraron consistencia en relación a los estudios recientes reportados para esta especie.

Se realizó una descripción de las diferentes etapas del ciclo de gametogénesis para la almeja de sifón *Panopea globosa* obtenidas en Campo Núñez, B.C mediante técnicas histológicas encontrándose 5 estadios de madurez claramente evidenciados correspondientes a el período de estudios. La presencia de ovocitos previtelogénicos

representaron el inicio del ciclo de gametogénesis y la maduración gonadal fue cambiando conforme al tiempo hasta que alcanzó períodos en donde se observaron ovocitos maduros, eventos de desoves y reabsorción de gametos. Estos eventos coinciden con lo encontrado en trabajos anteriores para organismos de esta especie provenientes de la misma zona de estudio en donde se encontró que el inicio de la actividad reproductiva empezó en Octubre y continuo hasta Marzo con un alto porcentaje de organismos desovados en el mes de Noviembre y organismos desovados a partir del mes de Diciembre (Aragón, et al. 2007, Calderón, et al, 2010).

El uso de técnicas histológicas también nos permitió conocer la composición bioquímica a nivel de gónada en los organismos experimentales mediante técnicas histoquímicas que nos dieron información relacionada a los niveles de lípidos y carbohidratos presentes en los diferentes estadios de madurez encontrados. Los resultados obtenidos demuestran un aumento en la concentración de lípidos conforme avanza la maduración y una disminución de este compuesto en organismos desovados y en proceso de postvitelogénesis. De la misma manera a lo observado en técnicas bioquímicas, los carbohidratos presentan aumento y disminuciones en su concentración a lo largo de los estadios de madurez identificados, lo cual sugiere una utilización inmediata de este componente para efecto de maduración gonadal y/o de lipogénesis. Esto demuestra cierta consistencia a lo reportado por Jaramillo – Rodríguez y colaboradores (2008) en donde se analizó la composición bioquímica de *Crassostrea gigas* mediante métodos histoquímicos revelando que los ostiones acumulan más lípidos en gónada en estadios de madurez avanzados y su proporción decrece en hembras desovadas, no así en el caso de los machos. Una relación inversamente proporcional entre el área de cobertura gonadal (GCA por sus siglas en inglés), carbohidratos y tejido

vesicular en gónada, indicaron que los carbohidratos se reducen en tejido vesicular y en gónada conforme avanza la maduración, y son probablemente utilizados para procesos de lipogénesis, comportamiento bien conocido en moluscos durante la gametogénesis (Jaramillo – Rodríguez et al, 2008).

Componentes bioquímicos en gónada

En la actualidad no existe información reportada relacionada con la síntesis y transporte de los componentes bioquímicos principales (proteínas, lípidos y carbohidratos) específicamente en procesos reproductivos y maduración gonadal para la almeja de sifón *Panopea globosa*.

En el presente trabajo se realizó una caracterización de estos componentes bioquímicos con el fin de evaluar la presencia y la utilización de estos recursos en los períodos reproductivos de esta especie.

Para el caso de las hembras se encontraron los niveles más altos de proteínas al inicio de la gametogénesis en estadios de vitelogénesis I y posteriormente se mantuvieron las concentraciones de este componente para los siguientes estadios de madurez gonadal solo con ligeras variaciones en los meses siguientes. Este comportamiento se ha reportado para otras especies de bivalvos como en el caso de la ostra perlera *Pteria sterna* en donde se reporta una acumulación de proteína en la gónada producto de un proceso de formación de gametos en los primeros estadios de madurez y la utilización de los mismos en los procesos reproductivos (Vite-García, 2005).

En relación a la concentración de lípidos en gónada reportados para hembras de esta especie se pudo observar que las concentraciones promedio más altas de este componente se obtuvieron al inicio del ciclo de gametogénesis y posteriormente fueron

disminuyendo en los estadios subsecuentes. Esto difiere a lo reportado para otras especies de bivalvos. En el ostión de Cortez *Crassostrea cortiziensis* los niveles más elevados de lípidos en gónada se encontraron en estadios de posvitelogénesis y los niveles mas bajos en ostiones inmaduros (Rodríguez-Jaramillo et al, 2008). Sin embargo el comportamiento reportado para la ostra perlera *P.sterna* presenta una acumulación de los niveles de lípidos y triglicéridos en hembras mas evidentemente en organismos que inician el proceso de gametogénesis hasta alcanzar la madurez sexual (Vite-García, 2005).

Las características de los carbohidratos reportadas en el presente trabajo demostraron datos interesantes en donde se observó la concentración más alta al inicio del ciclo de gametogénesis, un decremento muy importante de este componente en los estadios de vitelogénesis I y II y una recuperación de éste para organismos en procesos de desove y posvitelogénicos. Estas características difieren a lo reportado para algunas especies de bivalvos en donde el contenido mas alto de carbohidratos en gónada se han encontrado en estadios posvitelogénicos y los niveles mas bajos en ostiones inmaduros (Rodríguez-Jaramillo et al, 2008). Sin embargo se ha reportado que los carbohidratos disminuyen en tejido vesicular y en gónada a medida que la maduración avanza, y son probablemente utilizados para lipogénesis, como es bien conocido en el caso de los moluscos durante la gametogénesis (Gabbott 1976, Barber y Blake 1991) lo cual justifica el decremento importante que da lugar para *Panopea globosa* en los estadios de mayor madurez gonadal.

La concentración de proteínas en gónada de machos en *Panopea globosa* demuestra que para el inicio del ciclo de gametogénesis los niveles son bajos pero aumentan de manera importante cuando empiezan a alcanzar la madurez para

posteriormente decrecer en organismos desovados y en proceso de posvitelogénesis. Esto sugiere un almacenamiento de este recurso en los procesos de vitelogenesis y una utilización del mismo en los procesos reproductivos. Esto se muestra consistente a lo reportado para otras especies de bivalvos en donde la acumulación de proteínas es utilizada para procesos de formación de gametos durante la gametogénesis, además de poder ser utilizada también como reserva de energía y para la formación de elementos estructurales en el tejido gonadal (Barber y Blake, 1981; Vite-García, 2005).

En relación a la concentración de lípidos en gónada de machos se pudieron observar que los niveles más altos se dieron en estadio de previtelogénesis para posteriormente disminuir de manera importante en los estadios subsecuentes en donde no existió una variación considerable de la concentración de este componente. Este decremento sugiera una utilización importante de este compuesto en los procesos reproductivos. En el ostión *Crassostrea cortiziensis* se presenta un comportamiento similar en donde el contenido lipídico se mantiene sin mucha variación para machos en gametogénesis tardía, maduros y desovados (Rodríguez – Jaramillo et al, 2008).

Para la concentración de carbohidratos se encontró que en machos de *Panopea globosa* los niveles más elevados se encontraron al inicio de la gametogénesis y posteriormente se reporta un decremento importante en los estadios de vitelogénesis I y II, para posteriormente aumentar sus niveles en los estadios finales, lo cual sugiere la utilización de este recurso en procesos de maduración gonadal. Esto demuestra consistencia a lo reportado para otras especies de bivalvos en donde se encontró los niveles más elevados de carbohidratos en estadios de madurez tempranos e indiferenciados y los niveles más bajos en organismos en estadios de madurez tardíos, maduros y desovados (Rodríguez-Jaramillo et al, 2008). Los carbohidratos, en especial

el glucógeno es utilizado como combustible para procesos de gametogénesis además de que puede ser utilizado como sustrato para la síntesis de lípidos y proteínas que son transferidos al vitelo de los ovocitos en desarrollo durante la gametogénesis (Barber y Blake, 1991; Racotta, 1998.). Es por esta razón que no se observa una acumulación importante de los carbohidratos en algunas especies bivalvos, ya que estos no se almacenan en el tejido gonadal sino que son utilizados como energía inmediata para realizar dichos procesos (Vite – García, 2005).

Movilización de Reservas

En relación a la movilización y transporte de reservas energéticas, específicamente de macromoléculas como es el caso de las proteínas, lípidos y carbohidratos, no existe ningún trabajo actual que reporte este proceso para la almeja de sifón *Panopea globosa*. Sin embargo este comportamiento fisiológico si ha sido evidenciados para otras especies de bivalvos.

En el presente trabajo se pudo observar que el transporte de proteínas tanto a nivel de gónada como de hemolinfa no es muy evidente, puesto que las concentraciones solo presentan ciertas variaciones en sus niveles para los diferentes estadios de madurez. Sin embargo existe una tendencia a disminuir a nivel de hemolinfa conforme avanza la madurez de los organismos, mientras que en gónada en donde los niveles de proteínas son mas elevados ya que se encuentran formando estructuras presenta una tendencia a aumentar ligeramente sus concentraciones en organismos maduros y desovados. Estos resultados respaldan a lo reportado para otras especies de bivalvos en donde las proteínas cumplen un papel importante como reserva energética y como elemento estructural en moluscos bivalvos adultos, principalmente durante la gametogénesis. De

acuerdo con esto, aparentemente en *Pteria sterna* y *Pinctada mazatlanica*, el almacenamiento de proteínas desempeña un rol importante en el suministro de energía y elementos estructurales para la formación de tejido gonadal (Vite – García 2005). El aumento de proteínas en períodos reproductivos se ha identificado en *P.mazatlanica*, en donde el pico reproductivo se caracteriza por una alta incidencia de organismos maduros, una alta frecuencia de ovocitos postvitelogénicos, un aumento en el contenido de lípidos y proteínas en gónada y un bajo contenido de proteínas en el músculo abductor (Gómez – Robles 2008). Esto sugiere una movilización de proteínas hacia la gónada en época reproductiva y maduración sexual que probablemente provenga del músculo abductor en donde se encuentra los mayores niveles de este componente en época de reproducción inactivas.

En relación a los niveles de lípido encontrados tanto en gónada como en hemolinfa de los organismos experimentales, pudimos observar que en caso particular de la gónada que aun cuando no son muy evidentes los cambios en las concentraciones si existe una tendencia a disminuir el contenido de este elemento en estadios avanzados de madurez, específicamente en organismos desovados y postvitelogénesis. Esta misma tendencia se logró observar a nivel de hemolinfa con una disminución importante de lípidos en los mismos estadios. Esto permite pensar que existe una utilización de este compuesto para efectos reproductivos y la relación inversamente proporcional entre los niveles en hemolinfa y gónada sugieren una transferencia de compuestos lípidos, generalmente triglicéridos, que se están transportando por medio de la hemolinfa hacia la gónada para luego poder ser utilizados en los procesos reproductivos. Aunque es importante mencionar que existen evidencias que demuestran que la glándula digestiva realiza un papel fundamental en la transferencia de fuentes lipídicas hacia la gónada en

alguna especie de organismos bivalvos (Gómez – Robles, 2008). Sin embargo esto demuestra consistencia a lo reportado por Besnard (1991), en donde menciona que además de que los lípidos son utilizados como reserva energética, en *Pecten maximus*, el contenido de triglicéridos, expresados como porcentaje de lípidos totales, presenta un ciclo que corresponde con el desarrollo de ovocitos y con la etapa de desove. De la misma manera Pazos et al (1997) mencionan que los cambios estacionales en el contenido de triglicéridos en la misma especie, está claramente influenciado por el ciclo reproductivo (Vite – García, 2005).

En cuanto a los carbohidratos, es evidente que es el componente mas utilizado por los organismos en los procesos reproductivos. En estadios de madurez temprana se presenta concentraciones altas a nivel de gónada de carbohidratos pero disminuyen de manera muy importante en los períodos de madurez gonadal y posteriormente se empiezan a recuperar en estadios de madurez tardíos. Esto sugiere una utilización muy importante de este recurso para procesos de maduración sexual, siendo fuente de energía inmediata para procesos reproductivos. Esto se relaciona de manera importante a lo reportado para otras especies de bivalvos. En el ostión japonés *Crassostrea gigas* el patrón y la magnitud de la acumulación de glicógeno aparentan tener cierta relación con la preparación para la gametogénesis. Sin embargo la gametogénesis podría interrumpirse en el invierno cuando los organismos exhiben un índice de condición bajo (CI) y se ven obligados a utilizar el glicógeno endógeno, resultando en una pérdida importante de energía en los organismos (García – Ezquivel et al, 2010). Mann (1979) encuentra que la primera maduración de esta especie es anticipada por un incremento continuo de carbohidratos en los tejidos, con un pico máximo que coinciden con el estadio temprano y tardío de la gametogénesis, mientras que un decremento subsecuente

de carbohidratos presentó una relación importante con organismos en estadio maduro (García – Ezquivel et al, 2010).

En otras especies de bivalvos se ha demostrado la utilización de los carbohidratos en los procesos reproductivos, en donde el glucógeno, componente principal de los carbohidratos no se acumula de manera importante en la gónada esto a debido a que dicho componente es utilizado rápidamente como combustible para la gametogénesis y como sustrato para la síntesis de lípidos y/o proteínas que son transferidos a los ovocitos en desarrollo durante la gametogénesis (Vite – García, 2005).

El factor fundamental de la utilización de la energía se encuentra definido por 2 aspectos importantes encontrados en algunos organismos bivalvos: 1) algunas especies, en función de su distribución geográfica y batimétrica, requieren movilizar reservas de proteínas del músculo abductor para regular la gametogénesis, en tanto que otras utilizan los carbohidratos de este mismo organismo y 2) los niveles de glucógeno o proteínas mantienen siempre una relación inversamente proporcional con el ciclo de madurez gonádica de especies como *Mytilus edulis*, *Pecten maximus*, *Chlamys septemradiata*, *Chlamys opercularis* y *Argopecten irradians irradians* (Gómez – Robles, 2008).

Indicadores de madurez y sexo en bivalvos marinos

En la actualidad no existen trabajos relacionados con indicadores o posibles indicadores del grado de madurez y sexo en la almeja *Panopea globosa*, sin embargo se han realizado estudios otras especies de organismos bivalvos en donde se han dado a conocer algunos componentes de origen bioquímicos que pueden ser utilizados como indicadores de madurez. Se ha encontrado que con el progreso de la gametogénesis la

composición bioquímica varía tanto en órganos reproductores femeninos como en masculinos en el ostión del Pacífico. El contenido de glucógeno en ovario y esperma decrece de manera considerable durante la maduración. Resultados similares han sido reportados para otras especie de bivalvos tales como *Argopecten irradians concentricus*, *Argopecten purpuratus* y *Mytilus edulis*. El decremento en el contenido de glucógeno en la gónada se cree que resulta de la reducción del glucógeno almacenado en el tejido conectivo vesicular, el cual depende de la glucogenólisis durante la gametogénesis. De la misma manera la fuente principal de energía durante la maduración de los gametos fue comparada con otros organismos bivalvos, los cuales suponen una adaptación a diferentes ambientes. Esta característica demostró que la gametogénesis en el ostión depende principalmente de la glucogenólisis (Li et al, 2000)

El contenido de triglicéridos en ovario refleja confiablemente el curso de la maduración sexual en el ostión, demostrando los niveles más altos cuando los ovocitos han crecido lo suficiente y se encuentran listos para ser desovados. Estos resultados también han sido encontrados para otras especies de bivalvos por lo que sugiere que una parte del glucógeno puede ser transformado en triglicéridos como lípidos de yema en el ovario del ostión (Li et al, 2000).

Estudios realizados en crustáceos han brindado información acerca de posibles indicadores bioquímicos de la progenie y el desempeño reproductivo en estos organismos. Algunos componentes bioquímicos en la progenie durante los estadios tempranos de desarrollo han sido considerados un indicador cuantitativo indirecto de la calidad materna. Se ha determinado que los triglicéridos constituyen la mayor fuente de reserva y que en camarones penéidos estos representan el 50% o más de los lípidos totales presentes en el huevo. A nivel más específico se conoce que en varias especies

de crustáceos, los ácidos grasos altamente insaturados (HUFA por sus siglas en inglés) son necesarios en la vitelogénesis. Las carencias de este tipo de HUFA ha sido causante de baja calidad de huevos producidos y se presentó una correlación entre el contenido de algunos HUFA en huevos y la fecundidad, porcentaje de fertilización o el porcentaje de eclosión (Arcos et al, 2012). Con respecto a los reproductores, se propuso que los niveles de proteínas en hemolinfa podrían ser un indicador del desempeño reproductivo. Se observó niveles más bajos de proteínas en hemolinfa en hembras que no habían presentado desoves durante todo un período de producción, lo cual sugirió que las proteínas podrían constituir un indicador predictivo de la capacidad de desoves múltiples (Arcos et al, 2011).

Niveles de vitelogenina/vitelina en hemolinfa y tejido gonádico

Las concentraciones de vitelogenina en hemolinfa y vitelina en gónada en el presente trabajo demostraron características importantes en relación al comportamiento de este componente en *P.goblosa*. Los resultados demuestran de manera evidente un transporte de vitelogenina en hemolinfa en los primeros estadios de madurez gonadal hacia la gónada en donde se traduce a vitelina. Posteriormente los niveles de este compuesto para los estadios de madurez posteriores se mantienen con un incremento relativamente constante a lo largo de los estadios reportados.

En la actualidad no existe información acerca de los niveles, síntesis, transporte de estos componentes a nivel de gónada y hemolinfa en la almeja *Panopea globosa*, sin embargo si han sido estudiados para otros organismos tales como peces, crustáceos y algunos bivalvos. Los resultados encontrados en el presente trabajo demuestran que la

determinación de vitelogenina y carbohidratos a nivel de hemolinfa y gónada pueden ser utilizados como indicadores predictivos del grado de madurez de hembras adultas de la almeja de sifón *Panopea globosa* ya que existe una correlación positiva entre los niveles de Vtg en hemolinfa, Vtn en gónada y carbohidratos en relación al grado de madurez

Este comportamiento se relaciona con otros estudios en donde los niveles de Vtg en sangre de teleósteos hembras están asociados con un marcado incremento de la actividad reproductiva y puede servir como indicadores el grado de desarrollo gonadal. Sin embargo, los niveles de Vtg en sangre no puede ser considerados como una concentración estable o continua (almacenamiento) ya que sólo se trata de un medio de transporte y sus niveles no reflejan estrictamente un proceso de síntesis, ya que los niveles en sangre se pueden ver afectados por la captación ovárica como por la síntesis hepática. Es posible que las fluctuaciones de vitelinas en lenguado de california *Paralichthys californicus* puedan estar relacionadas con el ciclo reproductivo y más estrechamente con el desarrollo gonadal (Burgos – Aceves, 2003). Los estudios realizados en el camarón blanco *Litopenaeus vannamei* se observó que durante la maduración existe una transferencia de lípidos desde el hepatopáncreas hacia la gónada. Dicho transporte de lípidos hacia la gónada se realiza por medio de lipoproteínas conocidas como vitelogeninas (en hemolinfa y hepatopáncreas) o vitelina (en ovario y huevo), las cuales en crustáceos son proteínas con alto peso molecular (500 KDa) asociadas a grupos lipídicos, glucídicos y carotenoides. Esta lipoproteína representa un indicador del estadio de maduración en el camarón (Arcos et al, 2011). Estudios recientes realizados en el ostión de Cortez *C.cortezensis* han demostrado que las concentraciones en gónada de Vtg/Vt incrementaron sincrónicamente con el crecimiento de los ovocitos (área de ovocitos y diámetro teórico de ovocitos),

indicando que el crecimiento de ovocitos depende de la acumulación de Vtg/Vt dentro de los ovocitos durante el desarrollo gonádico. Esto se confirmó mediante una correlación significativa encontrada entre las concentraciones de Vtg/Vt y el área y diámetro teórico de ovocitos, resultado que sugiere que las concentraciones de Vtg/Vt pueden ser indicadores confiables de la maduración gonadal, así como también una medida de la capacidad reproductiva individual en *C. corteziensis* (Arcos et al, 2009).

Es evidente que los niveles encontrados de estos componentes (Vtg, Vt y carbohidratos) en estadios tempranos de maduración (previtelogénesis – vitelogénesis primaria) se muestran significativamente diferentes ($P < 0.05$) en relación a los estadios avanzados de maduración (vitelogénesis secundaria – desovados) por lo cual es posible la utilización del método de extracción de hemolinfa no invasivo estandarizado en el presente trabajo para determinar el grado de madurez en la almeja de sifón *Panopea globosa*.

Conclusiones

- 1.- El desove intenso de *Panopea globosa* ocurre principalmente a principios de diciembre, cuando la temperatura se estabilizó alrededor de 18.5 - 19°C por un período aproximado de 20 días.
- 2.- Se identificaron 5 estadios de maduración gonadal en machos y hembras de la almeja de sifón *Panopea globosa*, a partir de evaluaciones histológicas, histoquímicas y bioquímicas.
- 3.- La vitelogenina presente en la hemolinfa y la gónada es un indicador sensible del grado de madurez de los ovocitos de *Panopea globosa*.

4.- Los niveles de carbohidratos presentes en la hemolinfa están relacionados con el grado de madurez de los ovocitos de *Panopea globosa*.

5.- Se encontró una correlación positiva entre la concentración de vitelogenina en hemolinfa y el diámetro y área de ovocitos lo cual indica que es posible utilizar esta glucolipoproteína como indicador del grado de madurez en ejemplares adultos de la almeja *Panopea globosa*.

6.- Se encontró una correlación positiva entre la concentración de carbohidratos en hemolinfa y el diámetro y área de ovocitos lo cual pone en evidencia que es posible utilizar los niveles de este componente como una alternativa para determinar el grado de madurez en la almeja *Panopea globosa*.

Literatura Citada

Aragón-Noriega, A., Chavez-Villalba, E.A. Gribben,P.E. Alcántar-Razo,E. Maeda-Martínez, A.N. Arámbula-Pujol,E.M. García-Juárez, A. Maldonado-Amparo, R. (2007). "Morphometric relationships, gametogenic development and spawning of the geoduck clam *Panopea globosa* (Bivalvia: Hiatellidae) in the central Gulf of California. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. La Paz, B.C.S, México. *Journal of Shellfish Research* 26: 423-431.

Arámbula-Pujol, E. M. García-Juárez., A.R. Alcántara-Razo, E. Aragón-Noriega, E. A. (2008). Aspectos de biología reproductiva de la almeja de sifón *Panopea globosa* (Dall 1898) en el Golfo de California. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. La Paz, B.C.S, México. *Hidrobiológica* **18**(2): 89-98.

Arcos-Ortega, F.G. Ibarra, A.M. Rodríguez-Jaramillo, M.C. García-Latorre, E.A. & Vazquez-Boucard, C. 2009. Quantification of vitellin/vitellogenin-like proteins in the oyster *Crassostrea corteziensis* (Hertlein 1951) as a tool to predict the degree of gonad maturity. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. La Paz, B.C.S, México. *Aquaculture Research* **40**: pp 644-655.

Arcos-Ortega, F.G. Ibarra, A.M. Racotta, S.L. 2011. Vitellogenin in hemolymph predicts gonad maturity in adult female *Litopenaeus (Penaeus) vannamei* shrimp. Elsevier. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. *Aquaculture*. 316: pp 93-98.

Arcos-Ortega, F.G. Ibarra, A.M. Racotta, S.L. 2012. Fisiología y genética del desempeño reproductivo del camarón blanco: La heredabilidad del desempeño reproductivo del camarón blanco. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. La Paz, B.C.S. México.

Athews, C. K. y. K. E. Van Holde. 1998. Bioquímica. McGraw - Hill Interamericana. España.

Barber, B.J., Blake, N.J., 1981. Energy storage and utilization in relation to gametogenesis in *Argopecten irradians concentricus* (Say). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 52. 121-134.

Barber, B.J., Blake, N.J., 1991. Reproductive physiology. In: Shumway, S.E. (Ed)...
Scallops: Biology Ecology and Aquaculture. Elsevier Sci. Publ., Amsterdam, The
Netherlands, pp. 37- 428.

Barret, J. T., Ed. 1985. Inmunología. México, Interamericana.

Bayliss, H. O., Ed. 1984. Lipid histochemistry (Microscopy handbooks 6). London,
Department of pathology, Guy's Hospital Medical School Lonodn. Oxford University
Press. Royal Microscopical Society.

Berg, J.M. 2008. Biochemistry. 6th edition. W.H. Freeman and Company. U.S.A. 1026
p.

Besnard, J.Y. 1991. Seasonal variation in the lipids and fatty acids on the female gonad
of the scallop *Pecten maximus* (Linnaeus, 1758) in the Bay of Seine (French Channel).
S.E. Shumway and P.A. Sandifer (Eds). An International Compendium of Scallops
Biology and Culture. World Aquaculture Society, pp 74-86.

Burgos-Aceves, M. A. 2003. Maduración gonadal de hembras del lenguado de
california *Paralichthys californicus* en el medio natural. Programa de Estudios de
Posgrado. Centro de Investigaciones Biologicas del Noroeste. Maestría en Ciencias. La
Paz, B.C.S. 100 p.

Burns, R. 2005. Immunochemicals Protocols. 3rd edition. U.S.A.

Calderón-Aguilera, L. E. Aragón-Noriega, E.A. Reyes-Bonilla, H. Paniagua-Chávez, C.G. Romo-Curiel, A.E. Moreno-Rivera, V.M. 2010. Reproduction of Cortes geoduck *Panopea globosa* (Bivalvia: Hiatellidae) and its relationship with temperature and ocean productivity. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. La Paz, B.C.S, México. Journal of Shellfish Research. 29(1): pp 135-141.

Cox, M. M. a. Nelson, D.L. 2001. Lehninger. Principios de Bioquímica. 3era edición. Ediciones Omega. España. 1262 p.

De la Parra, A.M. et al. 2005. Seasonal variations on the biochemical composition and lipid classes of the gonadal and storage tissues of *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1974) in relation to the gametogenic cycle. Journal of Shellfish, 2007. 24(2): pp 457-467.

Gabbott, P.A. 1976. Energy metabolism. B.L. Bayne (Edt), Marine Mussels. Cambridge University Press. England. pp 293 – 355.

Gabbott, P.A., 1983. Developmental and seasonal metabolic activities in marine molluscs. In: Hochachka, P.W. (Ed).., The Mollusca, vol. 2, Academic Press, New York.

Gallager, S. M., R. Mann & G. C. Sasaki. 1986. Lipid as an index of growth and viability in three species of bivalve larvae. *Aquaculture* 56: pp 81–103.

Gómez-Robles, M.E. 2008. Evaluación de indicadores cualitativos y cuantitativos de calidad de gónada y tejidos somáticos de la madreperla *Pinctada mazatlanica* (Hanley, 1856) relacionados con la reproducción. Programa de Estudios de Posgrado. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. La Paz, B.C.S., México. 109 p.

Gosling, E. 2003. Bivalve Molluscs: Biology, Ecology and Culture, Blackwell Science. United Kingdom. 439 p.

Hagedorn, H. H. y. Kunkel, J.G. 1979. Vitellogenin and Vitellin in Insects. U.S.A. Annual Review of Entomology 24: pp 475-505.

Holland, D.L and Hannant, P.J. 1974. Biochemical changes during growth of the spat of the oyster, *Ostrea edulis*. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom. 54 (4). pp 1007 - 1016

Humanson, G. L. 1972. Animal Tissue Techniques. Freeman and Company. San Francisco,

Matozzo, V. A. Marin, M.G. 2004. Can 4-nonylphenol induce vitellogenin-like proteins in the clam *Tapes philippinarum* (*Ruditapes philippinarum*). Department of Biology,

University of Padova, Via Ugo Bassi, Padova, Italy. *Environmental Research*_97: pp 43-49.

Matsumoto, T. Nakamura, A.M. Mori, K and Kayano, T. 2003. "Molecular Characterization of a cDNA Encoding Putative Vitellogenin from the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*. National Research Institute of Aquaculture. Nisei, Japan. *Zoological Science* 20: pp 37-42.

Mendoza, R. Guillaume, J.C. Fauvel, C. 1993. Homologous ELISA procedure for the determination of penaeid shrimp vitellogenin. Universidad Autónoma de Nueva León. N.L, México. *Aquatic Living Resources*_ 6: pp 39-48.

Osada, M. Takamura, T. Sato, H and Mori, K. 2003. "Vitellogenin Synthesis in the Ovary of Scallop, *Patinopecten yessoensis*: Control by Estradiol-17 β and the Central Nervous System. Tohoku University. Japan. *Journal Of Experimental Zoology* 299 (A): pp 172-179.

Pani, A. K. Croll, R.P. 2000. "Catechol Concentrations in the Hemolymph of the Scallop, *Placopecten magellanicus*. Departmente of Physiology and Biophysics, Faculty of Medicine. Dalhousie University, Halifax, Nova Scotia, Canada. General and Comparative Endocrinology. 118: pp 48-56.

Pazos, A.J., Román, C.P., Acosta, M. Abad, 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. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 211: pp 169 – 193.

Puinean, A.M. Ciocan, C.M. Cubero – León, E. Hill, E.M. Minier, COsada, M. Itoh, N. Rotchell, J.M. 2006. "Vitellogenin gene expression as a biomarker of endocrine disruption in the invertebrate, *Mytilus edulis*. United Kingdom. Department of Biology and Environmental Science, School of Life Sciences.

Racotta, I.S., Ramirez, J.L., Avila, S., Ibarra, A.M. 1998. Biochemical composition of gonad and muscle in the Catarina scallop, *Argopecten ventricosus*, after reproductive conditioning under two feeding systems. *Aquaculture*. 163: pp 111-122.

Robledo et al. 1995. Seasonal variations in the biochemical composition of the serum of *Mytilus galloprovincialis* Lmk. and its relationship to the reproductive cycle and parasitic load. *Aquaculture*. 133: pp 311-322.

Rodríguez-Jaramillo, C. Hurtado M.A. Romero-Vivas, E. Ramírez J.L. Manzano, M. Palacios. E. 2008. Gonadal development and histochemistry of the tropical oyster *Crassostrea cortziensis* (Hertlein, 1951) during an anual reproductive cycle. *Journal of Marine Shellfish Research*. 27 (5): pp 1129 – 1141.

Sarasquete, C. González de Canales, M.L. Piñuela, C. Muñoz Cueto, J.A. Rendón, C. Mañanós, E.L. Gómez Rodríguez, F.J. Pascual, E. (2002). "Características Histoquímicas de los Ovocitos Vitelogénicos del Atún Rojo, *Thunnus thynnus* L. Universidad Autónoma de Baja California. Ensenada, B.C, México. Ciencias Marinas 28 (004): pp 419-431.

Serrano-Pinto, V. Carrisoza-Valenzuela, M.G. Ramírez-Orozco, M. 2005. Determination site of vitellogenin synthesis in freshwater crayfish *Cherax quadricarinatus* at different maturation stages females. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. La Paz, B.C.S, México, Programa de Acuicultura. 33: pp 95-200.

Sheehan, D., Hrapchak B. 1980. Theory and practice of Histotechnology. Battelle Press. Ohio.

Vazquez-Boucard, C. G. Levy, P. Ceccaldi, H.J. Brogren, C.H. 2002. Developmental changes in concentration of vitellin, vitellogenin and lipids in hemolymph, hepatopancreas and ovaries from different ovarian stages of Indian white prawn *Fenneropenaeus indicus*. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 281: 63 - 75.

Sumpter, J. P. Jobling, S. 1995. Vitellogenesis as a Biomarker for Estrogenic Contamination of the Aquatic Environment. Department of Biology and Biochemistry, Brunel University, Uxbridge, Middlesex, United Kingdom.

Vite-García, M.N. 2005. Almacenamiento y utilización de reservas energéticas en relación con la reproducción de las ostras perleras *Pteria sterna* (Gould, 1851) y *Pinctada mazatlanica* (Hanley, 1856). Programa de Estudios de Posgrado. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. Maestría en Ciencias. La Paz, B.C.S. pp 95.

Zapata, O. 2006. Segunda reunión de contaminantes orgánicos persistentes (COP's). Ciudad de México, México.

APENDICES

APENDICE I

*Estandarización de un método no invasivo de extracción de hemolinfa de la almeja *Panopea globosa*.*

Se estandarizó un método de extracción de hemolinfa que no ocasionara la mortalidad de los organismos, para lo cual, se evaluó la respuesta fisiológica de los organismos experimentales al proceso de extracción de hemolinfa. Para ello se instaló un sistema con recirculación parcial de agua, de manera que la temperatura, el alimento y la aireación fueran los óptimos establecidos para el mantenimiento de esta especie (García-Ezquivel et al., 2010).

Se utilizaron 5 almejas adultas de *Panopea globosa* y se realizaron los cálculos correspondientes para ajustar la ración de alimento (*Isochrysis galbana*) de los

organismos al volumen de agua en el tanque y se alimentó un día completo para asegurar de manera visual que los organismos se comportaban de manera normal en relación al consumo de alimento (tasa de ingestión). Esto sirvió como indicador de que los organismos se estabilizaron correctamente en el sistema experimental. Posteriormente, se cuantificaron las tasas de ingestión de los organismos intactos mediante la evaluación del número de microalgas presentes en el sistema al tiempo “0” y al tiempo “t”.

Después de obtener las tasas de ingestión, se realizó la extracción de un volumen determinado de hemolinfa para los 5 organismos problema (100, 150, 200, 250, 300 μL respectivamente) con el fin de evaluar si este proceso causaba alguna respuesta fisiológica negativa considerable relacionada específicamente hacia la ingestión de alimento. Una vez extraída la hemolinfa se alimentó a los animales y se cuantificó nuevamente la densidad del alimento al tiempo “0” y tiempo “t” post-inyección.

APENDICE II

De manera general el procesamiento histológico para la tinción Hematoxilina–Eosina, consistió de varias fases que se describen a continuación:

Deshidratación.

Con la finalidad de eliminar los niveles de agua del tejido, las porciones gonádicas fijadas en solución Davidson se colocaron en diferentes concentraciones de alcohol etílico (70%, 80% y 100%), posteriormente en una mezcla de alcohol etílico absoluto–xilol y xilol absoluto; este proceso se realizó en un procesador de tejidos LEICA ASP 200S como se describe en la siguiente tabla:

Tabla IVII.- Rutina de deshidratación del procesamiento histológico.

SOLUCIÓN	TIEMPO DE INCUBACIÓN
Alcohol etílico 70% I	1 hora
Alcohol etílico 70% II	1 hora
Alcohol etílico 80%	1 hora
Alcohol etílico 90%	1 hora
Alcohol etílico 96%	1 hora
Alcohol etílico 100% I	1 hora
Alcohol etílico 100% II	1 hora
Alcohol etílico 100% III.	1 hora
Mezcla de alcohol etílico absoluto-xilol (1:1)	20 minutos (tiempo crítico)
Xilol absoluto (100%)	5 – 10 minutos (tiempo crítico)

Inclusión.

Una vez finalizado el proceso de deshidratación, los tejidos se embebieron en parafina-xilol y parafina I, II, III y IV con un punto de fusión de alrededor de los 54°C como se muestra en la Tabla X. Para finalizar el proceso, los tejidos fueron colocados en placas de inclusión en un sistema de inclusión en parafina Histoembedder LEICA.

Tabla X.- Rutina de inclusión en parafina del procesamiento histológico.

SOLUCIÓN	TIEMPO DE INCUBACIÓN
Parafina – xilol (1:1)	25 minutos (no dejar más tiempo)
Parafina I (Paraplast)	1 hora
Parafina II (Paraplast)	1 - 2 horas
Parafina III (Paraplast)	1- 2 horas
Parafina IV (Paraplast)	1 hora (2 horas para tejidos grandes)

Corte.

El proceso de cortado se realizo de manera seriada en un micrótopo de rotación, LEICA modelo RM2155. Primeramente se rebajó el excedente de parafina con un grosor de 10 micras hasta alcanzar obtener la aparición homogénea del tejido y después se realizaron cortes más finos de 4 micras para cada muestra de tejido gonadal. Los cortes se colocaron y extendieron en un baño de flotación de teflón con agua a una temperatura de 42 – 45°C y una pequeña cantidad de gelatina pura al 0.01% para aumentar la adherencia y se colocaron en portaobjetos previamente etiquetados y se dejaron secar a temperatura ambiente.

Tinción.

Una vez secos los cortes histológicos, se sometieron a la técnica de tinción de Hematoxilina –Eosina de Harris o llamada también HE, proceso en el cual los cortes son embebidos en una serie de soluciones y colorantes. La técnica se llevó a cabo en un teñidor automático LEICA ST 5020 como se indica en la Tabla XI.

Tabla VIII.- Rutina de tinción Hematoxilina–Eosina.

SOLUCIÓN	TIEMPO DE INCLUSIÓN
Xilol I	10 – 15 minutos
Xilol II	10 – 15 minutos
Xilol III	10 – 15 minutos
Alcohol etílico al 92%	2 minutos
Alcohol etílico al 70% I	2 minutos
Alcohol etílico al 70% II	2 minutos
Agua destilada o desionizada	5 minutos
Hematoxilina de Harris	4 minutos
Agua corriente	5 minutos
Agua destilada	5 minutos
Alcohol – ácido (1Lt de alcohol al 96% con 5 gotas de ácido clorhídrico)	10 – 15 segundos
Agua destilada	5 minutos
Agua amoniacal (hidróxido de amonio)	10 – 15 segundos
Agua destilada	5 minutos
Alcohol etílico 50%	2 minutos
Alcohol etílico al 70%	2 minutos

Eosina alcohólica	3 minutos (dependiendo del tiempo del colorante)
Alcohol 96% I	1 – 2 minutos
Alcohol 96% II	1 – 2 minutos
Alcohol 100% I	1 minuto
Alcohol 100% II	1 minuto
Citrosolv I (sustituto de xileno)	5 minutos
Citrosolv II	5 minutos
Citrosolv III	5 minutos
Montar en resina sintética o Entellan.	

Para los análisis histoquímicos se realizó otra serie de cortes mediante el mismo procedimiento empleado para la tinción de HE, pasando primeramente por un proceso de deshidratación, seguido por un proceso de inclusión y luego corte, para después ser procesados con las técnicas de Azul Alciano–PAS para la identificación de mucopolisacáridos ácidos y neutros así como la presencia de sustancias cartilaginosas presentes en tejido. El procedimiento realizado para esta técnica se describe en la Tabla XII.

Tabla IXI.- Rutina de tinción Azul Alciano–PAS

SOLUCIÓN	TIEMPO DE INCUBACION

Tinción con Azul Alciano	15 minutos
Agua destilada	2 minutos
Ácido periódico 0.5%	10 minutos
Agua corriente	5 minutos
Agua destilada	5 minutos
Reactivo de Schiff's	10 – 15 minutos (refrigeración)
Solución sulfurosa (3 cambios)	2 minutos c/u
Agua corriente	5 minutos
Tinción con hematoxilina férrica de Weigert o HE normal	5 minutos
Agua destilada	2 minutos
Alcohol 96%	5 minutos
Alcohol etílico absoluto I 100%	5 minutos
Alcohol etílico absoluto II 100%	5 minutos
Citrosolv	5 minutos
Montar en resina sintética	

La tinción de Sudán Negro se realizó con la finalidad de poder identificar y evidenciar en tejido la presencia de fosfolípidos y triglicéridos principalmente. El procedimiento realizado para esta técnica se describe en la Tabla XIII.

Tabla XIII.- Rutina de tinción Sudán Negro.

SOLUCIÓN	TIEMPO DE INCUBACIÓN
Realizar pasos 1- 3 de la Tabla III	
Alcohol al 70%	
Solución Sudán Negro (filtrar antes de usar)	15 – 30 minutos
Alcohol al 70%	
Hematoxilina de Harris	10 -12 minutos
Agua corriente	
Agua destilada	
Montaje en gelatina glicerizada	

APENDICE III

Cuantificación de proteínas totales (PT) en hemolinfa.

La cuantificación de PT en hemolinfa se realizó con el método de BCA (Kit de Sigma - Aldrich). Se tomaron 20 μ L directamente de la muestra y se colocaron en una microplaca previamente etiquetada. Posteriormente se agregó 20 μ L de BCA (ácido bicinconínico) para precipitar la mayor cantidad de proteínas presentes en la muestra y posteriormente se agregó 200 μ L reactivo de Bradford. Se esperó 2 minutos para la

reacción. Los resultados se leyeron en un lector de microplacas Thermo Scientific Multiskan Spectrum a una absorbancia de 595 nm.

Se corrió una curva de calibración con estándar de albumina a partir de 2 mg/mL. Se corrió una regresión lineal de la curva (absorbancia vs concentración) con ajuste a cero y se usó la pendiente para calcular la concentración de las muestras.

Cuantificación de lípidos totales (LT) en hemolinfa.

Para la cuantificación de LT en hemolinfa se tomó 25 μ L directamente de la muestra y se colocaron en minitubos de 1.1 mL previamente etiquetados. Posteriormente se agregó 200 μ L de H₂SO₄ (ácido sulfúrico concentrado) y se calentó en un baño María Precisión 280 Thermo Scientific por 10 minutos a 90°C y se enfrió rápidamente para detener la reacción. Enseguida se tomó 25 μ L de muestra y se colocaron en una microplaca y se agregó 200 μ L de fosfovainillina al 0.2% en ácido fosfórico y se dejó reaccionar por 40 minutos. Se colocó la microplaca en un lector de microplacas y se leyó a 540 nm.

Cuantificación de carbohidratos (CHOS) en hemolinfa.

Para la cuantificación de CHOS en hemolinfa se tomó 50 μ L de muestra y se colocaron en minitubos de 1.1 mL y se les agregó 50 μ L de TCA (ácido tricloroacético) con el fin de precipitar las proteínas. Se centrifugó en una centrífuga 5810R Eppendorf a 3600 rpm por 10 min a 4°C. Finalizado el proceso se tomó 25 μ L de sobrenadante y se colocaron en minitubos de 1.1 mL nuevos y se les agregó 250 μ L de Antrona al 0.1% en

H₂SO₄ al 96%. Se calentó en baño María de 4 a 10 minutos verificando cuidadosamente la reacción y se enfrió inmediatamente. Se sembró 200 µL en una microplaca y se leyó a 630 nm.

Cuantificación de proteínas totales en gónada.

Para la cuantificación de PT de gónada se tomó 20 µL del homogenizado de la muestra de tejido gonádico, se colocaron en minitubos de 1.1 mL, se les agregó 100 µL de NaOH 0.1N y se dejó digerir por un período de 2 horas. Finalizado este proceso se agitó ligeramente y se tomaron alícuotas de 25 µL, se colocaron en una microplaca y se les agregó 200 µL de reactivo BCA. Se incubó por 15 minutos a 60°C. Se colocó la microplaca en un lector de placa y se leyó a 562 nm.

Cuantificación de lípidos totales en gónada.

Para la cuantificación de LT de gónada se tomó 25 µL del homogenizado de la muestra de tejido gonádico y se colocaron en minitubos de 1.1 mL. Posteriormente se les agregó 250 µL de H₂SO₄ concentrado, se agitó levemente y se calentaron en baño María a 90°C por 10 minutos. Terminado el proceso se enfrió rápidamente, se agitó levemente y se tomaron alícuotas 25 µL y se colocaron en una microplaca previamente etiquetada. Se agregó 200 µL de reactivo vainillina en cada pozo y se incubó durante 40 minutos. Se colocó la microplaca en un lector y se leyó a 540 nm.

Cuantificación de carbohidratos en gónada

Para la cuantificación de CHOS se tomó 100 μL del homogenizado y se le añadió 100 μL de TCA (ácido tricloroacético) al 20% con el fin de precipitar las proteínas. Se centrifugó a 3600 rpm por 10 minutos a 4°C. Se tomó 25 μL del sobrenadante y se colocaron en minitubos de 1.1 mL limpios previamente etiquetados. Posteriormente se les agregó 250 μL de Antrona al 0.1% en H_2SO_4 al 96%. Se calentó en baño María de 4 a 10 minutos verificando cuidadosamente un cambio de color por efecto de la reacción y se enfrió inmediatamente. Se sembró 200 μL en una microplaca y se leyó a 630 nm.

APENDICE IV

Inmunoensayo tipo ELISA no competitivo

El inmunoensayo ELISA consistió de las siguientes fases:

1. Preparación de homogenizados de hemolinfa y tejido gonádico.- Se obtuvo pequeñas porciones de homogenizados de hemolinfa y gónada utilizando un amortiguador 0.05 M Tris HCl con 0.5 M de NaCl, 5Mm de EDTA y 0.003% de inhibidor de proteasas, pH 7.0 (Chang et al., 1996). La homogenización se llevó a cabo en tubos eppendorf de 1.5 mL con la ayuda de un homogenizador automático adaptado con pistilos en un volumen de 3:1 (amortiguador:muestra) en hielo con el fin de evitar la degradación de las proteínas por efecto de la elevación de la temperatura producto de la fricción.
2. Fijación del antígeno en el fondo de la placa ELISA. - En una placa de ELISA se colocaron 150 μL /pozo de cada una de las muestras a una concentración de (1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ proteínas totales), diluidas en amortiguador de fijación (hemolinfa 40 μL + 110 μL de amortiguador Quateen (elaborado en laboratorio) y gónada 15 μL + 135 μL de Quateen). En la misma placa se colocaron diferentes diluciones

(12 a 400 ng/mL) de la lipovitelina pura diluida también en el amortiguador de fijación. Posteriormente, las muestras se colocaron en la placa ELISA y se incubaron toda la noche a 4°C.

3. *Eliminación de exceso de proteínas.*- Con la finalidad de eliminar el exceso de proteínas que no se fijaron en la fase sólida de la placa (fondo de la placa ELISA). Los pozos de la placa fueron lavados 4 veces con 200µL de solución amortiguadora de fosfato salino PBS-Tween, con intervalos de 5 minutos entre cada lavado.

4. *Saturación de sitios libres.*- La saturación de sitios libres entre el antígeno que se forman al eliminar el exceso de proteínas se realizó mediante una incubación de 1 hora con 200µL/pozo de buffer PBS.Tween + 0.5% de Albúmina Bovina Sérica (BSA).

Posteriormente se realizó un procedimiento de lavado de igual manera que el paso 2.

5. *Primer anticuerpo.*- Se colocó 150 µL/pozo del primer anticuerpo (antilipovitelina), diluida 1/3000 con una solución amortiguadora PBS-Tween. Se dejó incubar por un período de 3 horas a 37 °C.

Se realizó un proceso de lavado igual que el paso 2.

6. *Segundo anticuerpo.*- Se colocó 150 µL/pozo del segundo anticuerpo acoplado a la enzima fosfatasa alcalina y dirigidos contra los anticuerpos de conejo anti-lipovitelina diluido 1/5000 con una solución amortiguadora PBS – Tween.

Se lavó nuevamente igual que el paso 2

7. *Substrato de reacción.*- Se adicionó 150 µg/pozo de sustrato y se incubó a temperatura ambiente y oscuridad (reacción fotosensible) durante 30 minutos.

Se leyó en un espectrofotómetro a 405 nm.

Soluciones para el inmunoensayo ELISA**Amortiguador de fijación Buffer Quateen:**

2x para preparar 250 ml

Na₂CO₃ (P.M.= 105.94gr) 0.795 gr en 100 ml H₂O destilada

NaHCO₃ (P.M.=83.96gr) 1.465 gr en 100 ml H₂O destilada

NaN₃ 20% (P.M.=65.00)..... 0.5 ml (500µl) (2.5 en 12.5 ml).

Ajustar pH = 9.6 y aforar a 250 ml con H₂O destilada

Nota: Diluir 1:1 antes de usar.

Tiene una duración de 2 semanas a 4°C

Amortiguador de saturación

Para preparar 100 ml

Amortiguador PBS-Tween 0.05% 100 ml

Albumina Bovina Serica (BSA) 0.05% 0.5 gr

Tween 0.5% (1500 µl c/d 300 ml de buffer) ó 500 µl por c/d 100 ml buffer.

Nota: No almacenar, preparar el día de uso.

Amortiguador PBS-Tween:

Solución concentrada (10x) para preparar 1000 ml

K₂HPO₄ 3H₂O 34.25 gr en 300 ml H₂O destilada

K₂PO₄ 20.41 gr en 300 ml H₂O destilada

NaCl 87.66 gr en 300 ml H₂O destilada

Ajustar pH = 7.4 y aforar a 1000ml de H₂O destilada

Nota: Tomar 10 ml de buffer por cada 100 ml de solución a preparar aforando con H₂O destilada.

